

Inventaris Wob-verzoek W21-04									
10886		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	NTS			x					
2	Project Proposal, d.d. 3 december 2020				x		x	x	
3	Appendix 1 Description Animal Procedures, d.d. 3 december 2020				x		x	x	
4	DEC-advies, d.d. 3 december 2020				x		x	x	
5	Answers from Animal Welfare Officer, d.d. 25 januari 2021				x		x	x	
6	Interne Adviesnota, d.d. 27 januari 2021				x		x	x	x
7	Beschikkingbrief, d.d. 28 januari 2021				x		x	x	
8	NTS	x							



Dit is een kopie van het CCD formulier, waarbij de invulvelden niet beveiligd zijn. Voor indiening bij de CCD moet de door de DEC goedgekeurde versie in het CCD formulier worden overgezet.
Versie CCD formulier dd. 2016-03-02

Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project

De farmacokinetiek van langwerkende antibiotica in makaken

1.2 Looptijd van het project (BEGIN- EN EINDDATUM)

November 2020-Oktober 2025

1.3 Trefwoorden (maximaal 5)

Apen, welzijnsverbetering, verfijning, langwerkend antibioticum, resistentie

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project. Fundamenteel onderzoek

Translationeel of toegepast onderzoek

Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van

Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort

Hoger onderwijs of opleiding

Forensisch onderzoek

Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project

(bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)

Het is moeilijk om aan bacteriële infectie lijdende apen in groepshuisvesting te behandelen met antibiotica. De meeste antibioticakuren moeten dagelijks, gedurende meerdere dagen, worden toegediend. Het vangen van de apen voor het toedienen van een injectie geeft veel stress voor het individu en voor de rest van de groep. Bovendien wordt orale medicatie vaak geweigerd of onvolledig ingenomen. Een antibioticum dat langer werkt en dus minder vaak gegeven hoeft te worden, geeft daarom veel welzijnsverbetering voor het individu en ook voor de groep als geheel. Deze langwerkende antibiotica zijn niet geregistreerd voor gebruik in apen. Ze zijn getest in andere diersoorten. Er wordt

aangenomen dat deze middelen werken in apen, maar daar is vaak geen bewijs voor. Als dieren worden behandeld met antibiotica die niet of onvolledig werken, wordt de ziekte niet effectief behandeld en kunnen bacteriën ongevoelig raken voor antibiotica. Dieren kunnen deze ongevoelige bacteriën op mensen overdragen, het is dan mogelijk dat een bepaald antibioticum ook niet meer bij mensen werkt.

Er is op dit moment maar één langwerkend antibioticum waarvan de werkzaamheid is bepaald in resusapen. Dit middel is echter in de humane gezondheidszorg gereserveerd voor de behandeling van multi-resistente bacteriële infecties en is daarom ook een heel belangrijk antibioticum voor mensen. Dit middel mag daarom slechts onder hele strenge voorwaarden gebruikt worden bij dieren. Daarnaast is niet elke bacterie gevoelig voor hetzelfde antibioticum. Het is erg belangrijk dat wij over meerdere antibiotica beschikken, om de verschillende bacteriën te kunnen bestrijden. Bij voorkeur zijn dit antibiotica die voor mensen zo min mogelijk van belang zijn.

Dit project zal informatie geven over de Farmacokinetiek bij apen van de te onderzoeken antibiotica. De farmacokinetiek beschrijft de processen waaraan een werkzame stof in het lichaam wordt onderworpen. Deze processen zijn; opname van een stof, verdeling in het lichaam en verwijdering van een stof uit het lichaam.

Het gebruik van langwerkende antibiotica in de goede dosering, met de juiste toedieningsfrequentie voorkomt onnodig lijden. Deze studie is daarom van belang voor alle dierenartsen die met makaken werken.

Het doel van het project is het vaststellen van werkzame doseringsschema's voor verschillende langwerkende antibiotica bij makaken. Daarnaast willen we in kaart brengen hoe de natuurlijke bacteriële darmflora (microbioom) onder invloed van antibioticatherapie verandert en of er resistentie binnen deze flora (resistoom) optreedt.

Dit project draagt direct bij aan het doeltreffend gebruik van antibiotica in de aap en mogelijk het voorkomen van resistentie-ontwikkeling.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

De opbrengst van dit project is het beschikbaar hebben van een langwerkend antibioticum dat in de juiste dosering gebruikt kan worden in apen, zodat veelvuldige toediening en stress daardoor voorkomen kan worden. Dit zal wereldwijd voor alle instellingen en dierentuinen die met makaken werken een stressreductie betekenen tijdens behandelingen. Stressreductie is belangrijk, stress kan namelijk immuunsysteem onderdrukken. Om een infectie succesvol en met zo min mogelijk stress te kunnen behandelen, willen we weten of de gekozen antibiotica werkzaam zijn in makaken. Omdat we ook het microbioom en resistoom bekijken, geeft dit project ook inzicht in eventuele resistentie ontwikkeling die gedurende de behandeling kan optreden.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Resus makaken, maximaal 20 over een periode van maximaal 5 jaar.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Kans op weefselreactie na injectie, ongemak van sedatie en bloedafnames.

Mocht het bepalen van de uitscheidingsroutes en uitscheidingsduur van het middel onverwacht niet mogelijk zijn bij duo-huisvesting, dan zullen in een uitzonderlijk geval de dieren individueel gehuisvest worden voor een beperkte duur.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Matig

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Na afloop van de studie zullen de dieren deel blijven uitmaken van de kolonie van het instituut.



4 Drie V's

4.1 Vervanging

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

Het lichaam is erg complex en veel interacties begrijpen we nog niet. Op dit moment is er geen in vitro model dat de werking van het makaken-lichaam kan imiteren. In vitro computer modellen kunnen een initiële dosis in een nieuw doeldier voorspellen. Echter, dit zijn zeer ruime voorspellingen die ongeschikt zijn voor het vaststellen van effectieve klinische dosering regimes. Voor het bepalen van het complexe microbiom en resistoom is ook een levende dier nodig. De minimale werkzame concentratie antibiotica tegen een bepaalde bacterie wordt wel in vitro vastgesteld.

