

Proefopzet	[REDACTED]	Auteur:	[REDACTED]
Creatie:	14-03-2013	Laatste wijziging:	16-05-2013
Status proefopzet:	Goedgekeurd	Status experiment:	Afgesloten

ALGEMEEN**Project**

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

Dierproef

Titel dierproef: Voorbereiding op pre-klinisch RSV; mate van replicatie en shedding van prototype RSV vaccin in katoenratten
Aard van de dierproef: 2-Onderdeel van een lopend project
Dierproef behoort tot het onderzoek van het: IntraVacc
Lab/Unit/Afd: Intravacc
Geplande inzetdatum: 24-06-2013

Diernummers: 1-52
Duur dierproef: 7 dagen
Doorlooptijd proefopzet 1 jaar of minder

Art. 9**Art. 9 Vervanger:** [REDACTED]**Art. 12:** [REDACTED]**Medewerkers:** [REDACTED]**Tijdschrijven op:** [REDACTED]

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

Op basis van de notities: "Naar een Vaccinatieprogramma voor Nederland in de 21ste eeuw" en de "Vaccinonderzoeksnota", waarin de hoge door RSV veroorzaakte ziektelast bij baby's wordt beschreven, is het [REDACTED] in 2000 gestart met de ontwikkeling van een vaccin tegen RSV. Inmiddels is ook in het RIVM rapport 210021002/2005, "The national immunisation programme in the Netherlands" aanbevolen een vaccin tegen RSV, zodra beschikbaar, op te nemen in het RVP. Onderzoek naar de ontwikkeling van een vaccin tegen RSV was ingebed binnen de afdeling [REDACTED] (sinds 1 januari 2011 ondergebracht bij [REDACTED] afdeling [REDACTED]) maar wordt sinds 1 januari 2013 voortgezet bij [REDACTED] van [REDACTED].

RSV is de meest voorkomende ziekteverwekker bij jonge kinderen die in een ziekenhuis opgenomen worden met een acute luchtweginfectie. Wereldwijd is het de meest voorkomende verwekker van pneumonie bij (m.n. jonge) kinderen. Dit heeft geleid tot het besluit [REDACTED] om een geschikt vaccin tegen humaan-RSV te ontwikkelen. Recent is geschat dat onder de 0-1 jarigen in Nederland gemiddeld per jaar 28.738 huisartsbezoeken, 1623 ziekenhuisopnamen en 4,5 sterfgevallen optreden vanwege RSV. Naast de directe ziektelast is ziekenhuisopname door RSV-infectie ook geassocieerd met latere problemen met de luchtwegen en wellicht ook met het ontwikkelen van astma en andere luchtwegallergie. Daarnaast is er aanzienlijk arbeidsverzuim van ouders/verzorgers. Recent is duidelijk geworden dat RSV ook een belangrijke ziekte- en doodsoorzaak vormt bij volwassenen met gezondheidsrisico's en bij ouderen. Er zijn nog geen harde data in Nederland, maar de ziektelast onder de 65+ bevolking wordt geschat op 1200 ziekenhuisopnames en 550 sterfgevallen gemiddeld per jaar. Afhankelijk van de effectiviteit kan een RSV vaccin een aanzienlijk deel van genoemde ziekenhuisopnamen en sterfte voorkomen bij kinderen en ouderen.

In het oorspronkelijke projectplan, opgesteld in samenwerking met toenmalig partner [REDACTED] is de RSV vaccinontwikkeling verdeeld in vier fasen:

- I. Haalbaarheidsfase: in deze fase wordt vastgesteld of het mogelijk is de componenten voor de productie van een veilig en effectief RSV-vaccin te produceren.
- II. Pre-klinische fase: in deze fase worden de biologische, toxicologische en immunologische eigenschappen van het kandidaatvaccin vastgesteld in een diemodel. Het vaccin wordt eerst als prototype op pilot-schaal geproduceerd en vervolgens vanuit seed-lots onder GMP. Tevens wordt in deze fase bepaald welke opslagcondities mogelijk zijn ten aanzien van de gewenste vaccinformulering.
- III. Klinische fase: omvat alle activiteiten m.b.t. klinische trials.
- IV. Markt introductie fase: alle activiteiten om het vaccin op de markt te krijgen, incl. registratie en eventuele postmarketing surveillance.

De haalbaarheidsfase wordt sinds 2000 uitgevoerd binnen het [REDACTED]-project (PO [REDACTED]) dat in 2011 en 2012 bij [REDACTED] is voortgezet.

