

Proefopzet : [REDACTED]

10.2.e
10.2.g

onderzoeksplan 5

1

Proefopzet	[REDACTED]	Auteur:	[REDACTED]
Creatie:	04-03-2013	Laatste wijziging:	22-05-2013
Status proefopzet:	Goedgekeurd	Status experiment:	Afgesloten

ALGEMEEN

Project

Projectnummer: [REDACTED]
Project titel: verbeterd kinkhoest
Projectleider(s): [REDACTED]
Startdatum project: 01-01-2013

Dierproef

Titel dierproef: CRM: bestuderen invloed temperatuur agarose en batch CD bij bereiding infectiemateriaal
Aard van de dierproef: 2-Onderdeel van een lopend project.
Dierproef behoort tot het onderzoek van het: IntraVacc
Lab/Unit/Afd: Intravacc
Geplande inzetdatum: 06-05-2013

Diernummers: 1-48
Duur dierproef: 3 weken
Doorlooptijd proefopzet Art. 9 1 jaar of minder

Art. 9 Vervanger: [REDACTED]
Art. 12: [REDACTED]
Medewerkers: [REDACTED]

Tijdschrijven op: [REDACTED]

VRAAGSTELLING**Project****Geef een beknopte samenvatting van de achtergrond van het project.**

Sommige vaccins beschermen niet levenslang; de bescherming van een vaccin kan in de loop van de jaren afnemen. Dit komt mede doordat de circulatie van de ziekteverwekkers na invoering van algemene vaccinatie is afgenomen. De weerstand tegen de betreffende infecties wordt daarom niet, zoals vroeger wel het geval was, op een natuurlijke manier geboosterd (opgepept) door incidenteel contact met de ziekteverwekker. Hierdoor kunnen individuen toch infecties oplopen waartegen zij in het verleden gevaccineerd zijn. We zien dat fenomeen van teruglopende immuniteit bij de vaccinaties tegen kinkhoest. Wel verloopt de ziekte bij mensen die als kind gevaccineerd zijn over het algemeen veel minder ernstig dan bij ongevaccineerden.

De belangrijkste oorzaken voor de toename van kinkhoest zijn wegebbende immuniteit en veranderingen (adaptaties) in de pathogeenpopulatie. RIVM onderzoek heeft aangetoond dat de kinkhoestbacterie populatie veranderd is na de introductie van vaccinatie waardoor er een mismatch is ontstaan tussen de circulerende stammen en de vaccinstammen betreffende het pertussis toxine (PtxSA2 → PtxSA1) en pertactine (Prn1 → Prn2). Een tweede verandering in de bacteriepopulatie betreft de opkomst van de ptxP3 stammen die meer pertussis-toxine produceren. P3-stammen zijn waarschijnlijk virulenter en beter in staat om de afweer te onderdrukken dan PtxP1 stammen uit de prevaccinatie periode (mutatie Ptx promotor). De P3-stammen hebben zich recentelijk over de wereld verspreid en zijn verantwoordelijk voor de explosieve toename van kinkhoest in Nederland en vermoedelijk ook in andere landen. Een derde verandering in de pathogeenpopulatie is pas recent opgetreden na de introductie van acellulaire kinkhoestvaccins (ACV: acellular vaccines). In Frankrijk zijn sinds 2003 stammen geïsoleerd die een of meer antigenen die onderdeel zijn van het kinkhoestvaccin niet meer produceren. Vooral een bepaalde ACV-component, pertactine, bleek frequent afwezig, namelijk in 7-10% van de circulerende stammen. In 2011 zijn deze escape-mutanten voor het eerst in Nederland gevonden. In dit jaar bleken 2 van de 10 onderzochte stammen geen pertactine te produceren. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat de opkomst van deze escape-mutanten de vaccineffectiviteit zullen verlagen.

Dit project heeft als doel te onderzoeken of vaccinatie gedreven pathogeen adaptatie van de kinkhoestbacterie een effect heeft op de werkzaamheid van de huidige kinkhoestvaccins en zo ja, hoe de huidige vaccins verbeterd kunnen worden zodat deze langdurig beschermen tegen kinkhoestinfectie en niet alleen tegen ziekte.

Welke concrete vraag / vragen wilt u met dit project beantwoorden?

- 1) Is de kruisbescherming door de huidige kinkhoestvaccins tegen opkomende nieuwe vaccin-escape kinkhoestmutanten voldoende om gevaccineerden langdurig te beschermen tegen ziekte?
- 2) Kan er een kinkhoestvaccin worden ontwikkeld dat langdurig beschermt en zo mogelijk niet alleen de ziekte maar ook de infectie bestrijdt? Draagt dit nieuwe type vaccin eraan bij dat het risico wordt verkleind dat de bacterie zich opnieuw aanpast aan het vaccin of nieuwe vaccinatiestrategie?