4.2 Vermindering

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

Naast de ervaringen binnen het instituut maken we gebruik van rekenmodellen. De verkregen data wordt in rekenmodellen gezet. Als bij het eerste duo blijkt dat de initiële dosis niet afdoende was, kunnen we met dit model voorspellen of een werkzame dosis wel haalbaar gaat zijn. Zo voorkomen we dat er nog 2 extra dieren gebruikt moeten worden om het model te valideren.

4.3 Verfijning

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

Makaken worden veel gebruikt in de onderzoekswereld en zijn ook in dierentuinen alom vertegenwoordigd. Er is een groot gebrek aan kennis omtrent antibioticumgebruik in apen. Met deze studie hopen wij dat hiaat aan kennis op te vullen. Door het toepassen van PK modellering wordt het aantal tijdpunten van bloedafname tot een minimum beperkt. Daarnaast worden de dieren getraind om vrijwillig mee te werken aan de verdoving. Ook het project zelf draagt bij aan verfijning omdat langwerkende antibiotica dierwelzijn verbeteren zoals uitgelegd in 3.1.

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

Alle handelingen worden uitgevoerd onder verdoving. De dieren worden getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de verdoving. Tijdens de studie worden de dieren dagelijks intensief geobserveerd. Eventuele bijwerkingen worden genoteerd. Om de dieren zo veel mogelijk natuurlijk gedrag te laten vertonen is er een uitgebreid kooiverrijkingprogramma.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

--



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.

10.2.g

Long-acting antibiotics in *Macaca mulatta*: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization

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.

Treating bacterial infectious diseases in non-human primates housed in large social groups is not easy. Their behaviour and husbandry present unique challenges, whilst the responsibility remains to minimize

the selection for antimicrobial resistance in target pathogens as well as commensal bacteria and human pathogens.

Since the use of nonhuman primates in biomedical research is required for a number of reasons, such as translational and fundamental research, it is necessary to keep improving the health and welfare of these animals^{1,2}. Commonly used non-human primates are macaques. Like humans they can be infected by a variety of bacteria. The diseases that these bacteria can cause may range from mild to severe depending on several factors. In general, antibiotic treatment is indicated when the animal cannot cope with a bacterial infection. When it is very likely that bacterial infection will occur, antibiotic treatment is also indicated. For example, superficial wounds do usually not need antibiotic treatment in macaques. However, traumatic wounds caused by bite incidents are considered dirty and are prone to infection. In these cases, antibiotic treatment is indicated³. In addition, diarrhoea is a common problem in research colonies (15-20% of the population annually)⁴ and zoo settings⁵. Diarrhoea can be caused by viruses, parasites, bacteria, stress and idiopathic reasons. Common causes of bacterial diarrhoea are *Campylobacter* spp, *Yersinia* spp⁶ and *E coli*⁵. If the diarrhoea is caused by bacterial infection and the patient is not able to cope with the infection, antibiotic treatment is indicated. Prongay⁷ (2013) reported an annual diarrhoea associated mortality of 3,2% in rhesus macaques. Other examples when antibiotic treatment should be considered are e.g. complicated bone fractures, caesarean section to expel an infected foetus and abdominal surgery with complicated intestinal resection.

Curative treatment with antibiotics in macaques can be challenging. Macaques (*Macaca sp.*) live in social groups with strict behavioural conduct codes and social dominance hierarchy to ensure stability. When an animal needs veterinary care, it is unavoidable to isolate this individual from the social group for treatment. However, separating an animal from the group to administer antibiotics has serious social consequences. Separation creates stress on both the diseased animal and its social group. Re-introduction after separation is also not always without risk of conflicts and subsequent bite injuries. In addition, macaques are notorious for trying to avoid medicated food. Despite the fact that most of our animals are trained to drink from a syringe, there is absolutely no guarantee that the animals will drink medicated fluids (once- or twice daily) for several days. Oral medication is usually developed for the use in dogs and cats. Therefore, concentration and added flavour (developed for the liking of dogs and cats) could be a reason for refusing to drink the medication. The same counts for hiding the medication in food like bananas or biscuits and adding extra masking flavours, like peanut butter, yoghurt, syrup etc. Labberton⁸ (2013) concluded that however it is possible to administer metronidazole dissolved in drinking water to some rhesus macaques, this was not a reliable and practical method. First, this method didn't result in 100% uptake over the treatment period, even when the water was flavoured with syrup. Second, the variability in water uptake hampered accurate dosing, metronidazole dissolved in water decreased water uptake. Last, several bottles were repeatedly destroyed by the animals. Despite all efforts the outcome is usually that the monkey will refuse the (complete) course of antibiotics. Long-acting injectable antibiotics are a potential solution for these challenges as they require less frequent administrations and animal handling. The downside of long-acting antibiotics is the tapering off of blood and tissue levels, hence, creating a larger window of opportunity for the selection of resistant microbes.

There are a few reports about the incidence of trauma and diarrhea in nonhuman primates. The annual incidence of macaques presented at the veterinary hospital due to trauma at the California National Primate Research Centre (3400 macaques) was estimated at 5-9%¹⁰. As mentioned earlier the incidence of diarrhoea can involve up to 15-10% of the NHP colonies⁴ annually with a total mortality 3,2%⁷. To the authors knowledge there is no published data available to predict exactly in how many cases antibiotic treatment is indicated.

In general, to select the appropriate antibiotic treatment for an ill animal, the veterinarian has to take several factors in consideration: the species of the animal, the strain and susceptibility for antibiotics of bacteria, pharmacokinetics and whether there is a registered veterinary medicine available. In case of equal suitability, the one with less selective pressure on resident microbial flora is the preferred choice¹⁰. The authorized antimicrobial veterinary medicinal products are subdivided in three groups based on their potential to select for resistance in commensal bacteria and pathogens of human health importance: first, second and third line of antibiotics. The first line is the most preferable. They are suitable for

empirical use and not considered critically important for human use. Antibiotics of the second line select for known resistances (like Beta-Lactamase (ESBL/AmpC) producing enterobacteria), are more important for human use, and their application requires justification. The critically important antibiotics are the third line antibiotics. Their use is not allowed without culturing and sensitivity testing showing there is no alternative, and then only for treatment of an individual animal¹⁰.

