

Inventaris Wob-verzoek W17-08										
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS 2017854	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x	x		x		
4	Bijlage 1			x						
5	Bijlage 2			x						
6	DEC advies				x		x	x		
7	Advies CCD		x							x
8	Beschikking en vergunning				x		x	x		

AVD 10500 2017 854



Centrale Commissie Dierproeven

1.

06 FEB. 2017

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 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	10500	<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	10500	
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Rijksuniversiteit Groningen	
		KvK-nummer	1179037	
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	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]	
		Postbus		
		Postcode en plaats	9713 AV GRONINGEN	
		IBAN	NL45ABNA0474567206	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen	
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	PhD student	
		Afdeling	[REDACTED]	
		Telefoonnummer	[REDACTED]	
		E-mailadres	[REDACTED]	
1.5	(Optioneel) 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 - 3 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 3 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection mouse model
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Proefdierstudies in het kader van ontwikkelen van medicijnen voor het behandelen van *Pseudomonas aeruginosa* bacteriële infectie aan de luchtwegen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur


5 Checklist bijlagen

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


6 Ondertekening


- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Groningen

Datum 02 - 02 - 2017 

Handtekening 



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Pseudomonas aeruginosa is a common pathogen in hospital-acquired infections, immuno-compromised, cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. Especially in cystic fibrosis patients, the *P. aeruginosa* infections often become persistent and result in lifelong aggressive antibiotic

treatment. The major drawback of this particular approach is that the bacteria often develop resistance to the antibiotics. This can be caused by two mechanisms:

1. Resistance can be due to biofilm formation that protects the population of bacteria from antibiotics and the host's immune system.
2. Resistance can be due to development of intracellular escape mechanism to avoid the effects of the antibiotics.

During the progression of *P. aeruginosa* infection, multiple signaling systems (such as quorum sensing and iron-acquisition system) play an important role in regulating virulence factors production, swarming motility and biofilm maturation. Therefore, blocking these systems can attenuate the bacteria, and also destabilize biofilm formation, resulting in a fragile biofilm which makes the population more accessible to antibiotics and immune cells. The main advantage of this kind of approach is the fact that attenuating virulence (termed *antivirulence*), instead of killing pathogens, gives less pressure to develop resistance [1].

Our research group has been extensively studying antivirulence drugs, mainly for inhibition of quorum sensing system [2-5] and inhibition of iron-acquisition system (manuscript in preparation). The antivirulence drugs in our study can inhibit the target systems *in vitro* in *P. aeruginosa*, and resulted in reduced bacterial virulence. In addition, infection assays using nematode *Caenorhabditis elegans* and larvae of the great wax moth *Galleria mellonella* models showed that treatment with antivirulence drugs led to enhanced survival compared to controls. Furthermore, we have found that one of the most well-studied quorum sensing inhibitors in our library, [REDACTED], did not show toxicity in cell lines and in mouse.

For the purpose of testing the antivirulence drugs, we have developed a *P. aeruginosa* lung infection mouse model. This model is designed to generate a persistent infection with moderate severity. The pathological features of this model closely mimic the pathologic pattern associated with pulmonary infection in human. Therefore this model is suitable for studying the treatment for *P. aeruginosa* infection. A pilot study of [REDACTED] in the mouse model showed diminished infection and prolonged survival of the treated group compared to control.

Therefore, as the next step we would like to test whether these antivirulence drugs could promote the clearance of *P. aeruginosa* in the lung infection mouse model.

1. De Kievit, T. R. & Iglewski, B. H. *Infect. Immun.* **68**, 4839–4849 (2000).
2. Sio, C. F. *et al. Infect. Immun.* **74**, 1673–1682 (2006).
3. Papaioannou, E. *et al. Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4891–4897 (2009).
4. Koch G, *et al. FEMS Microbiol Lett.* **356**, 62–70 (2014).
5. Koch G, *et al. PNAS*, **111(4)**:1568-1573 (2014).

3.2 Purpose

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

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

Targeting bacterial systems that regulate virulence factors production serves as an alternative strategy to overcome bacterial infections. Two major signaling system in *P. aeruginosa* that regulate virulence factors production, namely quorum sensing system and iron-acquisition system, are the most studied among Gram-negative pathogens. Considering high incidence of *P. aeruginosa* lung infection and its ability to gain resistance towards antibiotics, studying inhibition of these systems could pave the way for the development of novel therapy against *P. aeruginosa*.

We are currently studying 10 inhibitors for these systems *in vitro*, and so far, 8 of them are proven to be effective in attenuating *P. aeruginosa*. These 8 inhibitors (4 for each system) are consisting of large molecules (enzymes) or small molecules. To progress further in the research roadmap, we would like to test the efficacy from these inhibitors in the developed *P. aeruginosa* lung infection model in mouse.

Furthermore, since the interference with quorum sensing system or iron-acquisition system alters biofilm formation, we would also like to examine whether the antivirulence drugs enhance the sensitivity of *P. aeruginosa* to antibiotics. For this purpose, we will test the combination of the 8 inhibitors with 2 antibiotics that commonly used in the treatment of *P. aeruginosa* infection. These antibiotics are from different classes with distinctive mode of actions: disruption of the structural integrity of the bacteria, and interference of the DNA or protein metabolism in the bacteria. To achieve this purpose, the main goal is divided into 2 subgoals as follows:

Subgoal 1: Monitoring the drugs distribution in the lungs

The chosen administration route (intranasal) is a common method for delivering compounds into lungs. Showing a distribution of the antivirulence drugs and antibiotics in the lungs will be important to support the outcome of testing the efficacy of the drugs in the infection model. The antivirulence drugs or antibiotics will be tagged and visualized *in vivo*.

Subgoal 2: Assessing the efficacy of antivirulence drugs in *P. aeruginosa* lung infection model

This subgoal is designed to support the main purpose of this project, which is assessing the effect of each antivirulence drug (alone, or in combination with antibiotics) in the *P. aeruginosa* mouse infection model. To optimize the group size of animals, the pilot study will be performed, followed by a power analysis to determine the group size for a full efficacy study.

Our team consists of PIs, trained biotechnicians and PhD student who are experienced in these procedures. The study itself will be performed in the animal facility equipped with BSL-II laboratories and imaging devices. Supported by the previous findings and the expertise, we are positive in gaining a valuable result from this study.

3.3 Relevance

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

Pseudomonas aeruginosa infections are often difficult to treat due to the ability of the bacteria to develop resistance to antibiotics. As mentioned earlier, the resistance could be due to the biofilm formation that protects the bacterial population from antibiotics and the host's immune system. Inhibition of the systems that are important for this feature could enhance the bacterial susceptibility to the treatment. The use of antivirulence on its own, or to enhance the antibiotics effect, is a promising approach for future therapy. Until now, numerous quorum sensing inhibitors and iron-acquisition system inhibitors were characterized and were tested *in vitro*, and some *in vivo*. However developing this new approach faced many obstacles, for example, one of the most well studied quorum sensing inhibitor that is pre-clinically effective, presumably is too toxic for human use. Therefore, the research of antivirulence drugs have to be conducted thoroughly in order to increase the possibility of finding effective inhibitors that are safe for humans. When the proposed experiments are proven to be successful, the result will be a proof of concept that bridges our understanding of the efficacy of antivirulence drugs in mouse model. Furthermore, it will help us to design the next study in our roadmap, which is testing the drugs to a clinically relevant disease model of *P. aeruginosa* infections, e.g. cystic fibrosis or COPD.