Wat is het maatschappelijk belang van het project?

Kinkhoest of pertussis wordt veroorzaakt door de humaan specifieke bacterie *Bordetella pertussis*. Sinds de laatste twee decennia stijgt het aantal kinkhoestinfecties in goed gevaccineerde bevolkingen zoals de Nederlandse. Massavaccinatieprogramma's met cellulaire kinkhoestvaccins (WCV: whole cell vaccines) en later ook ACV hebben de epidemiologie van kinkhoest veranderd van een klassieke kinderziekte in een ziekte die alle leeftijdsgroepen kan treffen behalve degenen die recentelijk zijn gevaccineerd. Kinkhoestinfecties in adolescenten en volwassenen zijn meestal a-symptomatisch of veroorzaken slechts milde ziekte, maar geïnfecteerde volwassenen kunnen de bacterie wel overdragen aan ongevaccineerden zoals baby's. Kinkhoestinfecties bij baby's is een ernstige ziekte met hoge morbiditeit en mortaliteit en dus een serieus probleem.

Wat is het wetenschappelijk belang van het project?

Pathogeen adaptatie van *B. pertussis* betreft zowel antigene als genetische mutaties van o.a. prn1 in prn2 en ptxA2 in ptxA1, als Ptx productie (ptxP1 in ptxP3; XXXXXXXXXX). Enerzijds is het goed mogelijk dat een verhoogde immuunmodulatie door vaccine-escape mutanten de effectiviteit van de vaccineïnduceerde "cellular memory immunity" (cellulaire geheugen) vermindert. Anderzijds kan de pathogeenadaptatie van de kinkhoestbacterie worden versneld door boosterimmunisaties, waardoor de vaccineffectiviteit ook op de korte termijn afneemt.

Onderzoek naar oorzaak en gevolg van kinkhoest pathogeenadaptatie is noodzakelijk om inzicht te krijgen of pathogeenadaptatie een effect heeft op de werkzaamheid van huidige kinkhoestvaccins en toekomstige vaccinkandidaten. Indien deze adaptatie een negatief effect heeft op de vaccineffectiviteit of beschermingsduur van de kinkhoestvaccins kan dit onderzoek aanwijzingen opleveren voor het verbeteren van de huidige generatie kinkhoestvaccins of bijdragen aan het ontwikkelen van een nieuwe generatie kinkhoestvaccins.

Gezien de beperkte beschermingsduur van de huidige WCV en ACV vaccins moeten nieuwe vaccinatiestrategieën worden ontwikkeld. Vermeden moet worden dat nieuwe of verbeterde kinkhoestvaccins een te smalle basis aan beschermende antigenen hebben of een suboptimale "memory immunity" induceren waardoor

alleen ziekte en niet de infectie wordt bestreden. Inzicht in het opwekken van lange termijn bescherming kan leiden tot een nieuwe generatie van geoptimaliseerde pertussis vaccins en vaccincomponenten (antigenen, hulpstoffen), immunisatie routes en vaccinatie schema's. Veel belovende kandidaten omvatten nieuwe vaccinconcepten zoals de levende verzwakte kinkhoestvaccin BPZE1 [REDACTED] en OMV vaccins, [REDACTED]. Deze vaccins, die intranasaal worden toegediend, induceren mogelijk een bredere, meer effectieve lange termijn bescherming. Nieuwe adjuvantia zouden de vaccingeïnduceerde immuunreacties effectiever richting de gewenste Th1 immuniteit kunnen sturen.

Dierproef

Welke concrete vraag / vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden?

Nieuw te ontwikkelen vaccins dienen te worden getest op hun mate van bescherming tegen kinkhoest. Het ontwikkelen van een goed voorspellend Coughing Rat Model (CRM) is gestart in 2008. Daarbij zijn onderzocht bij welke leeftijd van de ratten en met welke dosis er een goed verschil in ziekteverschijnselen kon worden vastgesteld als werd geïnfecteerd met stammen uit de prevaccinatie periode of met een stam uit de jaren 2000. Bij experiment [REDACTED] werd dit resultaat bereikt door ratten van 8 weken met een dosis van [REDACTED] cfu/rat in combinatie met agarose en Cyclodextrine (CD) intrabronchiaal te infecteren. In de volgende experimenten [REDACTED] en [REDACTED] kon dit resultaat onverwacht niet worden gereproduceerd. In dit experiment hopen we te kunnen achterhalen wat de minder goede resultaten van de laatste 2 rattenexperimenten heeft veroorzaakt.