There are no antibiotics registered for the treatment of bacterial infectious diseases in macaques because they are not common domestic species. The veterinarian is therefore allowed by a legislative provision, the cascade, to use antibiotics that are not registered for the target species or indication (off-label usage^{10,11}). The cascade is a decision tree based on the availability of medicines registered for other purposes/species and/or in other countries¹¹. For antimicrobial treatment the categorization in first, second and third line is applicable. Consequently, off-label use implicates that there is not always empirical proof regarding efficacy of the antibiotic in the species concerned.

Off-label use of antibiotics is however common practice in the veterinary field of zoo and wildlife medicine. Doses are often based on those established for domesticated species, potentially leading to over or under dosing. Our group¹² has shown earlier that the pharmacokinetics (PK) of ceftiofur (Convenia®), a long acting antibiotic, in rhesus monkeys substantially differed (half-life $t_{1/2}$ 6,6 h) from that for dogs ($t_{1/2}$ 133 h) and cats ($t_{1/2}$ 166 h) for which it was registered. In addition, the maximal plasma concentration (C_{max}) found in rhesus macaques was considerably lower than reported for dogs and cats. Although a long-acting antibiotic in cats and dogs, this was not the case in rhesus macaques.

Apart from our earlier study only one other PK study involving long acting antibiotics has been performed in macaques⁹. This specific study using ceftiofur, a 3rd generation cephalosporin, showed a long-lasting profile of 2-7 days in macaques depending on the initial single dose. However, since Ceftiofur is a third-generation and a third line antibiotic, its use should be limited to those cases where first or second-line antibiotics would fail.

Antibiotic resistance is one of the greatest threats to global health. Therefore, the World Health Organization has classified certain antimicrobial classes as "Highest Priority Critically Important Antimicrobials" for human medicine in the so-called WHO list of critically important antimicrobials for human medicine (CIA list). The CIA list is intended for public health and animal health authorities, practicing physicians and veterinarians, and other interested stakeholders involved in managing antimicrobial resistance to ensure that all antimicrobials, especially critically important antimicrobials, are used prudently both in human and veterinary medicine. It is intended as a reference to help formulate and prioritize risk assessment and risk management strategies for containing antimicrobial resistance mainly due to non-human antimicrobial use. In the latest version of the CIA list (6th revision, 2018), the "Highest Priority Critically Important Antimicrobials" are: quinolones, third and higher generation cephalosporins, macrolides and ketolides, glycopeptides, and polymyxins¹³.

Taking the WHO CIA list and the Dutch Health Council (Gezondheidsraad) policy in account the 'Werkgroep Veterinair Antibiotica Beleid' (WVBA) of the Koninklijke Nederlandse Maatschappij voor Diergeneeskunde published a directive to ensure not only animal welfare and health, but also restricting bacterial resistance and selection in veterinary medicine and human healthcare¹⁰. As a science institute, we think that it is of the utmost importance to prevent development of antibiotic resistance but also providing the best treatments for our macaques.

The off-label use of medications in zoo- and wildlife stock is constantly under discussion as zoo and wildlife veterinarians realise that this is a major risk to their health surveillance programmes. In addition, the European Commission has new legislation to fight antimicrobial resistance. One of the measures is to reserve certain antimicrobials for human infections only. Therefore, the European Medicines Agency (EMA) recently did an open call for data on the use of antimicrobials in animals. This to provide the European Commission with scientific advice on additional legislation for the use of the cascade¹⁴. In response, the European Association of Zoos and Aquaria (EAZA) and the European Association of Zoos and Wildlife Veterinarians (EAZVV) both concluded that without the cascade, the health and welfare of thousands of animal species within human care in the EU would be significantly and unacceptably jeopardised (internal email correspondence). The above shows the need for scientific data on the off-label use of antibiotics to preserve both human and animal health.

The use of antibiotics can have an impact on the gut microbiome and its resistome¹⁵. The gut microbiome plays a critical role in the development and spread of antibiotic resistant genes (resistome).


One potential health threat lies in the release of antibiotic resistant genes (ARGs) from cross-contaminated microbiomes¹⁶. Macaques can transmit resistant bacterial strains towards humans. It is known that the microbiome of captive macaques' gradually changes towards the human microbiome¹⁷. Also, the results of another group that characterized faecal microbiome and antibiotic resistance of wild and captive baboons suggested that captivity and lifestyle changes associated with human contact can lead to marked changes in the ecology of primate gut communities¹⁸. The above shows the importance to include the analysis of the effect of long acting antibiotics on the gut microbiome and its resistance in this study.

To improve health and welfare in socially housed macaques, there is a strong need for antimicrobial treatment requiring a limited administration frequency. In addition, there is a need for empirical support of efficacy of antibiotics used in macaques. Long-acting antibiotics create a prolonged window of opportunity for the selection of resistant bacteria compared to antibiotics with shorter half-lives. It is therefore important that appropriate dosage regimens for these long-acting antibiotics are selected from the beginning to ensure a high probability for successful treatment outcomes. This avoids unnecessary repeated treatments with antibiotics in general, both long- and short-acting, thereby decreasing bacteria's overall exposure to antimicrobials and selection for resistance. This is especially when using antibiotics that are classified as 'third choice', which are mostly off-label treatments. Regarding the development of resistance of bacteria against antibiotics, it is relevant to track this by determining the faecal resistance.

It is of utmost importance to study the pharmacokinetics, microbiome and resistance development of long-acting antibiotics after IM or SC administration in macaques. Eventually we hope to identify a selection of first, second (and when necessary even third line) long acting antibiotics, out of which veterinarians around the world can make an informed choice to treat macaques. The results are not only important for our institute's animal health management programme, but also for all veterinarians working with non-human primates. A prolonged dosing interval (>48hrs) for treatment of bacterial infection in monkeys would greatly reduce the need to handle and restrain them, thereby decreasing stress (3R's, Refinement). In addition, it also ensures administration of a full course of treatment.

This study is a collaborative effort between our institute and an experienced pharmacology group without any involvement of manufacturers/pharmaceutical companies. All data will be published.