De (voorbereiding op de) pre-klinische fase wordt onder hetzelfde project ([REDACTED]) vanaf 2013 uitgevoerd bij [REDACTED].

Binnen dit project staan twee vragen centraal:

a) kan beschermende immuniteit middels vaccinatie worden opgewekt (ook in de aanwezigheid van maternale antistoffen)

b) wat is de rol van de immuunrespons na infectie en vaccinatie in de pathogenese.

Voor het beantwoorden van deze vragen is een infectiemodel in proefdieren noodzakelijk. Binnen de ontwikkeling van een diemodel wordt gestreefd naar een uitleessysteem dat zo goed mogelijk bij de humane situatie aansluit in het bijzonder wat betreft infectieroute en pathogenese. Op grond van literatuuronderzoek is gekozen voor het infectiemodel in de katoenrat. Voor dit diemodel zijn experimentele infecties en therapieën beschreven, waarbij zowel RSV-replicatie als antistofontwikkeling optreden. De longen van de katoenrat vertonen na een [REDACTED]-RSV immunisatie en [REDACTED] RSV challenge een vergelijkbaar pathologisch beeld met dat van de mens (exp. [REDACTED] en [REDACTED]). Intranasale toediening van humaan RSV in [REDACTED] leidt bij dit proefdier tot infectie van zowel bovenste als onderste luchtwegen en het virus is ook terug te kweken uit de long. Uit eerdere experimenten blijkt dat na toedienen van virussuspensie in klein volume [REDACTED] de lagere luchtwegen niet worden bereikt en het virus blijft "hangen" in de hogere luchtwegen (neusholte), het is de bedoeling hiermee de gewenste situatie in de mens (intra nasale spray) na te bootsen. In experiment [REDACTED] is de in vivo replicatie vergeleken tussen lab stam RSV-[REDACTED], wild type RSV [REDACTED] (V23) en [REDACTED] rRSV [REDACTED]. Hier werden na toediening van [REDACTED] intra nasaal tijdens de piek van de infectie op dag 5 na toediening, geen verschillen gevonden tussen de lab stam RSV [REDACTED] en wild type RSV [REDACTED] (max. [REDACTED] long, overeenkomend met literatuurgegevens), de recombinant RSV [REDACTED] (V23) was [REDACTED] geattenuëerd (max [REDACTED] long) en de [REDACTED] rRSV [REDACTED] (V24) hebben we met de beschikbare technieken niet terug kunnen kweken ([REDACTED] long), ook niet op dag 3 of dag 7. De infectie zelf lijkt in dit model gering ongerief op te leveren (exp. [REDACTED]). Voor inductie van bescherming tegen challenge virus replicatie in de long is [REDACTED].

het van belang dat het virus infectieus is; in experiment [REDACTED] is aangetoond dat bescherming tegen challenge virus replicatie niet geïnduceerd kan worden met BPL geïnactiveerd vaccin virus, dit geldt ook voor rRSV- [REDACTED] (V24). In [REDACTED] (i.n.) en [REDACTED] (i.n.) is gevonden dat dieren beschermd zijn tegen challenge virus replicatie in de long na eenmalige intranasale immunizatie met [REDACTED] RSV- [REDACTED] of [REDACTED] RSV (V24). Waarbij in een eerder experiment [REDACTED] is aangetoond dat voor bescherming minimaal [REDACTED] RSV (V23) of [REDACTED] V24) nodig is. Vervolgens hebben we het kandidaat virus vacci [REDACTED]

Resultaat is een virus dat er [REDACTED]

In proef [REDACTED] is bescherming geïnduceerd door het [REDACTED] vergeleken met [REDACTED]. Het [REDACTED] vaccin geeft bij dezelfde dosis een vergelijkbare tot betere bescherming tegen challenge virus replicatie in de long dan het [REDACTED]. Deze resultaten hebben geleid tot een keuze voor het [REDACTED] als prototype vaccin.

Deze dierstudie zal worden uitgevoerd met gezuiverde virussen die volgens het [REDACTED] proces zijn vervaardigd en geformuleerd.

De mock controle zal met dezelfde formulering worden behandeld echter zonder virus.

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

Is het mogelijk een levend verzwakt vaccin te ontwikkelen tegen respiratoir syncytieel virus (RSV), geschikt voor intra nasale toediening bij jonge kinderen (neonaten) en op te nemen in het RVP.