De vraag is of de temperatuur bij de bereiding van de agarose/bacteriesuspensie en/of de kwaliteit van de toegevoegde batch CD een rol speelt bij het aanslaan van de infectie (duidelijke ziekteverschijnselen). Om de agarose vloeibaar te houden werd bij voorgaande experimenten steeds een temperatuur van [REDACTED] aangehouden. Deze temperatuur kan bij de minder goed verlopen experimenten hoger zijn geweest [REDACTED] dan voor het in goede conditie houden van de bacteriën is gewenst. Er is gebleken dat voor het vloeibaar houden van de agarose [REDACTED] ook mogelijk is. Deze temperatuur zal de kwaliteit van de bacteriën zeker niet negatief beïnvloeden. Voor dit experiment zal agarose in een goed gecontroleerd [REDACTED] op [REDACTED] of [REDACTED] worden gehouden voor het mengen met de bacteriesuspensie, waarna de tot nu gevolgde bereidingswijze van de suspensie en de daarop volgende infectieprocedure wordt uitgevoerd. Ook zal als controle met een bacteriesuspensie bij kamertemperatuur zonder agarose worden geïnfecteerd.

Cyclodextrine wordt toegevoegd om kolonisatie van de bacteriën en productie van Pertussis toxine te bevorderen. De zuiverheid van verschillende batches/merken CD komen niet overeen, dit is bepaald m.b.v. NMR en MS analyses. Een bij de "goede" experimenten gebruikte batch van Aldrich liet een spectrum zien zoals verwacht, een batch van Sigma (gebruikt bij de laatste twee experimenten) is duidelijk anders. In hoeverre de zuiverheid van CD van belang is voor het aanslaan van de infectie hopen we in dit experiment te kunnen achterhalen door batches van beide merken te vergelijken in combinatie met agarose van verschillende temperaturen. Als controle wordt ook een groep muizen geïnfecteerd met een suspensie zonder toevoeging van CD.

Geef aan waarom deze vraag dient te worden beantwoord met behulp van een dierproef en waarom middels het voorgestelde diemodel.

De [REDACTED] van de bacteriën die gebruikt worden bij infectie moet blijkbaar optimaal zijn om ziekteverschijnselen in de rat te induceren. Het precieze mechanisme (wat is daarbij belangrijk) is nog niet geheel bekend. Mogelijk veranderen de bacteriën in antigeensamenstelling of zijn ze vatbaarder voor het natuurlijke afweersysteem van de rat als de infectiesuspensie niet op de juiste manier en met de juiste toevoegingen wordt bereid. Deze vragen kunnen niet worden beantwoord zonder dit in de rat te testen.

Geef aan hoe de vraagstelling van de dierproef gerelateerd is aan de vraagstelling van het project.

Noem hierbij eventueel aannames die nodig zijn om het verband te leggen of relevante bevindingen van voorgaande proeven onder vermelding van bijbehorend proefopzetnummer.

Een goed reproduceerbaar model is van groot belang om te kunnen voorspellen of nieuwe vaccins een betere, bredere (tegen alle voorkomende stammen) bescherming zullen bieden dan de vaccins die tot nu toe in de mens zijn gebruikt [REDACTED]. Met dierproef [REDACTED] bereiken we het gewenste resultaat: een verschil in ziekteverschijnselen in de rat bij infectie met "oude" of "nieuwe" stammen. In twee vervolgsperimenten kon dit resultaat niet worden bevestigd doordat de infectie nauwelijks ziekteverschijnselen opwekte. Als we de kritische stappen in de bereiding van de bacteriesuspensie d.m.v. deze dierproef kunnen achterhalen, zullen we in de toekomst mogelijk kunnen beschikken over een reproduceerbaar diemodel waarin vaccins betrouwbaar kunnen worden getest.

Wetenschappelijke Toetsing

Deze dierproef is wetenschappelijk goed onderbouwd en een goedlopend kinkhoest diemodel is belangrijk voor het kinkhoestonderzoek naar nieuwe vaccins en kruisbescherming.

De onderzoekers identificeren drie mogelijke factoren waarom de voorgaande dierproeven niet reproduceerbaar zijn: bereidingstemperatuur van het infectiemateriaal, de batch cyclodextrine en de noodzakelijkheid van agarose (toedieningsprocedure).

In de proefopzet wordt gekeken naar de conditie van de bacterie bij een temperatuur van [REDACTED] en [REDACTED]. Is het

bekend welke bacterie componenten van belang zijn voor de conditie van de bacterie en in welke mate deze betrokken zijn bij kolonisatie/infectie? In het kader van 3V's: (1) is het mogelijk om vooraf in vitro te testen of de temperatuur invloed heeft op deze componenten, (2) is het mogelijk het batch verschil op basis van Pertussis toxine productie in vitro aan te tonen als eerste screening voorafgaand aan het dieren experiment en (3) het doel van het wel of niet toevoegen van agarose is in de proefopzet niet onderbouwd.