References

- 1- Scheer (Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks). Final Opinion on 'The need for non-human primates in biomedical research, production and testing of products and devices (update 2017)', http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Scheer_may2017.pdf (2017).
- 2-  10.2.e
- 3- Piccart F, Dormaar JT, Coropciuc R, Schoenaers J, Bila M, Politis C. Dog Bite Injuries in the Head and Neck Region: A 20-Year Review. *Cranio-maxillofac Trauma Reconstr.* 2019 Sep;12(3):199-204. doi: 10.1055/s-0038-1660441. Epub 2018 Jun 22. PMID: 31428244; PMCID: PMC6697480.
- 4- Ardeshir A, Oslund KL, Ventimiglia F, Yee J, Lerche NW, Hyde DM. (2013) Idiopathic microscopic colitis of rhesus macaques: quantitative assessment of colonic mucosa. *Anat Rec (Hoboken)*;296(8):1169-79. doi: 10.1002/ar.22727. Epub 2013 Jun 18.
- 5- Clayton JB, Danzeisen JL, Trent AM, Murphy T, Johnson TJ. Longitudinal Characterization of *Escherichia coli* in Healthy Captive Non-Human Primates. *Front Vet Sci.* 2014 Nov 17;1:24. doi: 10.3389/fvets.2014.00024. PMID: 26664923; PMCID: PMC4668849.
- 6- Kim J, Coble DJ, Salyards GW, Habing GG. Comparative Review of Antimicrobial Resistance in Humans and Nonhuman Primates. *Comp Med.* 2018 Apr 2;68(2):124-130. PMID: 29663937; PMCID: PMC5897968.
- 7- Prongay K, Park B, Murphy SJ. Risk factor analysis may provide clues to diarrhea prevention in outdoor-housed rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am J Primatol.* 2013 Aug;75(8):872-82. doi: 10.1002/ajp.22150. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23568382; PMCID: PMC3956043.

8-

10.2.e

- 9- Salyards GW, Knych HK, Hill AE, Kelly KR, Christe KL. Pharmacokinetics of Ceftiofur Crystalline Free Acid in Male Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) after Subcutaneous Administration. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54:557-563.
- 10- <https://www.knmvd.nl/app/uploads/sites/4/2018/09/180904-wvab-richtlijn-3.4-definitief.pdf>
- 11- <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035091/2019-06-01#Hoofdstuk5>,
Artikel 5.1. Cascade voor dieren die niet voor de productie van levensmiddelen zijn bestemd
- 12-

10.2.e

- 13- <https://www.who.int/foodsafety/cia/en/>
- 14- https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/open-call-data-use-antimicrobials-animals_en.pdf
- 15- Willmann, M., Vehreschild, M.J.G.T., Biehl, L.M. *et al.* Distinct impact of antibiotics on the gut microbiome and resistome: a longitudinal multicenter cohort study. *BMC Biol* **17**, 76 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0692-y>
- 16- Sun, J., Huang, T., Chen, C. *et al.* Comparison of Fecal Microbial Composition and Antibiotic Resistance Genes from Swine, Farm Workers and the Surrounding Villagers. *Sci Rep* **7**, 4965 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04672-y>
- 17- Jonathan B. Clayton, Pajau Vangay, Hu Huang, Tonya Ward, Benjamin M. Hillmann, Gabriel A. Al-Ghalith, Dominic A. Travis, Ha Thang Long, Bui Van Tuan, Vo Van Minh, Francis Cabana, Tilo Nadler, Barbara Toddes, Tami Murphy, Kenneth E. Glander, Timothy J. Johnson, and Dan Knights, Captivity humanizes the primate microbiome, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Sep 13;113(37):10376-81. doi: 10.1073/pnas.1521835113. Epub 2016 Aug 29.
- 18- Pablo Tsukayama, Manish Boolchandani, Sanket Patel, Erica C. Pehrsson, Molly K. Gibson, Kenneth L. Chiou, Clifford J. Jolly, Jeffrey Rogers, Jane E. Phillips-Conroy, Gautam Dantas. Characterization of Wild and Captive Baboon Gut Microbiota and Their Antibiotic Resistomes. *mSystems.* 2018 Jun 26;3(3). pii: e00016-18. doi: 10.1128/mSystems.00016-18. eCollection 2018 May-Jun

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?

The main objective of this study is to assess the pharmacokinetics of antibiotics in macaques to identify those with longer half-lives requiring less frequent administration, and to characterize expected microbiome and resistome shifts in the bacterial gut population in macaques as a result of the administration of these antibiotics.

At our institute we have been performing PK studies in NHP for over 20 years. We have the state-of-the-art facilities and experience to adequately perform these studies.

This study is an established collaboration with experts in the field from the Division of Veterinary Pharmacotherapy and Pharmacy of a University. The expertise of this group is internationally recognized and demonstrated by numerous published scientific papers regarding pharmacokinetic studies in many different species.

3.3 Relevance

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

Macaques are difficult to handle for daily injections and are notorious for trying to avoid medicated food. Furthermore, separating an animal from its group to achieve either of the two may have serious social consequences.

Moreover, there are no registered medicines for primates so the off-label use of medication is common practice for zoo and wildlife veterinarians. Dosages are often based on extrapolation from dosages of domesticated species or guesstimates, potentially leading to over or under dosing, which is a risk in health management of the monkeys.¹ Underdosage is a major hazard in development of bacterial resistance against certain antimicrobials.

In addition, the only proven efficacy of a long-acting antibiotic is ceftiofur and this is a third line antimicrobial. Regarding the WVAB, first and second line antibiotics are preferable². Therefore, veterinarians need a more comprehensive list of antibiotics to treat macaques effectively and to minimise the risk of development of bacterial resistance while doing so.

A dosing interval of 2 to 5 days for treatment of bacterial infections in macaques would greatly reduce the need to handle and restrain the macaques, thereby, decreasing stress (3R's Refinement). A multiday treatment with one injection ensures administration of a full course of treatment. Our results will not only be important for animal health management programmes, but also for all veterinary practice regarding monkeys. We will publish our data which can be used by other zoo- and wildlife veterinarians.