Wat is het maatschappelijk belang van het project?

RSV is de meest voorkomende ziekteverwekker bij jonge kinderen die in een ziekenhuis opgenomen worden met een acute luchtweginfectie. Afhankelijk van de effectiviteit kan een RSV vaccin een aanzienlijk deel van genoemde ziekenhuisopnamen en sterfte voorkomen. Binnen de WHO wordt de ontwikkeling van een vaccin tegen RSV gezien als een speerpunt i.v.m wereldwijde ziektelast.

Wat is het wetenschappelijk belang van het project?

Onderzoeken of het attenueren van RSV, middels het [REDACTED], een haalbare strategie is voor het ontwikkelen van een veilig levend geattenuerd virus vaccin voor intranasale toediening bij zeer jonge kinderen.

Dierproef

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

Wij willen in dit experiment de infectie, replicatie (mate van mogelijke uitscheiding via de neus) en infectie pathologie in longen van katoenratten onderzoeken voor het prototype RSV [REDACTED] vaccin en dat vergelijken met wild type RSV en RSV [REDACTED]. Tot nu toe zijn na intra-nasale (challenge) infectie met [REDACTED] RSV virus titers in katoenrat longen teruggevonden die overeenkomen met wat er in de literatuur is beschreven. Het [REDACTED] RSV is zo zwaar geattenuerd dat er op basis van eerdere experimenten [REDACTED] met [REDACTED] rRSV-X [REDACTED] virus verrijkt PEG pellet) vanaf dag 3 geen virus is terug gevonden met CCID50 bepaling op longmateriaal. Mogelijk is er in een eerder stadium (dag1, dag 2) en met gevoeliger technieken (Q-PCR) wel virus aantoonbaar. Wij willen verder onderzoeken wat het effect is van complementatie op infectie, replicatie en infectie pathologie.

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

Het is niet mogelijk om replicatie (in long en neus) van intranasaal toegediend virus in vitro te bestuderen. Het katoenratmodel is gekozen op basis van onze ervaringen binnen dit project en literatuur onderzoek waar uit blijkt dat katoenratten gevoelig zijn voor humaan-RSV. Met name de replicatie van wild type RSV zullen we vergelijken met literatuurgegevens. Voorafgaand aan het mogen uitvoeren van klinische studies is pre klinisch onderzoek in een geschikt diermodel verplicht. Deze dierproef is een voorbereiding op de pre klinische fase met materiaal dat op vergelijkbare wijze is geproduceerd en gezuiverd als dat voor het klinische traject zal gaan gebeuren.

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.

De doelstelling van het project is het ontwikkelen van een veilig vaccin dat bescherming tegen RSV infectie van de lagere luchtwegen biedt. Bij het ontwerp van dit vaccin is er vanuit gegaan dat er na één infectie ronde voor het induceren van bescherming geen verdere replicatie en verspreiding plaats kan vinden. In deze proef zal worden onderzocht of deze theorie klopt en of dit voor het prototype RSV [REDACTED] vaccin het geval is.

In experiment [REDACTED] is de in vivo replicatie vergeleken tussen lab stam RSV [REDACTED], wild type RSV [REDACTED]

rRSV- [REDACTED] (V23) en [REDACTED] rRSV- [REDACTED] (V24) waar na toediening van [REDACTED] ul intra nasaal tijdens de piek van de infectie (op dag 5 na toediening) geen verschillen zijn gevonden tussen de lab stam RSV [REDACTED] en wild type RSV [REDACTED] (max. [REDACTED] long, overeenkomend met literatuurgegevens), de recombinant [REDACTED] RSV [REDACTED] (V23) was [REDACTED] geattenuëerd (max. [REDACTED] long) en de [REDACTED] rRSV [REDACTED] (V24) hebben we met CCID50 bepaling in virus titratie destijds niet terug kunnen kweken ([REDACTED] long), ook niet op dag 3 of dag 7. Er zal nu naast CCID50 bepaling o.b.v CPE ook met de gevoeliger Q-PCR naar de aanwezigheid van RSV worden gekeken. De infectie zelf lijkt in het katoenratmodel gering ongerief op te leveren (exp. [REDACTED]). Voor inductie van bescherming tegen challenge virus replicatie in de long is het van belang dat het virus infectieus is; in experiment [REDACTED] is aangetoond dat bescherming tegen challenge virus replicatie niet geïnduceerd kan worden met BPL geïnactiveerd vaccin virus, dit geldt ook voor het geattenuëerde [REDACTED] rRSV- [REDACTED] (V24) . Mogelijk is de in vivo aanwezigheid van infectieus [REDACTED] rRSV- [REDACTED] (V24) wel in een eerder stadium (dag 1 of 2) aan te tonen, dit is niet eerder onderzocht. In dit experiment zal naast CCID50 bepaling middels virus titratie ook gebruik gemaakt worden van Q-PCR, zodat met grotere gevoeligheid de aanwezigheid van virus in de longen en neusspoelingen aangetoond kan worden waarbij ook de mogelijkheid bestaat te discrimineren tussen virus [REDACTED] in het genoom. Tevens zal middels histopatologisch onderzoek van de longen worden onderzocht in hoeverre de virussen zelf infectie pathologie veroorzaken. De mock groep is de negatieve controle en de wild type RSV- [REDACTED] groep de positieve controle zowel voor virus replicatie als longpathologie. Er wordt in dit experiment van korte duur weinig tot geen antistofontwikkeling verwacht. Er zal derhalve geen bloed voor nul sera worden afgenomen maar wel serum van de verbloeding worden opgeslagen.