Er is het nog steeds geen internationale consensus welk antigeen welke rol heeft bij kolonisatie en op welk moment. (1,2) Dus hebben we voornamelijk gekeken naar de bereidings-, en bewaar temperatuur van het infectiemateriaal, en cyclodextrine batch verschillen op de Ptx-productie en groei van kinkhoestkweken. Hieruit is duidelijk geworden dat de bereiding van het infectiemateriaal een [REDACTED] effect heeft op de [REDACTED] van de bacteriën, maar daar is geen eenduidige oorzaak voor gevonden. Ptx productie van verschillen de CD batches is gelijk, terwijl de batches verschillen in longkolonisatie laten zien. Daarnaast, het vooraf testen van het infectiemateriaal heeft maar een beperkte voorspellende waarde omdat de in-vitro en in-vivo groeicondities totaal verschillen. (3) De noodzaak en het effect van agarose toevoegen aan de bacteriesuspensie is niet helemaal duidelijk. In experimenten waarbij we dit wilden testen is de infectie in geen van de groepen goed aangeslagen of is het experiment om andere redenen niet goed verlopen. Uiteraard zou het de procedure behoorlijk vereenvoudigen als agarose niet nodig is: de temperatuur van de bacteriesuspensie kan dan op [REDACTED] worden gehouden en heeft geen last van temperatuurwisselingen. Het inbrengen van de bacteriesuspensie zal zonder agarose ook reproduceerbaarder kunnen worden uitgevoerd. We hopen dus dat agarose niet nodig is voor een goede infectie, maar willen dat wel eerst aantonen.

Wat is de bijdrage van de leucocyten telling en wordt de onderzoeksvraag beantwoord bij een groepsgrootte van 6 dieren voor deze telling. Volgens de power analyse van data uit [REDACTED] zijn er n=21 dieren nodig voor een power van 50%. Gekozen is voor een groepsgrootte van 6 dieren. Bovendien is het doel van bloed samples op dag -7 niet duidelijk.

Voor dit experiment is longkolonisatie de belangrijkste parameter en wordt de leukocytose gebruikt ter bevestiging van het aanslaan van de infectie, daarom is voor 6 dieren gekozen.

Dag -7 samples worden afgenomen om te kunnen controleren of de dieren anti-bronchiseptica antilichamen hebben die kunnen interfereren met de kinkhoest infectie en om de normale waarde van het aantal leucocyten in het bloed vast te stellen in deze groep dieren. Dit kan per experiment variëren.

PROEFOPZET

Uit de antwoorden op de hieronder geformuleerde vragen dient duidelijk te worden dat deze proef de potentie heeft om de eerder geformuleerde vraagstelling van de dierproef te beantwoorden. Om de leesbaarheid te bevorderen dienen minder algemeen gebruikte afkortingen verklaard te worden.

Beschrijf de experimentele- en controlegroep(en) en de (be)handelingen die zij ondergaan.
dag -14, dag -7, dag 0, dag 1, dag 4 en dag 7: alle dieren wegen

dag -7 en dag 7: 0.2 ml EDTA-bloed afnemen van alle dieren voor leukocyten telling

dag 0: intra bronchiale infectie alle groepen XXXXXX ml suspensie B. pertussis stam XXXXXX (XXXXXX cfu) met de volgende toevoegingen:

groepnr	bereidingstemp agarose/bacteriesusp	lot/merk cyclodextrine	
1	XXXXXX	Sigma	
2	XXXXXX	Aldrich	
3	XXXXXX	geen	
4	XXXXXX	Sigma	
5	XXXXXX	Aldrich	
6	XXXXXX geen agarose	Sigma	
7	XXXXXX geen agarose	Aldrich	
8	XXXXXX (fys.zout)	geen	controle groep (niet geïnfecteerd)

dag 7: sectie alle dieren

- verbloeden; 0,2 ml bloed in EDTA buisje rest in stolbuis
- uitnemen longen: globaal beoordelen op pathologie en longen wegen
longen in buis met XXXXXX ml medium (voor bepaling hoeveelheid bacteriën in de longen)

Geef aan hoe de resultaten statistisch worden geanalyseerd.

Het geometrisch gemiddelde van gewichtsverlies (dag 1,4 en 7), leucocyten telling (dag -7 en 7) en aantal cfu's in de longen (dag 7) worden per groep vergeleken en significante verschillen worden berekend m.b.v. students Ttest of One-way ANOVA

Schets het 'experimental design' van de dierproef, zodat de essentie van de proefopzet duidelijk wordt.

Infectie gebeurt met bacteriesuspensie waarbij agarose is gemengd van XXXXXX (groep 1,2, 3) of agarose van XXXXXX (groep 4,5) of geen agarose (gr 6)

Bij groep 1, 4 en 6 is Cyclodextrine van Sigma, bij groep 2,5,7 Cyclodextrine van Aldrich en bij groep 3 is geen CD toegevoegd. Groep 8 is een controle groep die niet geïnfecteerd wordt om de normale toename in gewicht te monitoren.