References

1-

10.2.e

2- <https://www.knmvd.nl/app/uploads/sites/4/2018/09/180904-wvab-richtlijn-3.4-definitief.pdf>

3.4 Research strategy

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

Our aim is to establish a more comprehensive list of appropriate and efficacious dosage regimens for long acting antibiotics to treat macaques with infectious bacterial diseases. We will study registered long-acting antibiotics of different classes: at least one penicillin, a macrolide and a tetracycline that have half-lives of at least 48 hours in other mammals. With the penicillin we will cover Gram positive infections. For example, *Staphylococcus aureus* induced wound infections. 10.2.e (2011) showed that *S.aureus* was most abundant in fresh wounds in rhesus macaques. With the macrolides and tetracyclines we cover intestinal infections with *Campylobacter* spp, *Yersinia pseudotuberculosis* and *E. coli*. Our microbiology department reports occasionally tetracycline resistant *Campylobacter* spp in cultures obtained from our patients. These results are similar to the findings of Kim² (2018). Macrolide resistant *Campylobacter* spp hasn't been reported in our microbiology laboratory yet. Overall, these observations suggest that with three classes of Long-acting antibiotics we are able to treat the most common infections which demand antibiotic treatment macaques. In addition, we will determine the microbiome and resistome before, during and post treatment to investigate microbial shifts in the gut community and antibiotic resistance development while using these antibiotics.

We will test at least three and maximal five long-acting antibiotics. The experiment will be stopped when we have three suitable antibiotics.

We will study long-acting injectable antibiotics with in vitro activity against bacterial pathogens causing the most common health problems in macaque colonies, starting with bacterial diarrhea. As an appropriate and efficacious dose for macaques is not yet established, we will extrapolate the dose from other species based on allometric scaling.

A non-linear mixed effects model will be used to analyse the data and calculate the central tendency and variability of the PK parameter values for the study population. The model will then be applied to design the dosage regimen required to attain target values for PKPD indices associated with successful

therapeutic outcomes in other species. Serial plasma analysis will provide the raw data for PK evaluation. Depending on the type of antibiotic, the target index will be time (T) above the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value (T>MIC) or area under the microbiological inhibitory curve (AUC/MIC). For these calculations, known MIC distributions for will be used, if available. Where necessary, we will use MIC data for the most frequently isolated bacteria cultured from swabs from our macaque colony during the yearly health control programme.

1-

10.2.e

- 2- Kim J, Coble DJ, Salyards GW, Habing GG. Comparative Review of Antimicrobial Resistance in Humans and Nonhuman Primates. *Comp Med.* 2018 Apr 2;68(2):124-130. PMID: 29663937; PMCID: PMC5897968.

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.

This study is designed to assess the pharmacokinetics of long-acting antibiotics in macaques. Four healthy, adult macaques will be used in each study. Blood, urine and faecal samples will be collected at scheduled time points. The selection of antibiotics will be based on registration of veterinary use, class and generation, half life and target pathogens. We will study the antibiotics consecutively.

First, two animals will receive a dose extrapolated from a species in which the antibiotic is approved based on allometric scaling. After analysing these initial results, the dosage regimen required to achieve the target value for the appropriate PKPD index will be calculated. This dose will be administered to two other animals to validate the PK model. If the model predicts that the dose needed to achieve positive therapeutic outcomes is too high to be safely or practically administered to macaques, the study will be stopped for that particular antibiotic without treating the additional two animals.

At the start of each treatment period, body weights will be measured. One blood sample (T=0) will be collected prior to administration of the antibiotic. After injection of the antibiotic, we will take multiple blood samples in a relatively short period of time. However, the total blood volume to be collected will not exceed the 1% of the body weight of the animals per month.

After administration of the long acting antibiotic, urine and faeces will be collected in trays underneath the cage. Concentrations of antibiotic will be determined to quantify the pharmacokinetic clearance pathways. The urine and faecal samples will be collected at scheduled timepoints. To assess microbiome and its resistome we will obtain rectal swabs. In this setting, samples directly obtained from the rectum are more reliable compared to faecal samples. Obtaining fresh non-contaminated faecal samples from both individuals can be challenging.

During the course of the study, animals will be checked at least daily for appetite, general behaviour, stool consistency, and local side-effects of the chosen antibiotic.

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.

In this protocol the pharmacokinetics of long-acting antibiotics will be assessed. Therefore, blood-, urine- and faecal samples will be collected at scheduled timepoints after IM/SC administration. In addition, we will obtain rectal swabs to assess microbiome and resistome changes before, during and after treatment to evaluate composition changes in the gut microbiome and possible bacterial resistance development.

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	Long-acting antibiotics in <i>Macaca mulatta</i> : Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



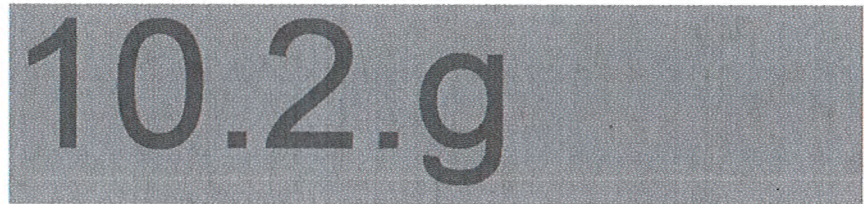
Appendix Description animal procedures

- 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.



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

Serial number	Type of animal procedure
1	Long-acting antibiotics in <i>Macaca mulatta</i> : Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization

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 primary objective of this study is to describe the pharmacokinetics (PK) of long-acting antibiotics in *Macaca mulatta*. In addition, we will analyse the faecal microbiome and resistome before, during and after treatment. All proposed antibiotics will be evaluated and approved by our internal animal welfare body. In addition, along with the proposed antibiotic, we will submit the corresponding details like dosage and timepoints of blood sampling.

Our aim is to establish a more comprehensive list of appropriate and efficacious dosage regimens for long acting antibiotics to treat macaques with infectious bacterial diseases. We will study registered long-acting antibiotics of different classes: at least one penicillin, a macrolide and a tetracycline that have half-lives of at least 48 hours in other mammals. With the penicillin we will cover Gram positive infections. For example, *Staphylococcus aureus* induced wound infections. 10.2.e (2011) showed that *S.aureus* was most abundant in fresh wounds in rhesus macaques. With the macrolides and tetracyclines we cover intestinal infections with *Campylobacter* spp, *Yersinia pseudotuberculosis* and *E. coli*. Our microbiology department reports occasionally tetracycline resistant *Campylobacter* spp in cultures obtained from our patients.