3.4 Research strategy

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

The research strategy for testing the antivirulence drugs is depicted in Figure 1 (see below). The first stage of the project is the *in vitro* study: screening the effective inhibitors that can reduce virulence factors production in *P. aeruginosa*, and testing their interaction with the antibiotics. The efficacy of the inhibitors (alone or in combination with antibiotics) will be tested in the simple invertebrate infection model, such as *Caenorhabditis elegans* or the larvae of *Galleria mellonella*. Afterwards, the toxicity assay will be carried out in human epithelial lung cell lines model. The next stage of the project is *in vivo* study in a complex animal model. We have developed the *P. aeruginosa* lung infection model in mouse that closely mimics the pathologic pattern associated with pulmonary infection. The inhibitors that proven to be effective and non-toxic *in vitro* assays will be tested in this mouse model. This stage of the study is

the content of the proposed CCD application. The result of this study will be a proof of concept for the antivirulence efficacy, that will be investigated in a clinically relevant disease model in the future study.

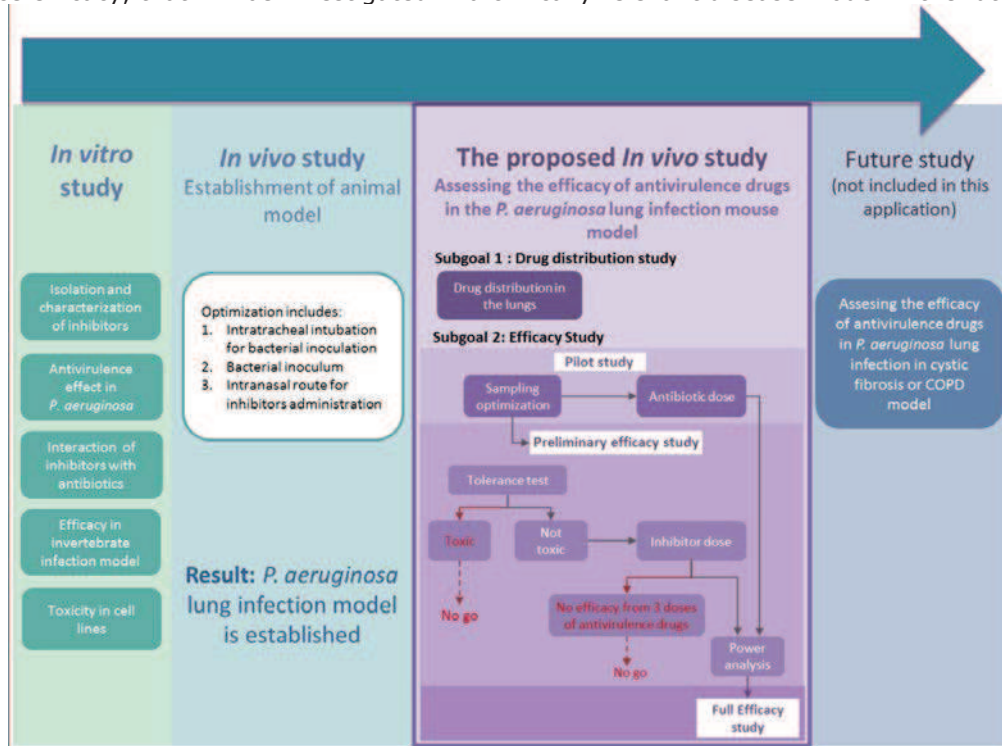


Figure 1. Roadmap of antivirulence drugs development

At this moment we are studying 10 inhibitors *in vitro*, and 8 (eight) most promising inhibitors were chosen for the subsequent *in vivo* study. The study itself is divided into 2 coherent subgoals that support each other: monitoring the drug distribution in the lungs and the efficacy study of the inhibitors. Hereby we elaborate these 2 subgoals that support the main goal in this proposed study:

Subgoal 1: Monitoring drugs distribution in the lungs

The chosen administration route (intranasal) is a common method for delivering compounds into lungs. Showing a distribution of the antivirulence drugs and antibiotics in the lungs will be important to support the outcome of testing the efficacy of the drugs in the infection model. The inhibitor or antibiotic will be coupled with an appropriate tag (for example fluorescent), and administered via intranasal route. Afterwards, the distribution of the compounds will be visualized.

This experiment will not be performed for a particular inhibitor if:

1. Another inhibitor with the same properties, molecular size, tagging method and identical route of administration has already been tested.

Subgoal 2: Assessing the efficacy of antivirulence drugs in *P. aeruginosa* lung infection model

This subgoal is designed to examine the efficacy of each inhibitor (alone or in combination with antibiotics) in the *P. aeruginosa* lung infection model. To optimize the group size of animals, a pilot study and preliminary efficacy study will be performed, followed by a power analysis to determine the required sample sizes for the full efficacy study.

2.1. Pilot study

The pilot study consists of 2 parts: optimization of the sampling frequency, and determination of minimum inhibitory concentration of the antibiotics.

A. Optimization of the sampling frequency

Several parameters must be analyzed from the isolated lungs to monitor the severity level of lung

infection, as follow:

- Bacterial count (the main parameter)
- Cytokine level
- Inflammation level (from histopathology)

In our mouse model, the infection is induced by administration of *P. aeruginosa* (t=0), followed by progression of infection until 4 days post inoculation (t=4). We will choose 3 most important time points that are sufficient to reflect the kinetics of these parameters during the course of infection. To do this, we will first follow the full kinetics of the sham group (infected animal treated with PBS) for 4 days. This experiment will determine the crucial time points to be used in the experimental setup for the whole study. Considering its importance, we have to be sure that the result is reproducible and reliable, before implementing the setup. Therefore, it is necessary to validate the result by performing one repetition of this experiment.

B. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics

As mentioned earlier, 2 common antibiotics for treating *P. aeruginosa* infection will be used in the combination therapy, to examine whether the antivirulence drugs enhance the sensitivity of *P. aeruginosa* to antibiotics. In this stage, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics will be determined. We will monitor the progression of infection in the treatment group (treatment with antibiotic) in comparison to the sham group (treatment with PBS). The maximum of 3 different doses will be tested, and 1 MIC dose will be use further in the full efficacy study.

The following studies: preliminary efficacy study and the full efficacy study are designed to test the efficacy of the inhibitor (alone or in combination with antibiotics).

2.2. Preliminary efficacy study

The preliminary efficacy study consists of 2 parts: testing tolerance of the animals to the antivirulence drugs, and determination of minimum effective dose of the antivirulence drug. Each dose will only be tested in one experiment (without repetition).

A. Drug tolerance test

To determine the tolerance of the animals to the inhibitor, various doses of the inhibitor will be given to the healthy animal. These doses are extrapolated from the *in vitro* study and invertebrate infection model, that we predicted as the effective doses for the mouse study. This experiment will give us data about the safe effective dose to be used in the subsequent stages.

B. Determination of minimum effective dose (MED) of the antivirulence drug

This stage is designed to find out the therapeutic window, and determine the minimum effective dose (MED) of the inhibitor (antivirulence drug) for the full efficacy study. We will monitor the progression of infection in the treatment group (treatment with inhibitor) in comparison to the sham group (treatment with PBS). Maximum 3 different doses of inhibitor will be tested to determine its efficacy, and the MED of the inhibitor will be chosen.

The animal experiment of a particular inhibitor will be terminated if:

1. The inhibitor is inducing toxicity.
2. Pilot study do not show efficacy of the inhibitor in the 3 tested doses.

2.3. Full efficacy study

Information from the pilot study will help us to do power analysis for determining the number of animals needed for the full efficacy study. This study is designed to find statistically significant differences between infected animals with and without treatment. One dose of inhibitor (MED), one dose of antibiotics (MIC) and the combination of thereof will be tested.

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

The project consists of two components that is formulated in two subgoals. For those purposes, we designed these set of procedures:

Procedure 1: Lung imaging for drug distribution study

This procedure is intended to achieve the subgoal 1 (Monitoring the drugs distribution in the lungs). The inhibitors or antibiotics will be coupled with an appropriate tag (for example fluorescent), and administered via intranasal route to the infected animals, at two different stages of lung infection. The procedure is a combination between:

- Inducing lung infection in mouse by delivering bacteria into the lungs via intratracheal route
- Single administration of the tagged drugs into the lungs via intranasal route, followed by visualization of drugs in the lungs.