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.
Alle groepen ondergaan dezelfde behandelingen, zie tabellen bij experimental design.

mock = negatieve controle groep op afwezigheid van virus en infectie pathologie

[REDACTED] RSV = experimentele groep; weinig tot geen virus verwacht, tevens controle groep op het [REDACTED]

[REDACTED] RSV = experimentele groep, mogelijk aanwezigheid van [REDACTED] RSV [REDACTED]

[REDACTED] SV- [REDACTED] = positieve controle groep voor replicatie en infectie pathologie.

Geef aan hoe de resultaten statistisch worden geanalyseerd.

Statistical analysis will be performed on the results of the virology and histopathology. The data will first be analyzed for normal distribution. When differences between groups will be analysed, the samples will be considered as unpaired. However when the difference before and after treatment within a group will be studied the samples will be considered as paired. When the data are normally distributed an independent t-test or one way ANOVA will be used for the unpaired samples and a repeated measures ANOVA for the paired samples. When the data are not normally distributed a Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis test will be used for the unpaired samples and a Wilcoxon T test for paired samples. All groups will be analysed against the control group for significant differences.

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

Met name voor de sectie op dag 1 en 2 is het van belang dat de tijd tussen het toedienen van virus en sectie voor alle groepen vergelijkbaar is.

Het is daarom van belang te noteren op welk tijdstip de dieren op dag 0 zijn behandeld en er naar te streven de secties op hetzelfde (+/- 1 uur) uit te voeren. Een replicatie ronde van virus duurt ongeveer 8 uur, door de tijden op elkaar af te stemmen krijgen alle virus even veel kans zich te vermeerderen. Omdat toedienen minder tijd kost dan sectie kunnen de dieren op dag 0 op volgorde van diernummer worden behandeld dus beginnen met mock en eindigen met wild type waarbij er dus 4 dieren mock en 16 dieren per type virus worden behandeld. Bij de sectie worden vier dieren per virus per dag behandeld. Als wordt verwacht dat er voor 4 dieren sectie meer tijd nodig is dan voor 16 dieren toediening, op dag 0 pauzes inlassen tussen het toedienen van de preparaten.

- *aankomst* dieren identificeren via kooinummers met groeps- en diernummer.
- *verdeling* individueel huisvesten in macrolon bakken type III onder filtertop.
- *acclimatisering* minimaal 3 hele dagen, liever een week.

Actie

tijdstip

toelichting

Controle

dagelijks

Dagelijks controleren op algemeen welbevinden.

Anesthesie

dag 0

dag 1,2,5,7

Gasanesthesie met isofluraan, voorafgaand aan infectie en voorafgaand aan sectie

W
e
g
e
n

d
a
g
0
d
a
g
1

,
2
,
5
,
7

Voorafgaand aan infectie
voorafgaand aan sectie

infectie

dag 0

infectie wordt onder anesthesie intranasaal uitgevoerd voor dieren met 100 µl infectieuze oplossing (50 µl per neusgat).

De toediening geschiedt vanuit een suspensie met een automatische pipet. Per groep 1 ampul à 500 µl, restant retour.

Begin met mock, eindig met wild type, werk op volgorde van diernummer en noteer de tijd.