These results are similar to the findings of Kim² (2018). Macrolide resistant *Campylobacter* spp hasn't been reported in our microbiology laboratory yet. Overall, these observations suggest that with three classes of long-acting antibiotics we are able to treat the most common infections which demand antibiotic treatment macaques.

We will use long-acting antibiotics registered for veterinary use. Depending on the class of antibiotics we will choose a pharmacokinetic predictor of efficacy that correlates the best with the used antibiotic. Pharmacokinetic predictors of efficacy are: time above minimum inhibitory concentration ($T > MIC$), area under the plasma concentration time curve above the MIC (AUC/MIC) and the maximal plasma concentration in relation to the MIC of pathogens (C_{max}). As an appropriate and efficacious dose for macaques is not yet established, the initial dose will be extrapolated from species in which that specific antibiotic is already approved by allometric scaling. We consider a dose efficacious when it achieves target values of appropriate PKPD indices for that particular antibiotic ($T > MIC$ or AUC/MIC). The MICs used in these calculations will be based on published data or determined from bacterial isolates acquired during our annual health screening-programme.

For each antibiotic we require four animals. First, two animals will be treated with a long-acting antibiotic. The PK data collected from the first two animals will be analysed using a non-linear mixed effects model. This model will then be used to predict the dosage regimen needed to achieve the target PKPD index for that antibiotic. Two additional animals will be treated with this dosage regimen to validate the model. If the predicted dosage is too high or too frequent to be safely or practically administered to macaques, the study will be stopped for that particular antibiotic prior to treating the additional two animals. The processing of the acquired samples is complicated and involves many different stages. Therefore, the outcome will be too delicate and unreliable when we start with one animal. In addition, when using one animal in the pilot there is risk of testing an outlier. By using 2 animals we obtain more reliable data that reflect the population better. Consequently, we are able to adjust the sample frequency in the other two animals to a minimum without compromising reliability of the obtained data.

Prior to administration of the antibiotic we will collect one blood, rectal swab, faeces and urine sample ($T=0$). After administration of the long-acting antibiotic, blood, urine, and faeces will be collected. To investigate the pharmacokinetics in macaques, we will analyse the antibiotic concentration of the samples. Based on the results of these first two animals, the sampling times may be adjusted for the next two animals to ensure the best possible description of the time-concentration profile. Subsequently, rectal swabs are obtained to analyse gut- microbiome and resistome. These samples will be analysed by genomic sequencing methods. Genomic analyses are more sensitive and therefore preferable over traditional culturing methods³. By sampling at different timepoints (before, during and after treatment) it is possible to identify changes in bacterial composition and antibiotic resistant genes under antibiotic pressure.

The blood samples that will be collected with sampling times varying between the different antibiotics and based on the expected plasma concentration-time profile from data in other species. Typically, PK modelling requires a sampling schedule to match the elimination kinetics, more condense initially and ending when the concentration reaches zero. A total of 10 to 12 samples distributed over several days is typical, to be extended in case of repeated dosing to 10 days and several more samples.

Qualified caretakers will perform daily observations for two weeks post administration to specifically document any potential injection site reactions. Additionally, stool quality assessments will be obtained for two weeks post-administration using an objective faecal score to check for possible gastrointestinal side effects.^{4,5} These observations will be complemented by routine daily health monitoring throughout the treatment and washout periods for subjective appetite, hydration, and stool quality assessments.

References

1- 10.2.e

10.2.e

10.2.e

2- Kim J, Coble DJ, Salyards GW, Habing GG. Comparative Review of Antimicrobial Resistance in Humans and Nonhuman Primates. *Comp Med.* 2018 Apr 2;68(2):124-130. PMID: 29663937; PMCID: PMC5897968.

3- Gupta, S., Mortensen, M.S., Schjørring, S. *et al.* Amplicon sequencing provides more accurate microbiome information in healthy children compared to culturing. *Commun Biol* **2**, 291 (2019). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0540-1>

4- Blackwood RS, Tarara RP, Christe KL, Spinner A, Lerche NW. 2008. Effects of the macrolide drug tylosin on chronic diarrhea in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Comp Med* **58**:81-87.

5- Mi Young Yoon and Sang Sun Yoon. Disruption of the Gut Ecosystem by Antibiotics. *Yonsei Med J.* 2018;**59**: 4–12.

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

Before administration of the drug, the bodyweight of the animals will be determined to administer the drugs in the right dose. One blood sample (T=0) will be collected prior to administration of the antibiotic. Dosing of the antibiotic will be performed under close surveillance of the veterinarian, while the animal is sedated. The antibiotic injections will be given IM or SC. To simplify the observations of the injection site area, the hairs will be shaved from the overlying skin.

The injection frequency is depending on the halflife of the used antibiotic. We will use the dose interval recommended by the manufacturer as a full treatment and this will be at least one injection and will be maximised at three injections. Only antibiotics with a dosing interval of at least 48 hours will be used. The injected volume will not exceed two ml per injection site, no more than 2 injection sites will be used.

Blood sampling will be done from the vena femoralis while the animal is sedated. Blood samples will be collected at fixed timepoints after administration and are based on the expected plasma concentration-time profile from data in other species. The cumulative blood volume to be taken will not exceed the 1% of the body weight of the animals per month. Every time that the monkey is sedated for a blood sampling, the bodyweight will be recorded and the injection site of the antibiotic will be checked for possible local adverse effects. During the first period of daily blood sampling, the animals will receive tube feeding to prevent dehydration and a negative energy balance.

To the authors knowledge there is no published data about metabolism and excretion of long-acting antibiotics in *Macaca mulatta*. Therefore, after administration of the long-acting antibiotic all the produced urine and faeces will be collected, and concentrations of antibiotic will be determined. In addition, rectal swabs are obtained for microbiome and resistome analysis. Collection of both samples is of utmost importance to monitor a) possible development of resistancy in the commensal gutflora, b) the amount of antibiotic entering the environment and c) concentration of the antibiotic reached in the faeces and the bladder. Urine and faecal samples are taken prior to administration and afterwards voided over multiple timepoints.