Procedure 2: Lung infection model and antivirulence treatment development

This procedure is intended to achieve the subgoal 2 (Assessing the efficacy of antivirulence drugs in *P. aeruginosa* lung infection model). The procedure is a combination between:

- Inducing lung infection in mouse by delivering bacteria into the lungs via intratracheal route
- Daily administration of the drugs into the lungs via intranasal route

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

Our main goal is to determine the efficacy of the antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in the mouse model. We have developed the *P. aeruginosa* lung infection model that is suitable for testing the antivirulence drugs. The coherence between each step in our proposal are summarized below:

1. Subgoal 1: monitoring the distribution of the drugs in the lungs will justify the outcome of the drug efficacy study.
2. Subgoal 2: is divided into different milestones to answer several important experimental conditions for assessing the efficacy. In the pilot study, we will determine the most crucial time points to be used as an experimental setup for the subsequent stages of the study. This setup will reduced the animal needed for all the following experiments. Furthermore, we will determine the minimum inhibition concentration (MIC) of the antibiotic that is suitable for the combination therapy. In the preliminary efficacy study, we will investigate the minimum effective dose (MED) for the antivirulence drugs. Altogether, the data from pilot and preliminary efficacy study will be applied for the setup in the full efficacy study where the group size is determined by power analysis.

We are currently studying 10 inhibitors for these systems *in vitro*, and so far, 8 of them are proven to be effective in attenuating *P. aeruginosa*. We estimated that each inhibitor will need approximately 6 months for animal testing. Therefore, the duration of 5 years that we proposed in this application is sufficient to study all 8 inhibitors.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Lung imaging for drug distribution study
2	Lung infection model and treatment development
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Lung imaging for drugs distribution study |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This procedure is designed to observe the distribution of antivirulence drugs or antibiotics in the lungs. The chosen administration route (intranasal) is a common method for delivering compounds into lungs. Showing a distribution of the antivirulence drugs and antibiotics in the lungs will be important to support the outcome of testing the efficacy of the drugs in the infection model. The distribution study will be performed at two different stages of lung infection: at the onset of infection, and at later stage of infection. The reason for this 2 time points is that the severity of the lung infection can influence the distribution of the drugs, due to the formed biofilm and the inflammation of the lungs. For this purpose, the procedure is divided into 2 parts:

1. Lung infection model (via intratracheal route)
Administration of *Pseudomonas aeruginosa* into the lungs to develop a persistent lung infection.

2. Delivery of the tagged drugs (via intranasal route) and imaging
Single delivery of the tagged antivirulence drugs and/or antibiotics (for example with fluorescent label) via intranasal route at certain stage of lung infection. The *in vivo* imaging will follow immediately after.

The anticipated primary outcome is a visual distribution of the compounds in the lungs. This data will help us to elucidate further the result from subgoal 2 (efficacy study).

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

In this procedure, we will infect the animals with *P. aeruginosa*, and study the drug distribution at the onset of infection, and at the later stage of infection. The infection procedure is identical with the established infection model in subgoal 2 (efficacy study). The bacteria will be inoculated to the mice (at $t=0$), and the infection is allowed to be developed for 4 days post inoculation ($t=4$).

Procedure:

P. aeruginosa that is embedded in agarose microbeads will be delivered into the mice via intratracheal administration. Disposable sterile intravenous catheters will be inserted into the trachea of the anesthetized mice, followed by instillation of 50 μ L bacterial suspension. While the animal is still under anaesthesia, a transponder microchip for temperature measurement will be implanted subcutaneously. This transponder allows us to measure the body temperature using a portable reader device by scanning the animal without a direct contact.

At $t=0$ or at $t=3$ (3 days post bacterial inoculation, at the peak of infection), a single administration of the tagged drugs or PBS will be delivered to the infected animals. From this point onwards, the procedures will be performed to the anesthetized animals. 50 μ L of the tagged drugs or PBS will be instilled dropwise into the nares of the animals. The *in vivo* imaging will be performed immediately after the drug administration. The animal will be placed into a Fluorescent Molecular Tomography (FMT) or In Vivo Imaging System (IVIS) instruments to determine the drug distribution in the lungs. All fluorescent intensities will be corrected for background fluorescence by subtracting with the fluorescent intensities from control mice. Afterwards, the animals will be terminated humanely to isolate the lungs for further analysis (immunostaining).

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

The proposed number of animals is based on the published study about delivery of large molecules to the lungs [1]. This number is sufficient to observe the reproducibility of the procedure. To optimize the number of animals, this experiment will not be performed for a particular inhibitor if another inhibitor with the same properties, molecular size, tagging method and identical route of administration has already been tested.

Reference

1. Tonnis WF. *et al. Eur J Pharm Biopharm. Elsevier B.V.*, **88**:1056–1063 (2014)

B. The animals

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

Specification of the animals: female BALB/C mouse, 12-13 weeks of age, minimum weight of 20 grams. This specification is identical with the infection model in our previous study, and the strain that will be used for the subgoal 2. BALB/C strain is one of the most preferred strains to work with *P. aeruginosa* infection [2,3]. Compared to other strains such as DBA/2, BALB/C mouse are susceptible to *P. aeruginosa* infections with lower mortality rate. With the same reason, female mice are chosen because they are more susceptible than males to infections [4].

To study the drug distribution, the experimental groups are divided as follow:

1. Drug distribution at the onset of infection ($t=0$)

- a. The tagged drug will be delivered immediately, followed by imaging (6 animals)
- b. As a control, PBS will be delivered immediately, followed by imaging. This group is intended as a control to adjust the background level during imaging procedure (3 animals)

2. Drug distribution at the later stage of infection ($t=3$)

- a. The tagged drug will be delivered immediately, followed by imaging (6 animals)
- b. As a control, PBS will be delivered immediately, followed by imaging. This group is intended as a control to adjust the background level during imaging procedure (3 animals)

Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental errors (3 animals)

Total per drug: 21 animals

As mentioned earlier, the proposed number of animals is based on the published study [1], and allows us to observe the reproducibility of this method. At this moment we have 8 inhibitors and 2 antibiotics to be tested. Therefore, the maximum number of animals for this procedure is 210.

References

2. Bjarnsholt, T. et al. Microbiology **151**, 3873–3880 (2005).
3. Jakobsen, T. H. et al. Antimicrob. Agents Chemother. **56**, 2314–2325 (2012).
4. Guilbault, C. et al. Immunology. **107**, 297–305 (2002).

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

During drug development process, *in vivo* study is indispensable. To support the result of the efficacy study, we have to perform the distribution study using an identical drug administration method.

Replacement of animal with other system will not give an additional benefit to the study.

Reduction

The proposed number fulfils the requirement for drug distribution and for testing the reproducibility of this procedure. To optimize the number of animals, this experiment will not be performed for a particular inhibitor if another inhibitor with the same properties, molecular size, tagging method and identical route of administration has already been tested.

Refinement

We carefully designed our study to prevent unnecessary suffering and pain in the animals by taking several measures. The animals will be under anaesthesia during the whole procedure. The model is designed to develop a sublethal infection. In our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. However, we have to take into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals even though inbred mouse strain will be used. Based on our previous experiments, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%. To reduce the incidence of progression into severe level, we will minimize the variation by managing the variables that we can control. We will always prepare bacterial inoculum from the same stock, and perform the standardized protocol to the healthy animals weighed more than 20 grams. Based on our previous findings, this specification helps in minimizing severity. To induce an infection, the bacteria is delivered only at the beginning of the experiment using intratracheal intubation, a non-surgical and less-invasive delivery method. This method caused less pain and suffering of the animals compared to other protocols that require tracheotomy or repetitive bacterial inoculation. In addition, to measure the body temperature, we will use a transponder microchip that implanted subcutaneously. This method allows us to measure the body temperature without inducing stress, compared to rectal thermometer. The decrease of body temperature correlates directly with the increasing severity of infection. Therefore, measuring body temperature, together with frequent monitoring of the animals' condition, will help us in avoiding implementation of humane endpoints.