Is voor de opzet van de proef overleg gepleegd met een statisticus? Zo ja, met wie? Zo nee, waarom niet?

Welke randomisatie maatregelen zijn er genomen t.a.v. groepsindeling en volgorde van experimentele handelingen? Indien geen maatregelen zijn genomen, geef aan waarom.

Bij binnenkomst worden de dieren gewogen en at random verdeeld over de groepen. Bij de handelingen is geen volgorde aangegeven omdat alle dieren met dezelfde dosis worden geïnfecteerd. De handelingen kosten weinig tijd en daarmee zal de volgorde de uitslag niet kunnen beïnvloeden.

Zijn er nevenfactoren, zoals verschil in huisvesting of verschil in behandelingstijdstippen tussen experimentele- en controle groep(en), die de behandelingseffecten ongewild zouden kunnen verstoren?
neen

Welke maatregelen zijn genomen om de aanwezigheid van nevenfactoren te voorkomen? Indien geen maatregelen zijn genomen, geef aan waarom.

Dieren worden per groep in een filtertop kooi gehuisvest. Er is verder geen aanleiding om te verwachten dat er nevenfactoren invloed op de resultaten zullen hebben.

Geef een motivatie voor het aantal dieren (bv. met behulp van een power-analyse).

Uit voorgaande experimenten is gebleken dat een aantal van 6 dieren per groep voldoende informatie geeft om groepsverschillen te kunnen meten.

Uit poweranalyses met data uit [REDACTED] (geslaagd experiment) zijn de volgende groepsgrootte berekend (alpha = 0.05 en power = 80 of 50%):

long cfu met power 80%: n = 6

WBC met power 50%: n = 21 (veel hyper en non-responders)

gewichtsverlies met power 80%: n = 4

Vat samen hoe u de vraagstelling van de dierproef denkt te kunnen beantwoorden met de voorgestelde proefomschrijving. Speculeer daarbij over mogelijke uitkomsten (bijvoorbeeld verhogend dan wel verlagend effect van de behandeling) en hoe elk van deze mogelijke uitkomsten antwoord geeft op de vraagstelling(en) van de dierproef.

Om Low Melting Temperature Agarose te kunnen gebruiken moet het vloeibaar blijven, bij voorgaande experimenten is een temperatuur van [REDACTED] aangehouden. Een te hoge temperatuur van agarose [REDACTED] bij het mengen met de bacteriesuspensie zou het verloop van de infectie negatief kunnen beïnvloeden: bacteriën gaan (sneller) dood of veranderen van antigene samenstelling. Daarnaast is bij de experimenten die minder goed zijn verlopen [REDACTED] een ander merk cyclodextrine gebruikt (Sigma) dan die bij het goed verlopen experiment [REDACTED] (Aldrich). De NMR en MS spectra van beide merken waren duidelijk verschillend: de batch van Sigma wijkt af van het verwachte spectrum.

Of de bereidingstemperatuur en/of de gebruikte batch CD werkelijk verschillen oplevert, kan worden bepaald door de betreffende groepen met elkaar te vergelijken. Als beide variabelen invloed hebben, zou groep 2 de beste resultaten moeten opleveren en groep 4 de minst goede. Als de temperatuur vooral bepalend is, zullen groep 4 en 5 minder goede resultaten moeten opleveren. Als het gebruik van agarose niet nodig is, maar een zuivere batch CD wel essentieel is voor een goed resultaat (duidelijke ziekteverschijnselen) zal groep 7 ook goede resultaten opleveren.

Geef tot slot een beknopte samenvatting van het doel van het project en de concrete vraag die met de dierproef beantwoord moet worden (maximaal 5 regels). Deze samenvatting wordt opgenomen in het DEC advies en in de jaarlijkse reportage van de DEC aan de Inspectie.

Om de verhoogde incidentie van kinkhoest terug te kunnen dringen, zijn er nieuwe vaccins in ontwikkeling. De werkzaamheid en eventuele bijwerkingen van deze vaccins dienen te worden getest in een goed voorspellend diermodel. Er is gebleken is dat bescherming van (nieuwe) kinkhoestvaccins tegen klinische kinkhoestverschijnselen niet goed in muizen kan worden getest. Het coughing rat model is een veelbelovend alternatief waarin zowel verschillen in ziekteverschijnselen als immuunresponsen kunnen worden bestudeerd. Met dit experiment willen we de infectieprocedure voor het coughing rat model verder optimaliseren: er wordt bepaald of de temperatuur bij toevoegen van agarose bij de bacteriesuspensie en/of de batch toegevoegde Cyclodextrine het verloop van de infectie beïnvloedt.