Urine samples will be collected, filtered, and stored below -20°C until analysed. Faecal samples will be stored below -20°C and below -80°C (microbiome) until analysed. These samples will be collected with a collection tray underneath their home cage. Traditionally animals were housed individually when determining excretion patterns. However, recent reports demonstrate that it is not always necessary to collect individual samples^{1,2}. This welfare improvement makes us highly motivated to house the animals in pairs during these PK studies. Because both animals will receive the same dosing and sampling scheme, there is no need for single housing. In principle, the animals will always be socially housed.

However, in the unexpected event that the above-mentioned collection of samples during social housing fails during the first trial and we are not able to resolve the problem otherwise, we would like to house the animals individually for the period required to collect urine and faecal samples. As soon as possible, the animals will be socially housed again. Before this will be done, it will be presented to the Animal Welfare Body (IvD) for approval.

During the entire study, all animals will be observed daily for general health and for possible local adverse reactions to the injected antibiotic.

1-Hansen, J.J. A novel approach to conducting metabolism studies allowing Non-Human primates to be group housed. Proceedings EPV Seminar 2019, Rome
2- Kendrick J, Stow R, Ibbotson N, et al. A novel welfare and scientific approach to conducting dog metabolism studies allowing dogs to be pair housed [published online ahead of print, 2020 Feb 16]. *Lab Anim.* 2020;23677220905330. doi:10.1177/0023677220905330

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

The goal of these studies are to describe the PK of selected antibiotics in macaques. The number of animals needed to estimate the average value of the PK parameters with an acceptable level of confidence is dependent on the expected magnitude of the inter-individual variability. With a sample of 4 animals, average PK parameter values will be estimated within half a standard deviation ($SE = SD/\sqrt{n}$). Since the animals for this study come from a relatively homogenous population of healthy adults with similar body condition, we can expect based on previous PK studies that the standard deviation will not exceed 20% of the parameter value. With 4 animals, we will therefore be able to estimate the average PK parameters within 10% of the actual value. The obtained data will be fit to a compartmental pharmacokinetic model using nonlinear mixed effects modeling whereby the samples from all the animals will be combined to describe the typical time-concentration profile as well as the inter-individual variability for the sample population of 4 animals.

B. The animals

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

Macaques are extensively used in biomedical research and our institute houses a big breeding colony (n=600). As there is a lack of information regarding efficacy of long-acting antibiotics in monkeys, we choose *Macaca mulatta* as target species.

Cynomolgus macaques are mainly imported from Asia and Mauritius, whereas breeding facilities in Europe, United States and Canada house predominantly rhesus macaques^{1,2}. Due to current (welfare) standards we will focus on these facilities. Subsequently, the welfare improvement accomplished by reducing treatment frequency by the use of long-acting antibiotics is most substantial in large breeding groups. In order to treat a patient, it is necessary to separate this individual from the breeding group. Separating an individual causes stress for the whole group. Administering long-acting antibiotics reduces treatment frequency and thus reducing the frequency of stress for the other individuals in this social group as well. For example, in a social group of 30 monkeys, one individual needs antibiotic treatment. Instead of a 5-day antibiotic course, the patient will be injected only once with a long-acting antibiotic. Consequently, this means a stress reduction of 4 days for 30 monkeys.

The experiment will be performed in clinically healthy, socially housed adult outbred Macaques (*Macaca Mulatta*). Animals originate from our institute's in-house breeding colony and will remain housed at the property. A complete physical, haematological, and biochemical examination will be performed on all animals prior to the study. Animals will be selected for a uniform nutritional status and body condition score of three.^{3,4} As there are no sex differences recorded in swine and cattle, we don't have sex preference. Adult animals are requested.

To test several long-acting antibiotics in a five-year period we request a maximum of 20 rhesus macaques. We will test at least three and maximal five long-acting antibiotics. The experiment will be stopped when we have three suitable antibiotics.

References

- 1- <https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/com-2020-16-f1-en-main-part-1.pdf>
- 2- Lankau EW, Turner PV, Mullan RJ, Galland GG. Use of nonhuman primates in research in North America. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2014;53(3):278-282.

- 3- Clingerman KJ, Summers L. 2005. Development of a body condition scoring system for nonhuman primates using *Macaca mulatta* as a model. *Lab Anim (NY)* 34:31–36.
- 4- Clingerman KJ, Summers L. 2012 Validation of a body condition scoring system in rhesus macaques (*Macaca mulatta*): inter- and intrarater variability *J Am Assoc Lab Anim Sci.* -

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.

- Animals that will be used in this experiment have possibly been used in previous experiments. Their cumulative discomfort will be taken into account. The expected discomfort in this study is moderate. Due the long life expectancy of macaques, the animals are returned to the experimental stock after this study.
- The limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven will be applied.

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

The body is very complex and the *in vivo* interactions are not completely understood. At present there is no *in vitro* model available that can mimic the (macaque) body system sufficiently. Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modelling is an *in silico* method used in toxicology and risk assessment to predict the kinetics of compounds in a new species. PBPK models often predict the pharmacokinetics of new compounds with an error that can be up to an order of magnitude. This makes PBPK models suitable for risk assessment and the determination of initial doses to be used for *in vivo* studies, but not for designing effective clinical dosage regimens in target animal species. Species-specific pharmacokinetic data are still needed for *in silico* PKPD modeling to identify effective antimicrobial dosage regimens. This is because there are many factors that can cause inter-species differences in the absorption and disposition of antimicrobials. Not all of these factors are known, nor have the inter-species differences in these factors been quantified. Physiologically-based pharmacokinetic modeling is a tool that is used in toxicology and for inter-species scaling to determine first in-human doses, but these doses still have to be confirmed. In contrast to toxicology where uncertainty can be incorporated into predictions to manage risk, pharmacology requires precise predictions to identify appropriate and effective dosage regimens.

In vivo studies describing the pharmacokinetics of a compound in the target animal remain the gold standard for dosage regimen design. To the authors' knowledge, there have been no pharmacokinetic studies of long-acting antibiotics in macaques other than 3rd generation cephalosporins mentioned previously.

The analyses of the complex microbiome and resistome also requires live donor animals because the complex microflora cannot be maintained *ex vivo*.