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

The procedure will be performed to the anesthetized animal.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The optimized procedures for this particular purpose have not been performed yet.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia will be applied according to the verified protocol. The anaesthesia equipment is checked regularly to ensure that the optimal procedure will be performed properly.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. However, we have to take into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals, even though inbred mouse strain will be used. Based on our previous experiments, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%. We expect that this incident is more likely to be occurred in the infected animals that will develop infection until 3 days post inoculation.

Explain why these effects may emerge.

Even though we will use inbred mouse strains, the response of each individual to the bacterial infection might differ.

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

To reduce the incidence of progression into severe level, we will minimize the controllable variation by always preparing bacterial inoculum from the same stock, and performing the standardized protocol to the healthy animals weighed more than 20 grams. Based on previous findings, this specification helps in minimizing severity. We will frequently monitor the animals' condition to avoid humane endpoints to be implemented.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Severe change in general appearance (constant piloerection, inactivity, poor ambulation) and non-transient hypothermia.

Indicate the likely incidence.

As mentioned earlier, in our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. Taken into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%. We expect that this incident is more likely to be occurred in the infected animals that will develop infection until 3 days post inoculation. We will frequently monitor the animals condition to avoid humane endpoints to be implemented.

K. Classification of severity of procedures

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

We estimated 15% of the infected animals that will develop infection until 3 days post inoculation could reach severe level of discomfort, and the rest will be classified into moderate. Therefore, we categorized the discomfort level of this procedure as moderate to severe.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

We need to isolate the lungs for further analysis such as immunostaining.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 2 | Lung infection model and treatment development |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The procedure is a combination between inducing the lung infection and delivery of antivirulence drugs (alone or in combination with antibiotics). The method has been optimized in the previous animal experiment.

1. Lung infection model (via intratracheal route)

Administration of *Pseudomonas aeruginosa* into the lungs to develop a persistent lung infection.

2. Delivery of drugs (via intranasal route)

Delivering the antivirulence drugs and/or antibiotics to the site of infection in order to assess the efficacy of the drugs in the lung infection model.

The anticipated primary outcome is the progression of infection, or the clearance of bacteria from the lungs. We expect that the latter will be achieved when the infected animals are treated with antivirulence drugs, and more pronounce when combined with antibiotics. Experimental data from the isolated lungs (bacterial count, cytokine level, and inflammation level from histopathology) will be collected to evaluate the drugs' efficacy.

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

The methods described below have been optimized, resulted in a persistent infection with moderate severity and an estimate of 15% chance of progression to severe level.

Procedure:

P. aeruginosa that is embedded in agarose microbeads will be delivered into the mice via intratracheal administration. Disposable sterile intravenous catheters will be inserted into the trachea of the anesthetized mice, followed by instillation of 50 µL bacterial suspension. While the animal is still under anaesthesia, a transponder microchip for temperature measurement will be implanted subcutaneously. This transponder allows us to measure the body temperature using a portable reader device by scanning the animal without direct contact. Bacterial administration will only be performed once at the start of the experiment (t=0). The progression of infection will be followed until 4 days post inoculation (t=4).

The antivirulence drugs and/or antibiotics in a liquid formulation will be delivered once daily during the course of infection. 50 µL of the drugs or PBS will be instilled dropwise into the nares of the anesthetized animal.

The progression of infection will be monitored by observing the general appearance (body weight, body temperature, coat condition and behaviour) and analysing the lungs at different time points. Animals (randomly chosen) will be sacrificed each day to analyse the bacterial load, cytokine level and inflammation of the lungs.

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

To optimize the number of animals, the pilot study will be performed, followed by a power analysis for a full efficacy study. In this way, we will avoid using excessive number of animals and optimize the use of animals in each experiment. The number of animals in the pilot study is determined from the literature and our previous study. The group size is adjusted to overcome the different responses from each individual animal to the bacterial infection. The statistical analyses will consist of a Student's t test (for normally distributed data) or Mann Whitney U (non-normally distributed data) when two groups are compared. Power analyses will be calculated using G*Power [1].

1. Faul F, *et al.* Behavior Research Methods **39**, 175-191 (2007)

B. The animals

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

Specification of the animals: female BALB/C mouse, 12-13 weeks of age, minimum weight of 20 grams. BALB/C strain is one of the most preferred strains to work with *P. aeruginosa* infection [2,3]. Compared to other strains such as DBA/2, BALB/C mice are susceptible to *P. aeruginosa* infections with lower mortality rate. With the same reason, female mice are chosen because they are more susceptible than males to infections [4]. This specification is identical with the infection model in our previous study.

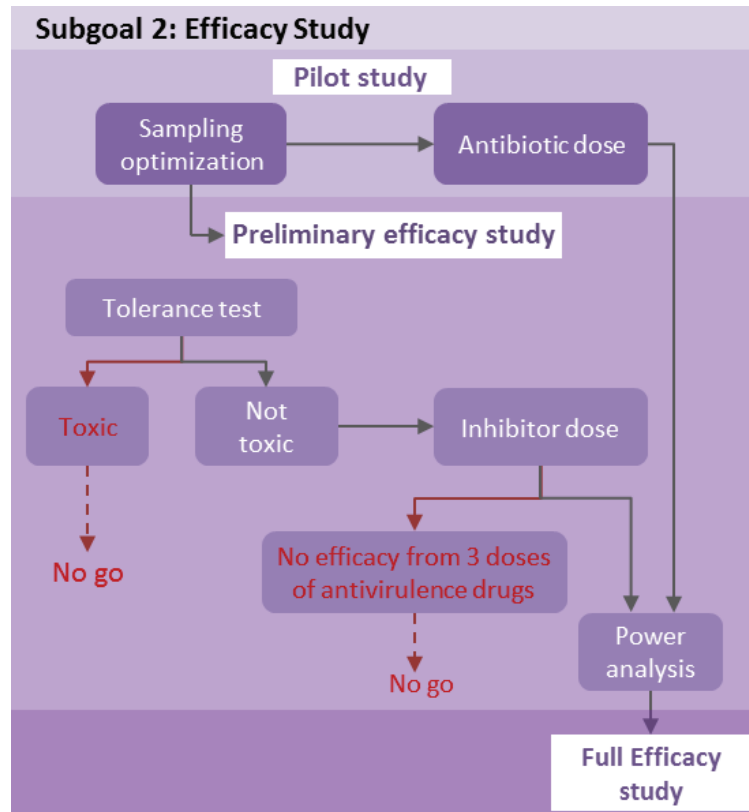


Figure 1. The order of experiments of subgoal 2 (efficacy study)

The order of experiment in this subgoal is depicted in Figure 1. To optimize the group size of animals, a pilot study and preliminary efficacy study will be performed, followed by a power analysis to determine the required sample sizes for the full efficacy study. The explanation of animals needed for each antivirulence drug (alone and in combination with antibiotics) will be elaborated below. This number includes: treatment group with proper control groups and experiments to determine therapeutic doses.

1. Pilot study

The pilot study consists of 2 parts: optimization of the sampling frequency, and determination of minimum inhibitory concentration of the antibiotics.

A. Optimization of the sampling frequency. Total: 94 animals (2 experiments, each 47 animals)

Several parameters must be analyzed from the isolated lungs to monitor the severity level of lung infection, as follow:

- Bacterial count (the main parameter)
- Cytokine level
- Inflammation level (from histopathology)

Due to different responses from each individual animal to the bacterial infection, 6 animals is the minimum number for bacterial count analysis at each time point; and 3 animals will be sacrificed for histopathology analysis.