Bijzonderheden t.b.v. de wetenschappelijke toetsingscommissie (WTC)

geen

Bijzonderheden t.b.v. de dierexperimentencommissie (DEC)

geen

UITVOERING

Geef een overzicht van de experimentele handelingen ten behoeve van de uitvoering van de dierproef door biotechnici.

Het experiment wordt vooraf met de betrokken biotechnici doorgesproken, nadat er door hen een activiteitenlijst is gemaakt.

dag -14 (do):

- Ratten van 6 weken oud wegen, controleren of gewicht overeenkomt met de gegevens van de leverancier en bij afwijking dit z.s.m. melden bij de onderzoekers.
- At random verdelen over 8 groepen van 6 ratten en merken voor individuele herkenning (totaal 48 dieren)

dag -7 (do):

- 0.2 ml EDTA-bloed afnemen voor screening op (*B. Bronchiceptica*) antistoffen en leukocyten telling

dag 0 (do): ratten zijn 8 weken oud

- alle groepen wegen
- dieren volgens onderstaande tabel intrabronchiaal infecteren met XXXX ml suspensie XXXX cfu/ml van stam XXXX (een stam die geïsoleerd is in 2000)

cfu= colony forming units, CD= Cyclodextrine

groep	1	2	3	4	5	6	7	8
ratnr	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36	37-42	43-48
infectie (cfu)	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
bereidingstemperatuur agarose/bacteriesuspensie	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX	geen agarose XXXX	geen agarose XXXX	XXXX
batch CD	Sigma	Aldrich	geen	Sigma	Aldrich	Sigma	Aldrich	geen

dag 1 (vr):

alle dieren wegen

dag 4 (ma):

alle dieren wegen

dag 7 (do):

sectie alle groepen

- wegen
- verbloeden: 0,2 ml bloed in EDTA buisje, rest in stolbuis
- uitnemen longen: globaal beoordelen op pathologie en longen wegen (zonder trachia)
longen in buis met XXXX ml medium (voor bepaling hoeveelheid bacteriën in de longen)

humane eindpunt: contact met onderzoekers opnemen bij ernstige benauwdheid en gewichtsverlies van meer dan 15% t.o.v. controle groep 8. Euthanasie van het dier naar aanleiding van gewichtsverlies en algemene constitutie van het dier in overleg met onderzoeker

WTC (Wetenschappelijke Toetsing Commissie)

Discussie wetenschappelijke toetsing:

DIEREN

Diersoort: rat

Stam	Hsd:Sprague Dawley®™SD® ™			
Geslacht	Vrouwelijk			
Aantal	48			
Leeftijdswa- range (weken)	6			
Gewichtswa- range (grammen)				
Microb. status	spf			
Herkomst	Harlan-Italië			
Locatie	XXXXXXXXXX			
Kooitype	filtertop			

Geslacht**Wanneer u voor één geslacht kiest, graag motiveren waarom voor dit geslacht is gekozen?**

Tot nu toe zijn steeds vrouwelijke dieren gebruikt. Gewichtsverlies na infectie is een belangrijk aanwijzing dat de infectie aanslaat, de gewichten van mannelijke dieren liggen duidelijk hoger en kunnen dus niet worden vergeleken met die van vrouwelijke dieren.

Speciale wensen t.a.v. de proefdieren:

De leeftijd van de dieren is in deze experimenten belangrijker dan gewicht. Op het moment van infectie dienen de dieren 8 weken oud te zijn.

MKB (Microbiologisch kwaliteitsbeheer)**Herkomst:**

Zijn de dieren herkomstig uit een ander dierproef?: Nee

Verplaatsing:

Worden de dieren tijdens de dierproef verplaatst naar een andere locatie?: Nee

Micro-organismen:

Worden in het kader van de dierproef micro-organismen ingebracht?: Ja

Volledige naam micro-organisme?: Bordetella Pertussis

Levend of gedood micro-organisme?: Levend

Klasse biologische agentia volgens ARBO besluit 2005: Klasse 2

Is er sprake van een Genetisch Gemodificeerd Micro-Organisme?: Nee

Biologisch materiaal:

Wordt er in het kader van de dierproef biologisch materiaal ingebracht?: Ja

Wat voor een materiaal (+ event. code)? : B.pertussis (levend)

Bijzonderheden t.b.v.MKB:

intra-bronchiale infectie in Biohazard-kast, dieren huisvesten in filtertopkooien

AGENTIA

Stofnaam	Chemisch/Biologisch materiaal?	Klassificatie
Bordetella Pertussis	Biologisch	risico klasse 2

1. Welke maatregelen zijn er te nemen ter bescherming persoon en omgeving?

Intra-bronchiale infectie met kinkhoestbacterien wordt in Biohazard kast uitgevoerd