E
u
t
h
a
n
s
i
e

b
i
j
s
e
c
t
i
e

Isofluraan anesthesie gevolgd door KX (ketamine/xylazine) injectie waarna dieren worden verbloed .Ook bij niet geplande euthanasie worden de dieren na anesthesie onder KX verbloed.

Na euthanasie wordt sectie verricht, per groep op zelfde tijdstip (+/- 1uur) als de toedining op dag 0.

sectie dag 1 groep 2+6+10

sectie dag 2 groep 3+7+11

sectie dag 5 groep 1+4+8+12

sectie dag 7 groep 5+9+13

Groep N = 4	Dier #	[REDACTED] Infectie 100ul in. 50ul/neusgat [REDACTED]		sectie			
		Dag 0 (wo)		Dag 1 (do)	Dag 2 (vr)	Dag 5 (ma)	Dag 7 (wo)
1	#01-04	mock		-	-	Groep 1 - #01-04	-
2	#05-08	[REDACTED] RSV		Groep 2 - #05-08	Groep 3 -	Groep 4 -	Groep 5 -
3	#09-12	[REDACTED] proces		-	- #09-12	-	-
4	#13-16			-	-	- #13-16	-
5	#17-20			-	-	-	- #17-20
6	#21-24	[REDACTED] RSV		Groep 6 - #21-24	Groep 7 -	Groep 8 -	Groep 9 -
7	#25-28	[REDACTED] proces		-	- #25-28	-	-
8	#29-32			-	-	- #29-32	-
9	#33-36			-	-	-	- #33-36
10	#37-40	[REDACTED] RSV		Groep 10 - #37-40	Groep 11 -	Groep 12 -	Groep 13 -
11	#41-44	[REDACTED] proces		-	- #41-44	-	-
12	#45-48			-	-	- #45-48	-
13	#49-52			-	-	-	- #49-52

Bij sectie worden de volgende acties genomen:

- onder anesthesie wegen van de dieren
- onder KX verbloeden - stol-bloed (voor serum) verzamelen
- inspectie op macroscopische afwijkingen
- verzamelen en bewerken van organen volgens tabel

orgaan

doel

handeling

neusholte

virus isolatie

spoelen met neus vloeistof 2ml

rechter long

virus isolatie

overbrengen in lege buis

linker long

histopathologie

opsprengen met formaline

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.

Alle dieren zijn afkomstig uit de eigen fok.

Dieren worden na verspenen individueel gehuisvest waardoor gerichte selectie van man, vrouw en leeftijd mogelijk is.

Bij het indelen van de groepen wordt gerandomiseerd voor leeftijd en geslacht

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

Verskil in behandelingstijdstip van toediening en sectie kan er toe leiden dat er verschillen in replicatie rondes op kunnen treden.

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

Met name voor de sectie op dag 1 en 2 is het van belang dat de tijd tussen het toedienen van virus en sectie voor alle groepen vergelijkbaar is.

Het is daarom van belang te noteren op welk tijdstip de dieren op dag 0 zijn behandeld en er naar te streven de secties op hetzelfde tijdstip (+/- 1 uur) uit te voeren. Een replicatie ronde van virus duurt ongeveer 8 uur, door de tijden op elkaar af te stemmen krijgen alle virussen even veel kans zich te vermeerderen.

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

Voor de virustiters zijn aan de hand van resultaten van eerdere experimenten gemiddelden en standaard deviaties te berekenen. De noodzaak voor het inzetten van 4 dieren per groep in dit experiment van korte duur is berekend volgens een power analyse onder de condities;

Power : 0.8

Alpha: 0.05

berekend met sample size calculator: averages, two samples

(website: http://www.dssresearch.com/toolkit/sscalc/size_a2.asp)

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.

Wij willen in dit experiment de mate van attenuatie en kans op uitscheiding onderzoeken voor het prototype vaccin en dat vergelijken met wild type en XXXXXX RSV(V24). Tevens willen wij onderzoeken of de mate van zuiverheid invloed heeft op het XXXXXX van de virussen. Voor XXXXXX RSV(V24) en XXXXXX RSV XXXXXX zijn voldoende data beschikbaar uit eerdere experimenten XXXXXXXXXX met virus verrijkt PEG pellet die voor wat betreft wild type ook overeenkomen met wat er in de literatuur is beschreven

mock

negatieve controle groep voor het normaal beeld van de histopathologie en al negatieve controle voor virus titratie, Q-PCR en antistof bepaling.