In our mouse model, the infection is induced by the administration of *P. aeruginosa* ($t=0$), followed by progression of infection until 4 days post inoculation ($t=4$). We will choose 3 most important time points that are sufficient to reflect the kinetics of these parameters during the course of infection. To do this, we will first follow the full kinetics of the sham group (infected animal treated with PBS) for 4 days. One most crucial time points is $t=0$, to confirm the amount of bacteria that is inoculated to the animals. The other 2 time points will be named as $t=a$ and $t=b$ at the time being. The chosen time points will be the experimental design for the subsequent stages.

The number of animals needed for one experiment is depicted in Table 1. This experiment will determine the crucial time points to be used in the experimental setup for the whole study. Considering its importance, we have to be sure that the result is reproducible and reliable, before implementing the setup. Therefore, it is necessary to validate the result by performing one repetition of this experiment.

Table 1. Group size for optimization of the sampling frequency

Time points	t=0	t=1	t=2	t=3	t=4	Total
Analysis						
Bacteria count and cytokine level	6 animals	6 animals	6 animals	6 animals	6 animals	42 animals
Histopathology		3 animals	3 animals	3 animals	3 animals	

Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental error (5 animals per experiment. Total: 10 animals)

B. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics. Total 130 animals per inhibitor

Two antibiotics that are commonly used for treating *P. aeruginosa* infection will be used in the combination therapy, to examine whether the antivirulence drugs enhance the sensitivity of *P. aeruginosa* to antibiotics. These antibiotics are from different classes with distinctive mode of actions: disruption of the structural integrity of the bacteria, and interference of the DNA or protein metabolism in the bacteria. In this stage, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics will be determined. The maximum of 3 doses will be tested based on *in vitro* assays, and the MIC dose will be used further in the full efficacy study.

Extrapolation into the *in vivo* model is challenging, therefore, we designed the experiments to increase the chance of getting the correct MIC. In the first experiment, we will test 2 doses simultaneously to determine the effective range. Then, when necessary, an additional experiment for testing 1 extra dose will be performed. This approach reduces the needed control group, in comparison to testing only single dose three times. While testing 3 doses simultaneously will increase the chance of getting the correct MIC, when none of the doses was effective, more experiment(s) must be performed.

The number of animals needed for each group is depicted in Table 2. The experimental groups are as follow:

- Group 1: Infected animals receiving antibiotic (Experiment 1: 2 doses, each 24 animals; Experiment 2: 1 dose, each 24 animals. Total: 72 animals)
- Sham group: Infected animals receiving PBS (Experiment 1: 24 animals; Experiment 2: 24 animals. Total: 48 animals)
- Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental error (5 animals per experiment. Total: 10 animals)

Table 2. Group size for determination of MIC of antibiotic and MED for antivirulence drugs

Time points	t=0	t=a	t=b	Total
Analysis				
Bacteria count and cytokine level	6 animals	6 animals	6 animals	24 animals
Histopathology		3 animals	3 animals	

Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental error (5 animals)

The following studies: preliminary efficacy study and the full efficacy study are designed to test the efficacy of the inhibitor (alone or in combination with antibiotics).

2. Preliminary efficacy study

The preliminary efficacy study consists of 2 parts: testing tolerance of the animals to the antivirulence drugs, and determination of minimum effective dose of the antivirulence drug. Each dose will only be tested in one experiment (without repetition).

A. Drug tolerance test (Total 12 animals)

To determine the tolerance of the animals to the inhibitor, 3 doses of inhibitor will be given to the healthy animal via intranasal route. These doses are extrapolated from the *in vitro* study and invertebrate infection model, that we predicted as the effective doses for the mouse study. The inhibitors will be given from t=0 to t=4, and the reaction of the animals to the drugs will be monitored. This experiment will give us data about the safe effective dose to be used in the subsequent stages.

The experimental groups are as follow:

- Group 1: Animals receiving daily administration of inhibitor. 3 doses, each 3 animals. (Total: 9 animals)
- Sham group: Animals receiving daily administration of PBS (Total: 3 animals)

B. Determination of minimum effective dose (MED) of the antivirulence drug. Maximum 130 animals per inhibitor

This stage is designed to find out the therapeutic window, and determine the minimum effective dose (MED) of the inhibitor (antivirulence drug) for the full efficacy study. We will monitor the progression of infection in the treatment group (treated with inhibitor) in comparison to the sham group (treated with PBS). Maximum 3 different doses of inhibitor will be tested to determine its efficacy, and the MED of the inhibitor will be chosen.

Using a similar approach as determination of MIC of antibiotics, we will determine the MED by testing 2 doses in the first experiment, and when necessary, the second experiment of testing 1 extra dose will be performed.

The number of animals needed for each group is depicted in Table 2 above. The experimental groups are as follow:

- Group 1: Infected animals receiving inhibitor (Experiment 1: 2 doses, each 24 animals; Experiment 2: 1 dose, each 24 animals. Total: 72 animals)
- Sham group: Infected animals receiving PBS (Experiment 1: 24 animals; Experiment 2: 24 animals. Total: 48 animals)
- Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental error (5 animals per experiment. Total: 10 animals)

3. Full efficacy study. Total: 190 animals per inhibitor

Information from the pilot and preliminary efficacy study will help us determine the number of animals needed for the full efficacy study. This study is designed to find statistically significant treatment effect. The actual group size will be determined from power analysis. However, at this moment we estimated for 30 animals per group based on literature study (Table 3). One dose of inhibitor (MED), one dose of antibiotics (MIC) and the combination of thereof will be compared to the control group. The experimental groups for each inhibitor are as follows:

- Group 1: Infected animals receiving antivirulence drug (1 MED, total: 30 animals)
- Group 2: A. Infected animals receiving antibiotic A (1 MIC dose, total: 30 animals)
B. Infected animals receiving antibiotic B (1 MIC dose, total: 30 animals)
- Group 3: A. Infected animals receiving antivirulence drug and antibiotic A (1 combination, total: 30 animals)
B. Infected animals receiving antivirulence drug and antibiotic B (1 combination, total: 30 animals)
- Group 4: Infected animals receiving PBS (as a control for each experiment, total: 30 animals)
- Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental error (10 animals)

Table 3. Group size for full efficacy study

Time points	t=0	t=a	t=b	Total
Analysis				
Bacteria count and cytokine level	6 animals	10 animals	10 animals	30 animals
Histopathology		2 animals	2 animals	

At this moment we have 8 inhibitors and 2 antibiotics to be tested. These inhibitors are classified as antivirulence drugs, consisting of large molecules (enzymes) and small molecules. For testing each inhibitor (alone and with combination of antibiotic), we proposed 3010 animals (Table 4).

Table 4. Calculation of the proposed animals

Experiment		Group size	Frequency of experiment	Total number of animals
Pilot study	A. Optimization of the sampling frequency	94	1x, at the beginning of the study	94
	B. Antibiotics dose	130	For 2 antibiotics	260
Preliminary efficacy study	A. Drug tolerance test	12	For 8 inhibitors	96
	B. Inhibitor dose	130	For 8 inhibitors	1040
Full efficacy study	Full efficacy study	190	For 8 inhibitors	1520
TOTAL				3010

References

2. Bjarnsholt, T. et al. Microbiology **151**, 3873–3880 (2005).
3. Jakobsen, T. H. et al. Antimicrob. Agents Chemother. **56**, 2314–2325 (2012).
4. Guilbault, C. et al. Immunology. **107**, 297–305 (2002)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

During drug development process, *in vivo* study is indispensable. Although the effect of the antivirulence drugs have been investigated in invertebrate model, the therapeutic efficacy has to be studied in a complex animal. Mouse is the preferred animal to perform these studies, given similarities in anatomy, physiology and the immune system of humans. Hence, various infection models have been developed in this animal, including acute and chronic *P. aeruginosa* infection which show a comparable pathogenesis as observed in human. In addition, the availability of reagents and a working protocol in developing *P. aeruginosa* lung infection in mice for the antivirulence study, strengthens the decision of choosing mouse as a model in our research.