Dieren worden gehuisvest in filtertop kooien, 6 ratten per kooi

2. Vindt er uitscheiding plaats via urine, faeces, longen, bloed of haar? Ja

Zo ja, via wat en hoelang?(dagen) longen, ca. 1 week

3. Welke maatregelen moeten er genomen worden bij besmetting huid, ogen of prikaccident?

huid deppen met 5% glycerol/80% ethanol, ogen met water spoelen, bij prikaccident geen actie

4. Welke maatregelen moeten er genomen worden bij morsen op kleding, vloer, tafel, etc. ?

decontamineren met 70% ethanol

5. Hoe moet de stof zelf, gecontamineerde bedding en kadavers afgevoerd worden?

destructie

WELZIJN**Beschrijf en kwantificeer de aard van het ongerief**

Wanneer men het ongerief niet goed kan inschatten, raadpleeg de proefdierdeskundige

Ongerief per (bio)technische handeling incl. de gevolgen daar van

Handeling	Aard van het ongerief	Mate ongerief	Duur ongerief	Kans ongerief
intra-bronchiale infectie	pijn, benauwdheid?	matig	onbekend	100%
bloedafname	pijn	gering	2 min	100%

Ongerief door andere omstandigheden dan strikt de experimentele handelingen

Omstandigheid	Aard van het ongerief	Mate ongerief	Duur ongerief	Kans ongerief

Gecumuleerd risico op ongerief voor het hele experiment / per experimentele groep

alle groepen worden geïnfecteerd	100%
----------------------------------	------

Anesthesie:

Worden de dieren tijdens de dierproef onder anesthesie gebracht?

Ja

Geef een specificatie van de anesthesie die wordt gebruikt per dierexperimentele handeling.

	Anesthesie keuze		Handeling(en)
1	isofluraan in O ₂	voor	bloedafname
2	isofluraan in O ₂	voor	intra-bronchiale infectie
3	ketamine + medetomidine	voor	sectie
4		voor	
5		voor	

Analgesie:

Zullen dieren als gevolg van de dierproef pijn ondervinden?: Onbekend

Gebruikt u een analgeticum?: Nee

Kooiverrijking:

Kooiverrijking wordt standaard toegepast! Is er bezwaar tegen toepassing van kooiverrijking? Nee

Individuele huisvesting:

Moeten de dieren individueel gehuisvest worden? Nee

Klinische Effecten:

Verwachte klinische effecten (gedetailleerd beschrijven a.u.b.):

Bij optreden van klinische kinkhoest zoals dat bij de mens voorkomt, kunnen er na de infectie in eerste instantie "griepachtige" verschijnselen zijn, na ca. 1 week kunnen hoesten/niezen en mogelijk benauwdheid optreden

In geval van meer dan matig ongerief, wat zijn de humane eindpunten?

ernstige benauwdheid en gewichtsverlies van meer dan 15% t.o.v. onbehandelde dieren van dezelfde leeftijd

Euthanasie:

Worden de dieren gedurende of aan het eind van de dierproef gedood? Ja

Geef een specificatie van de euthanasiemethode: Verbloeden

Gebeurt euthanasie onder anesthesie?: Ja

Geef een specificatie van de anesthesiemethode: ketamine + dexmedetomidine

Bijzonderheden:

Bijzonderheden t.b.v. art. 14

Dit experiment heeft mede tot doel aan te tonen dat de intra-bronchiale challenge met zorgvuldig bereide agarose beads (goede controle op temperatuur bij het mengen met de bacteriesuspensie) meer klinische en immunologische effecten oplevert dan infectie met agarose die te hoog van temperatuur was (XXXXXX) bij het mengen. Tevens wordt het effect van toevoegen van Cyclodextrine bestudeerd (2 batches worden vergeleken)

3 V'S

Geef aan waarom deze vraag dient te worden beantwoord met behulp van een dierproef en een dierproef-vrije aanpak niet mogelijk is.

De XXXXXXXXXX van de bacteriën die gebruikt worden bij infectie moet blijikbaar optimaal zijn om ziekteverschijnselen in de rat te induceren. Het precieze mechanisme (wat is daarbij belangrijk) is nog niet geheel bekend. Mogelijk veranderen de bacteriën in antigeensamenstelling of zijn ze vatbaarder voor het natuurlijke afweersysteem van de rat als de infectiesuspensie niet op de juiste manier en met de juiste toevoegingen wordt bereid. Deze vragen kunnen niet worden beantwoord zonder dit in de rat te testen.