[REDACTED] RSV controle [REDACTED] proces

experimentele groep waarvan bekend is (uit [REDACTED] dat de minder zuivere variant (PEG pellet) vanaf dag 3 niet in de longen is aan te tonen met virustitratie, mogelijk is dit in een eerder stadium (dag 1 of 2, nog niet eerder getest) wel het geval. Na een eerste infectie ronde met [REDACTED] RSV kan er alleen maar [REDACTED] RSV gemaakt worden omdat er in vivo geen cellen aanwezig zijn die RSV [REDACTED]. Dit virus zou zich in theorie niet meer kunnen verspreiden. In deze groep wordt onderzocht op dat ook daadwerkelijk het geval is.

[REDACTED] RSV prototype vaccin [REDACTED] PD proces;

experimentele groep waarvan nog niet bekend is of en in welke mate dit virus in vivo reliceert of is aan te tonen

[REDACTED] RSV pos. controle [REDACTED] proces

positieve controle groep waarvan de infectie kinetiek is beschreven en er t/m dag 7 virus wordt teruggevonden in de longen.

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.

Doel van het project is het ontwikkelen van intra nasaal een vaccin tegen respiratoir syncytieel virus (RSV), geschikt voor toepassing bij jonge kinderen (neonaten) en op te nemen in het RVP. In deze proef wordt de attenuatie en kans op uitscheiding onderzocht van het prototype vaccin t.b.v. pre klinisch onderzoek.

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

geen

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

Alle procedures zijn gekozen op basis van de eerdere ervaring van het [REDACTED] (nu [REDACTED] in het katoenratmodel.

UITVOERING

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

Te bestuderen parameters:

- aanwezigheid en replicatie van RSV virus in longen en neusholte gebruik makend van virus titratie (CCID50) en Q-PCR
- infectie pathologie in longen

biotechniek (in nader overleg met [REDACTED])

[REDACTED] levert op de afgesproken tijdstippen de betreffende virus suspensies.

- *aankomst* dieren identificeren via kooinummers met groeps- en diernummer.
- *verdeling* individueel huisvesten in macrolon bakken type III onder filtertop.
- *acclimatisering* minimaal 3 hele dagen, liever een week.

Actie	tijdstip	toelichting
Controle	dagelijks	Dagelijks controleren op algemeen welbevinden.
Anesthesie	dag 0 dag 1,2,5,7	Gasanesthesie met isofluraan, voorafgaand aan infectie en voorafgaand aan sectie
Wegen	dag 0 dag 1,2,5,7	Voorafgaand aan infectie voorafgaand aan sectie
infectie	dag 0	infectie wordt onder anesthesie intranasaal uitgevoerd voor dieren met 100 µl infectieuze oplossing (50 µl per neusgat). De toediening geschiedt vanuit een suspensie met een automatische pipet.
Euthanasie	bij sectie	Isofluraan anesthesie gevolgd door KX (ketamine/xylazine) injectie waarna dieren worden verbloed .Ook bij niet geplande euthanasie worden de dieren na anesthesie onder KX verbloed. Na euthanasie wordt sectie verricht.

Groep N = 4	Dier #	Infectie 100ul i.n. 50ul/neusgat [REDACTED]		sectie			
		Dag 0 (wo)		Dag 1 (do)	Dag 2 (vr)	Dag 5 (ma)	Dag 7 (wo)
1	#01-04	mock		-	-	Groep 1 - #01-04	-
2	#05-08	[REDACTED] RSV		Groep 2 - #05-08	Groep 3 -	Groep 4 -	Groep 5 -
3	#09-12	[REDACTED]		-	- #09-12	-	-
4	#13-16	[REDACTED] proces		-	-	- #13-16	-
5	#17-20			-	-	-	- #17-20
6	#21-24	[REDACTED] RSV		Groep 6 - #21-24	Groep 7 -	Groep 8 -	Groep 9 -
7	#25-28	[REDACTED]		-	- #25-28	-	-
8	#29-32	[REDACTED] proces		-	-	- #29-32	-
9	#33-36			-	-	-	- #33-36
10	#37-40	[REDACTED] RSV		Groep 10 - #37-40	Groep 11 -	Groep 12 -	Groep 13 -
11	#41-44	[REDACTED]		-	- #41-44	-	-
12	#45-48	[REDACTED] proces		-	-	- #45-48	-
13	#49-52			-	-	-	- #49-52

sectie (of na euthanasie op een ander tijdstip)