Reduction

We optimize the number of animals by determining the most important time points for sampling in the course of infection. In addition, preliminary study will be performed followed by a power analysis for a full efficacy study. In this way, we will avoid using excessive number of animals and optimize the use of animals in each experiment. The number of animals in pilot experiment was determined from literature study, which fulfill the minimum requirement to analyze the important parameters for monitoring lung infection.

Refinement

We carefully designed our study to prevent unnecessary suffering and pain in the animals by taking several measures. The animals will be under anaesthesia during the whole procedure. The model is designed to develop a sublethal infection. In our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. However, we have to take into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals even though inbred mouse strain will be used. Based on our previous experiments, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%. To reduce the incidence of progression into severe level, we will minimize the variation by managing the variables that we can control. We will always prepare bacterial inoculum from the same stock, and perform the standardized protocol to the healthy animals weighed more than 20 grams. Based on our previous findings, this specification helps in minimizing severity. To induce an infection, the bacterial inoculum is delivered only at the beginning of the experiment using a non-surgical and less-invasive delivery method (intratracheal intubation). This method caused less pain and suffering of the animals compared to other protocols that require tracheotomy or repetitive bacterial inoculation. Another measure is to limit the duration of the study into 4 days post bacterial inoculation. This duration is sufficient for our study, hence it is not necessary to prolong the infection period. In addition, to measure the body temperature, we will use a transponder microchip for temperature measurement that implanted subcutaneously. This method allows us to measure the body temperature without inducing stress, compared to rectal thermometer. The decrease of body temperature correlates directly with the increasing severity of infection. Therefore, measuring body temperature, together with frequent monitoring of the animals' condition, will help us in avoiding implementation of humane endpoints.

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

The procedures will be performed to the anaesthetized animals.

Repetition and duplication**E. Repetition**

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

The optimized procedures for this particular purpose have not been performed yet.

Accommodation and care**F. Accommodation and care**

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia will be applied according to the verified protocol. The anaesthesia equipment is checked regularly to ensure that the optimal procedure will be performed properly.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. However, we have to take into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals, even though inbred mouse strain will be used. Based on our previous experiments, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%.

Explain why these effects may emerge.

Even though we will use inbred mouse strains, the response of each individual to the bacterial infection might differ.

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

To reduce the incidence of progression into severe level, we will minimize the variation by managing the variables that we can control. We will always preparing bacterial inoculum from the same stock, and performing the standardized protocol to the healthy animals weighed more than 20 grams. Based on our previous findings, this specification helps in minimizing severity. We will frequently monitor the animals' condition to avoid humane endpoints to be implemented.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Severe change in general appearance (constant piloerection, inactivity, poor ambulation) and non-transient hypothermia.

Indicate the likely incidence.

As mentioned earlier, in our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. Taken into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%. We will frequently monitor the animals condition to avoid humane endpoints to be implemented.

K. Classification of severity of procedures

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

We estimated 15% of the infected animals could reach severe level of discomfort, and the rest will be classified into moderate. However, the severity will be lower when the treatment is proven to be effective. Therefore, we categorized the discomfort level of this procedure as moderate to severe.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Lungs and other organs, as well as blood are needed to be analysed for measuring the infection progression.

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

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

Yes

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **8078**
2. Titel van het project: **Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of Pseudomonas aeruginosa in lung infection mouse model**
3. Titel van de NTS: **Proefdierstudies in het kader van ontwikkelen van medicijnen voor het behandelen van Pseudomonas aeruginosa bacteriële infectie aan de luchtwegen**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **07-12-2016**
 - aanvraag compleet: **07-12-2016**
 - in vergadering besproken: **15-12-2016**
 - anderszins behandeld: **26-01-2016**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **19-12-2016 tot 13-01-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **13-01-2017**
 - advies aan CCD: **02-02-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.

8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **16-12-2016**

Gestelde vraag/vragen:

1/ In the application you state that you wish to replicate the majority of the experiments. What is the rationale for this? Can you clearly substantiate why replication of the experiments (by your own research group) is absolutely necessary?

2/ In the application you state that you will use an established animal model. Can you substantiate this? Previous information (amendments in DAP) indicate that setting up the model was troublesome.

3/ Progression to severe discomfort in 30% of the animals is rather severe. Are options available to reduce severe discomfort? The DEC stresses that, if severe discomfort is reached in so many animals, that a proper and extensive justification for this needs to be given

4/ A proper scientific justification for using female mice only should be provided

Relating to appendix 1:

5/ A (technical) description of how the imaging (using radioactive or fluorescent probes) in lungs is performed is lacking.

Relating to appendix 2:

6/ It is unclear how the used antibiotic is selected. Two candidate antibiotics are mentioned but it appears from the indicated number of animals that only 1 of the 2 is used. Can you clarify this?

7/ It is unclear why experiment preliminary 'C. Combination therapy of antivirulence drug and antibiotic' is needed. The MIC and MED dose have been established in the previous experiments. Would these data not provide estimate for the effect of combined therapy. Also, is it possible to get information on possible effects of interaction between treatment modalities from in vitro assays?

Relating to NTS:

8/ There are discrepancies in number of animals and level of discomfort when comparing NTS with the project proposal/ appendixes. The level of discomfort should really reflect the description as mentioned in the proposal, including the (estimated) proportion of animals that undergo the different levels of discomfort

- Datum antwoord: 13-01-2017

- Verstrekt(e) antwoord(en):

1/ In our initial CCD application, the repetition was assigned only for the "optimization of the sampling frequency" in the Pilot Study, and for the Full Efficacy Study. Our intention was to verify the reproducibility of the experimental results to ensure that the results are scientifically reliable. The "optimization of the sampling frequency" is an important step, because it will determine the crucial time points to be used in the experimental setup for the whole study. We have to be sure that the result is reproducible and reliable, before implementing the setup. Therefore, it is necessary to validate the result by performing a repetition of this experiment. In the case of Full Efficacy study, we agreed to exclude the repetition and will perform the experiment once. We are convinced that performing one full set of experiment with statistical support is sufficient to determine the treatment effect. The overview of the proposed study is as follows:

1. Pilot study – will only be performed at the beginning of the study: A. Optimization of the sampling frequency (one repetition to confirm the reproducibility); B. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the antibiotics (testing maximum of 3 doses). 2. Preliminary study – will be performed for all inhibitors: A. Drug tolerance test (testing 3 doses); B. Determination of minimum effective dose (MED) of the inhibitors (testing maximum of 3 doses). 3. Full efficacy study – Testing of MIC, MED and combination of thereof, where the group size is determined by power analysis.