Vindt er momenteel door u of door andere groepen onderzoek plaats naar mogelijkheden voor vervanging

van proefdieren ter beantwoording van uw onderzoeksvraag?. (Voor zover dit elders gebeurt geef literatuurreferenties)

Welke maatregelen zijn genomen ter vermindering en verfijning van het proefdiergebruik?
poweranalyse op meerdere parameters

CODERING

Bijzonderheid dier:	1. Gewoon dier
Herkomst en hergebruik dieren:	1. Gereg.fok/toelevering in Nederland
Doel van de proef:	1. Mens-ontw. sera vacc./biol.product.
Belang van de proef:	1. Gezondheid/Voed. Ja
Wettelijke bepalingen:	1. Geen wettelijke bepalingen
Toxicologisch onderzoek, incl. veiligheidsonderzoek:	1. Geen toxicologisch onderzoek
Bijzondere technieken:	12. Opwekk. van ontstekingen (anders dan 3 t/m10)
Anesthesie:	4. Is wel toegepast
Pijnbestrijding, postoperatief of op ander tijdstip:	2. Is niet toegepast (onverenigbaar proef)
Mate van ongerief:	2. Gering/matig

Aantal Dieren:	Mate van ongerief:

Toestand dier na eind proef: 1. Dood in de proef/dood na de proef

BIJLAGEN

ADDENDUM

AUTORISATIE HISTORIE

(4/24/2013 5:30:14 PM) Goedgekeurd door Artikel 12 functionaris [REDACTED]

(13-5-2013 10:46:44) Goedgekeurd door Artikel 9 functionaris [REDACTED]

(22-5-2013 9:12:55) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]

(6/5/2013 2:51:24 PM) Goedgekeurd door A14 functionaris [REDACTED]

(7-6-2013 15:23:23) Goedgekeurd door BVF functionaris [REDACTED]

(26-6-2013 11:41:32) Goedgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED] met de volgende opmerkingen.
Opmerkingen: Akkoord [REDACTED] : mail 26-6-2013

(27-6-2013 16:35:47) Positief advies gegeven door DEC functionaris [REDACTED] met de volgende opmerkingen.
Opmerkingen: Tijdens de plenaire vergadering van 6 juni 2013 hebben de leden van de DEC de volgende vragen/opmerkingen geformuleerd:

1. Bekend is dat agarose smelt bij een temperatuur van ca. [REDACTED] graden celsius. De DEC heeft tijdens de vergadering de suggestie gedaan om te kijken of het mogelijk is om de temperatuur van de agarose na verwarming tot bijvoorbeeld [REDACTED] graden, een aantal graden te laten zakken zonder dat het stolt. Hierdoor is het wellicht mogelijk om de bacteriën bij een veel lagere temperatuur (bijvoorbeeld tussen de [REDACTED] en de [REDACTED] graden) toe te voegen.
2. De onderzoekers hebben tijdens de vergadering aangegeven, dat dit experiment beslissend kan zijn voor de vraag of zij verder gaan met het Coughing Rat Model. De DEC is het er mee eens dat dit experiment tot de conclusie zou kunnen leiden dat er geen sprake is van een bruikbaar diemodel, omdat het niet lukt om het op een reproduceerbare wijze te induceren. De DEC zou daarom graag na afloop van het experiment geïnformeerd worden over de resultaten en over de toekomst van dit diemodel.

AUTORISATIE**Verantwoordelijke Art 12 functionaris:**

(4/24/2013 5:30:14 PM) Goedgekeurd door Artikel 12 functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:**Verantwoordelijke onderzoeker (Art. 9)**

Naam: [REDACTED]

Vervanger: [REDACTED]

(13-5-2013 10:46:44) Goedgekeurd door Artikel 9 functionaris [REDACTED]

WTC Autorisatoren:**Opmerkingen:****Offerte Autorisatoren:**

(26-6-2013 11:41:32) Goedgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED]

Bestelnummer: OK

Opmerkingen:

Akkoord [REDACTED] : mail 26-6-2013

MKB Autorisatoren:

(22-5-2013 9:12:55) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

BVF Autorisatoren:

[REDACTED]
(7-6-2013 15:23:23) Goedgekeurd door BVF functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

Art. 14 Autorisatoren:

(6/5/2013 2:51:24 PM) Goedgekeurd door A14 functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

DEC Autorisatoren:

(27-6-2013 16:35:47) Positief advies gegeven door DEC functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

De onderzoekers hebben op 27 juni 2013 als volgt geantwoord:

Bedankt voor de tip over de smelttemperatuur van de agarose, dat gaan we uitproberen.

En zodra we alle resultaten van dit experiment binnen hebben, zullen we jullie schriftelijk informeren over de uitkomst van dit experiment.

Op 27 juni 2013 heeft het secretariaat van de DEC het volgende antwoord geformuleerd:
Het secretariaat van de DEC acht de opmerkingen voldoende adequaat beantwoord. Onder de voorwaarde dat de eventuele wijzigingen van het experiment middels een addendum aan de commissie kenbaar gemaakt worden, concludeert de DEC dat er geen zwaarwegende bezwaren bestaan tegen het afgeven van een positief advies voor de uitvoering van het onderhavige experiment.