Bij sectie worden de volgende acties genomen:

- onder anesthesie wegen van de dieren
- onder KX verbloeden - stol-bloed (voor serum) verzamelen
- inspectie op macroscopische afwijkingen
- verzamelen en bewerken van organen volgens tabel

orgaan	doel	handeling
neusholte	virus isolatie	spoelen met neus vloeistof 2ml
rechter long	virus isolatie	overbrengen in lege buis
linker long	histopathologie	opspreiden met formaline

WTC (Wetenschappelijke Toetsing Commissie)

Discussie wetenschappelijke toetsing:

DIEREN

Diersoort: katoenrat

Stam	COT/NCrIVsiRiv			
Geslacht	50-50			
Aantal	52			
Leeftijdswaam (weken)	4-12 wk			
Gewichtswaam (grammen)				
Microb. status	spf			
Herkomst	XXXXXXXXXX			
Locatie	XXXX			
Kooitype	filtertop			

Speciale wensen t.a.v. de proefdieren:

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?: Respiratoir Syncytieel Virus , wild type en recombinant

Levend of gedood micro-organisme?: Levend

Klasse biologische agentia volgens ARBO besluit 2005: Klasse 2

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

Inschalings niveau volgens Regeling en besluit GGO?: ML-II

Lokatie DM-2 diervverblijf: D6 - E

Wat is het GGO vergunning nummer voor dit micro-organisme?: XXXXXXXXXXWie is de verantwoordelijke medewerker: XXXXXXXXXX**Biologisch materiaal:**

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

Wat voor een materiaal (+ event. code)?: XXXXXXXXXX RSV-XXXXXX (XXXXXX RSV)(V24) , wild type RSV-XXXXXX (XXXXXX RSV)**Bijzonderheden t.b.v.MKB:****AGENTIA**

Stofnaam	Chemisch/Biologisch materiaal?	Klassificatie
recombinante RSV stammen	Biologisch	risico klasse 2
wild type RSV	Biologisch	risico klasse 2

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

bij intranasale toediening werken in laminar flow kast

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

Zo ja, via wat en hoelang?(dagen) Gedurende de eerste week na vaccinatie of infectie met infectieus RSV kan dit virus via de longen/neus worden uitgescheiden.

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

RSV besmetting ogen: schoonspoelen met veel water, prikaccident: laten bloeden en wassen met water en zeep, huid: wassen met water en desinfecterende zeep of met desinfecterende gel.

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

RSV: desinfecteren met 70% ethanol.

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

Als potentieel RSV-besmet materiaal. Aan het einde van de proef alle proefdierhuisvesting materialen, bedding enz. autoclaveren en daarna omspoelen.

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
wegen (n=52)	hanteren van de dieren	gering	<2min; 3x in 33 dagen	100%
infectie (n=52)	i.n. toediening onder anesthesie	gering/matig	<5 min	100%
euthanasie (n=52)	verbloeden onder anesthesie	gering/matig	<5 min	100%

Ongerief door andere omstandigheden dan strikt de experimentele handelingen

Omstandigheid	Aard van het ongerief	Mate ongerief	Duur ongerief	Kans ongerief
longpathologie door RSV blootstelling	longpathologie	gering/matig	max 1 week	100%

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

alle dieren in het experiment matig

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 O2	voor	wegen, bloedafname en intra nasale toedieningen (vaccin, infectie)
2	anders, nl.:	voor	sectie, verbloeden
	isofluran in O2 + ketamine xylazine		
3		voor	
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?Ja

Geef aan waarom dit noodzakelijk is.

Katoenratten zijn solitaire dieren. Verder is het voor de handeling van de dieren noodzakelijk dat ze individueel gehuisvest zijn

Klinische Effecten:

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

Mogelijk wel, maar dan ten hoogste milde respiratoire aandoeningen.

Tot nu toe zijn na intra-nasale (challenge) infectie met [REDACTED]-RSV en gemeten replicatie in de longen, geen klinische effecten waargenomen. De milde inflammatoire reactie in de longen is slechts waarneembaar bij pathologisch onderzoek van de longpreparaten.

RSV [REDACTED] is zo zwaar geattenuëerd dat er op basis van eerdere experimenten [REDACTED]

verwacht en voor het prototype vaccin RSV [REDACTED] is dit niet eerder onderzocht.
In geval van meer dan matig ongerief, wat zijn de humane eindpunten?