Modifications were made in: Proposal and Appendix 2

2/ We understand that the word "established" in the application gives a strong impression of the animal model, which is not applicable in our case. We would like to explain that at this point, we have an optimized working protocol for inducing *P. aeruginosa* lung infection that give a sufficient outcome for our purpose. The explanation of the model development is elaborated below. Lung infection model is challenging to be performed, but it shows a great importance as a robust system for studying drug development and disease pathology. The model itself was established by other research groups around the world, but our study initiated the first step of establishing this model in the UMCG-RuG facility. Acquiring this model will permit a continuous research in our facility, as designed in our roadmap of drug development process. We started the study with the well-planned strategy, but challenges and difficulties are inevitable, and in some cases are unforeseeable during the setting up of this model. The development of animal model in our study was planned carefully and the experiments were executed in a stepwise manner. We strive to refine the conventional infection protocol with a less invasive bacterial administration method (non-surgical intratracheal intubation to replace tracheotomy). To facilitate the need of delivering large molecule inhibitors, we chose an intranasal administration method. To the best of our knowledge, there is no published article with this particular method combination. The lack of references also contributed to the rather complicated optimization process that we experienced. We have optimized important variables to develop the lung infection model. First of all, the bacterial inoculum has to be prepared in a certain way, so that a

single bacterial administration to the lungs is sufficient to induce a persistent infection. In order to achieve this, the bacteria have to be entrapped in agarose microbeads before administration to the lungs. We have validated the bacterial entrapment protocol, which resulted in a consistent beads size (100-200 μm) and a consistent bacterial count ($1\text{-}3 \times 10^8$ CFU/mL). The microbeads suspension was subsequently diluted to the desired bacterial CFU for administration to the animals. We have confirmed that the lung administration of sterile agarose microbeads alone (without *P. aeruginosa*) do not affect the animals' health. Next, we have to solve one of the most crucial aspects in generating the model, which is determining the bacterial dose to be inoculated. Inoculating too less bacteria leads to a rapid clearance of infection, while inoculating too much bacteria is associated with severe infection and high mortality. Therefore, we intended to find the sublethal dose, that will induce a persistence infection with low mortality. Each research group in the literatures mentions different sublethal doses of bacteria. Although each group is using the same bacterial strain that was obtained from the same source, there is variation in culturing the bacteria at each laboratory. This variation inevitably creates diverse bacterial sublines that are associated with different fitness, antimicrobial susceptibility, and virulence. Therefore, determining the sublethal dose for infection was not a straightforward translation from the literature.

In the last experiments to optimize the animal model setup, we have finally determined the sublethal dose for infection, which is $2,5.10^5$ CFU/animal. The animals also received PBS via intranasal route once daily, to simulate the condition of the intended drug administration. Two independent experiments with each 6 animals resulted in a persistent infection up to 4 days post bacterial inoculation, as seen in the bacterial loads in the lungs (Figure 1). No mortality observed during the experiment, and the infection resulted in a moderate severity, judged by the change in body temperature and body weight (Figure 2), as well as the general appearance (behavior, movement and coat condition). The repetition of this protocol resulted in the same trend in all monitored parameters as can be seen in the results. Therefore, this optimized protocol is assigned as the method to generate the lung infection model for further experiment.

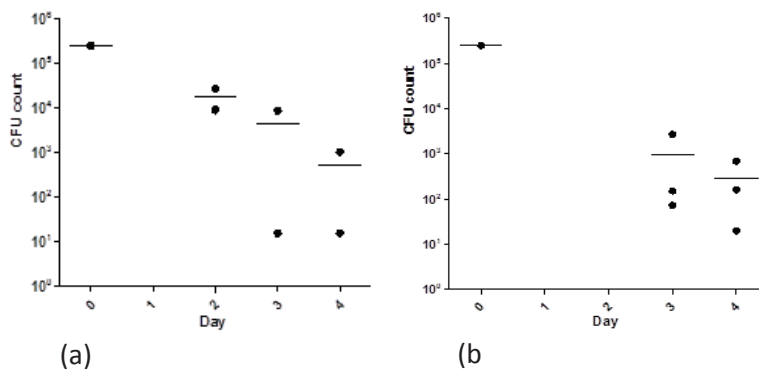


Figure 1. Bacterial count kinetics in the lungs of the animals infected with sublethal bacterial dose. The results are from two independent experiments (a and b). To reduce the animal numbers, no animals were sacrificed at Day 0, the inoculated bacterial counts were confirmed by plating the inoculum on agar plates. In addition, based on previous experiments, the amount of bacteria in the lungs at $t=0$ was the same as the administered inoculum. • individual CFU values, line intercepts mean.

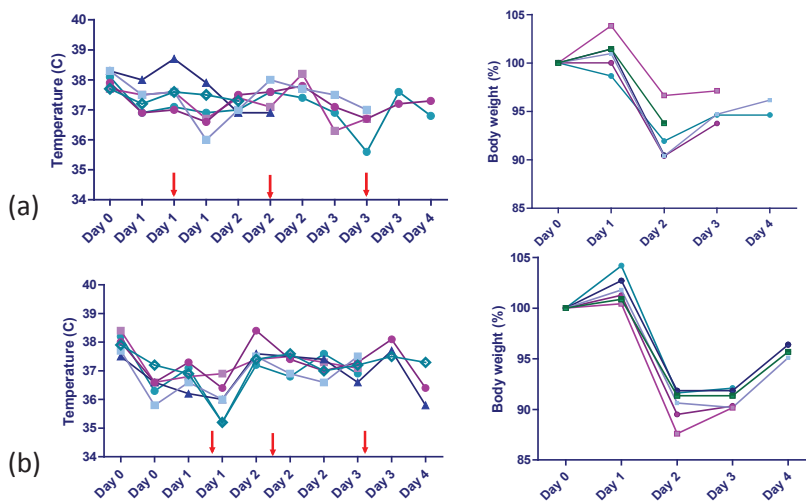


Figure 2. Change of body weight and body temperature of the animals infected with sublethal bacterial dose. The results are from two independent experiments (a and b). Each individual line corresponds to one animal. The red arrows indicate the intranasal administration of PBS. We observed no permanent hypothermia, and the animals gained weight in Day 3.

3/ As mentioned in the response to question no. 2, in reality we did not observe a severe infection nor the mortality from infection when performing the latest protocol. We exaggerated the severity level of the model in the proposal to anticipate the possibility of higher variance of severity when using a larger number of animals. Although the inbred mouse strain will be used, we have to take into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals. Therefore, to make a more representative estimation, we would formulate the chance of reaching severe level of discomfort based on the experimental data, which is 15% chance (in the case that 1 animal reaching severe level of discomfort in a group of 6 animals).

Modifications were made in: Appendix 1 and Appendix 2

4/ Justification of using female mice was made in the application.

Modifications were made in: Appendix 1 and Appendix 2

5/ Based on the progress in screening the inhibitor candidates, we have decided that the radioactive tagging will not be necessary at this point. The fluorescence tag is sufficient for our purpose to perform the distribution study.

Modifications were made in: Proposal and Appendix 1

6/ Two antibiotic candidates in this study are commonly used for treating *Pseudomonas aeruginosa* infection. They are selected from different antibiotics classes with distinctive mode of actions: disruption of the structural integrity of the bacteria, and interference of the DNA or protein metabolism in the bacteria. What we implied in the initial application was to test the combination between 4 antivirulence drugs with the first antibiotic, and 4 other antivirulence drugs with the second antibiotic. We were aware that this strategy relinquishes some important combinations, and missing the chance to have a complete answer for the research question. Although we had a solid argument to propose for all drugs combinations, the sole reason for the initial design was to reduce the proposed number of animals. We were afraid that the complete study design resulted in too much animals and halt the application process. We now aware that this is not an ethical reason to minimize the proposed number of animals. Therefore in this revision, we would like to modify the application by incorporating all possible combinations between antivirulence drugs and antibiotics. Since the chosen antibiotics attack different pathway in the bacteria, it is intriguing to see if our antivirulence drugs could work in synergy with these antibiotics. This approach will give a more comprehensive answer to the research questions.

A certain drug combination will be tested in the animal model only when these 2 conditions are addressed:

1. The combination of antivirulence and antibiotic show no negative interaction in vitro.
2. The combination of antivirulence and antibiotic show synergistic effect in the invertebrate animal model.

Modifications were made in: Proposal and Appendix 2

7/ Prior to the full efficacy study, an in vitro assay will be performed, to eliminate the combination(s) of antivirulence and antibiotics that show negative interaction(s). Further, the drugs combinations without negative interactions will be tested for its synergistic effect in the invertebrate infection model. These together will give an indication whether the combination therapy will be continued to the Full Efficacy Study.

In our initial strategy, the reason why we want to do the preliminary combination study is to make a stepwise approach. Based on the further discussion with a statistician and the advice from DEC, we will remove the drug combination test in the Preliminary Study, and will perform it directly in the Full Efficacy Study. We expect that the combination therapy will show a more pronounce, or the same level of therapeutic effect as antibiotic or antivirulence drug alone. Hence, we can use the MED and the MIC data for the power analysis to determine the group size for the combination therapy.

Modifications were made in: Proposal and Appendix 2

8/ Appropriate modifications was added in the NTS file.

- **De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag**

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? **Ja**
2. Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

3. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
4. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
5. 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. Immers, de verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC vertrouwt erop 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. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).

Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. **De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.**

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel van dit project is het onderzoeken van het effect van 8 nieuw ontwikkelde virulentie remmers, alleen en in combinatie met een antibioticum op de ontwikkeling van longontsteking. De hypothese is dat de antivirulente stoffen bacteriegroei remmen en daarnaast een versturende

invloed kunnen hebben op het vormen van een bacteriële biofilm, waardoor antibiotica effectiever kunnen werken.

Het uiteindelijke doel is om te komen tot betere behandelingen voor longontsteking en in het verlengde daarvan ook betere behandelingsstrategieën voor patiënten die lijden aan ongeneeslijke chronische aandoeningen, zoals COPD en cystic fibrosis.

Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op translationeel onderzoek m.b.t. het hierboven beschreven (directe) doel. Indien een van de geteste virulentieremmer/antibioticum combinaties effectief is in het hier gebruikte diermodel zal dat hoogstwaarschijnlijk tot een vervolgstudie leiden voor de verdere vertaling naar de mens. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project, wat gericht is op het onderzoek naar de werkzaamheid van virulentieremmers bij de behandeling van longontsteking zijn de proefdieren, en de doelgroep/patiënt en diens naasten.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan.

Waarden die voor patiënten bevorderd kunnen worden: de gezondheid van patiënten kan hierdoor verbeterd worden. Hierdoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van patiënten en van hun naasten.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.

Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*). **Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output alsmede de aandacht voor de drie V's**
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. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC is ervan overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de**

bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **N.v.t.**
- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e, lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. **De DEC heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.**
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **Het gekozen diermodel is door de aanvrager in Groningen ontwikkeld. Dit was geen gemakkelijk proces waarbij pas in de laatste fase het ongerief voor de dieren lager werd. De DEC heeft nadere vragen gesteld aan de aanvrager en overleg met de IvD gevoerd. O.b.v. de informatie verstrekt in de aanvraag en de antwoorden van aanvrager en IvD denkt de DEC dat het ongerief goed is ingeschat. Voorts vertrouwt de DEC erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*). **De integriteit van het dier wordt aangetast door toediening van bacteriën, virulentie remmers, antibiotica, anesthesie en opoffering.**
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. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC zijn de criteria voor humane eindpunten in deze

aanvraag goed beschreven (zie ook vraag 11).

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De complexe omstandigheden voor bacterie kolonisatie, de biodistributie van en interactie met virulentie remmers en antibiotica in de longen zijn in vitro niet na te bootsen.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op pilot experimenten, poweranalyse en door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC onder andere de intensieve welzijnsmonitoring, pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

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. Licht uw beoordeling toe.

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

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. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

In onderhavige projectaanvraag worden alleen vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd. Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en

de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.v.t.**

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection mouse model", dat gericht is op het testen van virulentie remmers voor de behandeling van longontsteking het matige-ernstige ongerief, dat de muizen wordt aangedaan in het onderhavige project?

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. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig tot ernstig ongerief. Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: mogelijk groot voordeel voor patiënten.

Algemeen: Vergroting van medische kennis met betrekking tot de behandeling van longontsteking d.m.v. het doorbreken van antibiotica resistentie m.b.v. virulentieremmers.

De DEC-RuG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection mouse model" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na matig tot incidenteel ernstig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door het toedienen van *Pseudomonas aeruginosa* met longontsteking tot gevolg. Daarnaast zal medicatie (virulentieremmers en antibiotica) worden toegediend. De dieren worden opgeofferd aan het eind van de proeven.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter kunnen leiden tot een mogelijke nieuwe behandeling van longontsteking en relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het doorbreken van antibiotica resistentie bij longontsteking. Longontsteking is een ernstige aandoening die momenteel alleen behandeld kan worden met zware antibiotica kuren die vaak tot antibiotica resistentie en alle bijbehorende complicaties leiden. De behandeling is extra problematisch bij mensen die lijden aan COPD of cystic fibrosis. Dit project levert mogelijk nieuwe kandidaat medicijnen voor de behandeling van deze mensen. Dit is van maatschappelijk belang en kan kwaliteit van leven bij mensen bevorderen. Vandaar dat de DEC-RuG het hier beschreven onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van zodanig belang acht dat de dierproeven gerechtvaardigd zijn.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren proportioneel blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

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). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld).

De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: rechtvaardigt de doelstelling van het project "*Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection mouse model*", dat gericht is op het testen van nieuwe behandelmethoden voor longontsteking, de opoffering en het matige-ernstige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project bevestigend.

Hoewel de DEC-RuG het belang van de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergaan ongerief van de proefdieren, weegt het belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-RuG is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise en er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. Dit blijkt onder andere uit: 1) Het feit dat er goede go/no go en inclusiecriteria beschreven zijn. 2) Gedegen in vitro voorwerk dat het aantal te includeren dieren beperkt. 3) De fijnmazige welzijnsmonitoring m.b.v. lichaamstemperatuur sensors.

De DEC-RuG is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RuG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RuG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "*Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of Pseudomonas aeruginosa in lung infection mouse model*" als ethisch gerechtvaardigd en komt t.a.v. dit projectvoorstel tot een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de volgende voorwaarde op te nemen :

In de beginfase van de uitvoering moet er regelmatig terugkoppeling naar de IvD plaatsvinden aangaande ongerief en uitval.

2. Het uitgebrachte advies is kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

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*).

In eerste instantie wilde de aanvrager een aantal experimenten repliceren. Dit vond de DEC-RUG, zeker gezien de ongerief classificatie niet acceptabel, de aanvraag is gewijzigd op dit punt. Daarnaast waren er zorgen over het relatief hoge aantal dieren met ernstig ongerief. Overleg met de IvD en de beantwoording van vragen hierover door de aanvrager hebben deze zorg weggenomen.

De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



Centrale Commissie Dierproeven

8.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



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

AVD105002017854

Bijlagen

1

02 MRT 2017

Datum 1 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 2 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of Pseudomonas aeruginosa in lung infection mouse model" met aanvraagnummer AVD105002017854. 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 "Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of Pseudomonas aeruginosa in lung infection mouse model" starten. De vergunning wordt afgegeven van 2 maart 2017 tot en met 1 maart 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

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

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 februari 2017. 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. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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:
1 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017854

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Datum:
1 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017854

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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1 [REDACTED]

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 2 maart 2017 tot en met 1 maart 2022, voor het project "Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection mouse model" met aanvraagnummer AVD105002017854, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 2 februari 2017, ontvangen op 2 februari 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Lung imaging for drugs distribution study				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	210	15% Ernstig 85% Matig	
3.4.4.2. Lung infection model and treatment development.				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	3.010	15% Ernstig 85% Matig	

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 februari 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast

Aanvraagnummer:

AVD105002017854

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.

Voorschriften

Er moet regelmatig terugkoppeling naar de IvD plaatsvinden aangaande ongerief en uitval. In afstemming met de IvD wordt het ongerief zoveel mogelijk beperkt.



Aanvraagnummer:

AVD105002017854

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:

AVD105002017854

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

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