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 + xylazine

Bijzonderheden:

Bijzonderheden t.b.v. art. 14

De huisvesting, verzorging en biotechniek die noodzakelijk zijn voor dit onderzoek zijn bekend. Zomogelijk proberen de katoenratten in hun kooi te verdoven met isofluraan zodat ze niet gevangen hoeven te worden en er minder kans bestaat op het verspreiden van virus bevattende aerosolen. In overleg met [REDACTED]-biotechnici bekijken hoe deze mogelijkheid uitgevoerd kan worden met beschikbare middelen.

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.

Het is niet mogelijk om replicatie (in long en neus) van intranaasaal toegediend virus in vitro te bestuderen. Het katoenratmodel is gekozen op basis van onze ervaringen binnen dit project en literatuur onderzoek waar uit blijkt dat katoenratten gevoelig zijn voor humaan-RSV. Met name de replicatie van wild type RSV zullen we vergelijken met literatuurgegevens. Voorafgaand aan het mogen uitvoeren van klinische studies is pre klinisch onderzoek in een geschikt diemodel verplicht. Deze dierproef is een voorbereiding op de pre klinische fase met materiaal dat op vergelijkbare wijze is geproduceerd en gezuiverd als dat voor het klinische traject zal gaan gebeuren.

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?

ter vermindering;

- hebben we gewacht tot het productie proces zodanig is ontwikkeld dat het prototype materiaal zo veel mogelijk vergelijkbaar is met het materiaal waar de (pre-) klinische studies mee uitgevoerd zullen gaan worden.

- is een inschatting van de proefgroep grootte gemaakt door nauwkeurige statistische voorspelling (poweranalyse) om met een minimaal aantal dieren significante resultaten te verkrijgen op basis van eerdere data van soortgelijke experimenten die werden uitgevoerd in ons eigen lab.

ter verfijning;

- worden de dieren solitair geplaatst in kooien met zaagsel, waarin ze ad libitum kunnen eten en drinken.

- gebeuren alle handelingen onder anesthesie zodat dieren nauwkeuriger behandeld kunnen worden waardoor ook variatie minimaal gehouden wordt en dus minder dieren nodig zijn voor significantie van gericht geïnduceerde verschillen.

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:	1. Geen van deze technieken
Anesthesie:	4. Is wel toegepast
Pijnbestrijding, postoperatief of op ander tijdstip:	1. Is niet toegepast (geen aanleiding)
Mate van ongerief:	3. Matig

Aantal Dieren:	Mate van ongerief:

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

BIJLAGEN

ADDENDUM

AUTORISATIE HISTORIE

(16-5-2013 12:09:30) Goedgekeurd door Artikel 12 functionaris [REDACTED]
(5/21/2013 2:58:32 PM) Goedgekeurd door Artikel 9 functionaris [REDACTED]
(22-5-2013 7:53:41) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]
(6/6/2013 9:40:43 AM) Goedgekeurd door A14 functionaris [REDACTED]
(6-6-2013 18:08:36) Positief advies gegeven door DEC functionaris [REDACTED]
(7-6-2013 15:16:27) Goedgekeurd door BVF functionaris [REDACTED]
(7-6-2013 16:14:36) Goedgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED] met de volgende opmerkingen.
Opmerkingen: akkoord in mail [REDACTED] 7-6-2013

AUTORISATIE**Verantwoordelijke Art 12 functionaris:**

[REDACTED]
(16-5-2013 12:09:30) Goedgekeurd door Artikel 12 functionaris [REDACTED]
Opmerkingen:

Verantwoordelijke onderzoeker (Art. 9)**Naam:** [REDACTED]**Vervanger:** [REDACTED]

(5/21/2013 2:58:32 PM) Goedgekeurd door Artikel 9 functionaris [REDACTED]

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

[REDACTED]
(7-6-2013 16:14:36) Goedgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED]

Bestelnummer:

Opmerkingen:

akkoord in mail [REDACTED] 7-6-2013

MKB Autorisatoren:

(22-5-2013 7:53:41) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:**BVF Autorisatoren:**

[REDACTED]
(7-6-2013 15:16:27) Goedgekeurd door BVF functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:**Art. 14 Autorisatoren:**

(6/6/2013 9:40:43 AM) Goedgekeurd door A14 functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

DEC Autorisatoren:

(6-6-2013 18:08:36) Positief advies gegeven door DEC functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

©Intravacc 2014 Alle rechten voorbehouden