Determination of MIC₉₀ values are *in vitro* procedures and will be performed prior to the start of the study or will be extrapolated when the sensitivity of bacteria to the selected antibiotics have already extensively been studied.

Reduction

The PK data collected from the first two animals will be analysed using a non-linear mixed effects model. This model will then be used to predict the dosage regimen needed to achieve the target PK/PD index for that antibiotic. Two additional animals will be treated with this dosage regimen to validate the model. If the predicted dose is too high to be safely or practically administered to macaques, the study will be stopped for that particular antibiotic prior to treating the additional two animals. Regardless of the outcome, we intend to publish this data.

The processing of the acquired samples is complicated and involves many different stages. Therefore, the outcome will be too delicate and unreliable when we start with only one animal. In addition, when using one animal in the pilot there is risk of testing an outlier. By using 2 animals we obtain more reliable data that reflect the population better. Consequently, we are able to adjust the sample frequency in the other two animals to a minimum without compromising reliability of the obtained data. Therefore, we will start with two animals for each antibiotic.

Our aim is to find three suitable long-acting antibiotics for macaques in three different classes. With these classes of long-acting antibiotics we are able to treat the most common bacterial infections which demand treatment in macaques. Once we established this, the experiment will be stopped.

Refinement

Animals are trained to cooperate as much as possible for the procedures such as receiving sedation. In addition, we will use PK modelling to minimise the number of blood samples needed for analysis. Also, this study itself will contribute to refinement. A positive outcome can reduce stress caused by daily-dose treatment schedules.

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

Because the animals are under sedation after antibiotic administration for multiple blood samples in a relatively short period of time, the animals will receive tube feeding on that day to ensure they will not suffer from dehydration and a negative energy balance.

Animals will be housed with a socially compatible animal. There is an extensive program for enrichment in our institute that consists of playing material and methods to present food.

During the study, animals will be observed daily by qualified animal caretakers for general health and for possible adverse reactions to the injected antibiotic. Should changes occur in behaviour, appetite or stool a veterinarian will be consulted and measures will be discussed with the investigator and implemented. Possible local reactions on the injection site of the antibiotic will be recorded at multiple time points using a scoring system that includes redness, swelling and induration.

No adverse effects to the environment are expected.

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.

Not applicable

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.

Depending on the tested long-acting antibiotic tested, there is a possibility that the animals are experiencing pain after the procedure. For example, in dogs¹ and pigs² injection site pain has been described after oxytetracycline injections. In contrast, we used Tulathromycin off-label in some animals with multi-resistant bacterial infections and we did not see any adverse effects during treatment. However, swelling and redness of the injection site and/or intestinal dysbacteriosis might occur in any of the tested substances.

1-D.A.Y. Adawa, A.Z. Hassan S.U. Abdullah , A.B. Ogunkoya , J.B. Adeyanju & J.E. Okoro (1992) Clinical trial of long-acting oxytetracycline and piroxicam in the treatment of canine ehrlichiosis, *Veterinary Quarterly*, 14:3, 118-120, DOI: 10.1080/01652176.1992.9694345

2- XIA, W. GYRD-HANSEN, N. and NIELSEN, P. (1983), Comparison of pharmacokinetic parameters for two oxytetracycline preparations in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 6: 113-120. doi:10.1111/j.1365-2885.1983.tb00387.x

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

In case of a painful injection site, NSAID's will be administered. As mentioned before, the animals will be observed daily by qualified animal caretakers for general health and for possible adverse reactions to the injected antibiotic.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Possible adverse effects of antibiotics. However, generally not serious and they occur at a low frequency.
- Repeated sedation for blood sampling
- (Separation from its buddy for collection of daily produced urine and faeces, only as a last resort solution)

Explain why these effects may emerge.

- Systemic side effects of the injected antibiotics can be caused by individual hypersensitivity to a substance in the formulation (allergic reaction), local side effects can occur due to the nature of the formulation (components for slow release).
- Sedation can cause nausea and a temporarily decreased appetite

- (Conflicts after re-introduction in case pairhousing couldn't be maintained)

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

- Qualified caretakers will perform daily observations for two weeks post administration to specifically document any potential injection site reactions. The injections will be performed *lege artis*.
- Additionally, stool quality assessments will be obtained for two weeks post-administration using an objective faecal score to check for possible gastrointestinal side effects. These observations will be complimented by routine daily health monitoring throughout the treatment and washout periods for subjective appetite, hydration, and stool quality assessments.

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.

Indicate the likely incidence.

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').

IM and SC dosing under sedation: mild

Repeated blood sampling under sedation: moderate

Only when we have no other option:

Separation from its buddy for urine and faeces collection: moderate

The total amount of discomfort is estimated as moderate.

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.

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 bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD 10.2.g 202010886
2. Titel van het project: Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization.
3. Titel van de NTS: De farmacokinetiek van langwerkende antibiotica in makaken
4. Type aanvraag:
 - X nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: 10.2.g
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
 - mailadres contactpersoon: 10.2.g
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 03-09-2020
 - aanvraag compleet: 03-09-2020
 - in vergadering besproken: 10-09-2020 en 12-10-2020
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 21-09-2020 tot 02-11-2020 en van 12-11-2020 tot 02-12-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 02-11-2020 en 02-12-2020
 - advies aan CCD: 02-12-2020
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrondinformatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.

- Datum
- Plaats
- Aantal aanwezige DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager
- Gestelde vraag / vragen
- Verstrek(e) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 21-09-2020 en 12-11-2020
- Gestelde vraag/vragen: Nadere onderbouwing van de noodzaak om langwerkende antibiotica te gebruiken, de noodzaak om de juiste dosering middels experimenten in niet-humane primaten (NHP) te bepalen (*in silico* modelling als vervangingsalternatief), onderbouwing van het aantal te testen antibiotica en daarmee het aantal benodigde dieren en de criteria en go/no go beslissingen voor het testen van deze antibiotica, noodzaak om fecale en urine samples te verzamelen en noodzaak om dieren hiervoor tijdelijk alleen te huisvesten. Tevens werd gevraagd het belang van de studies nader toe te lichten en de NTS tekstueel aan te passen. Op 12-11-2020 werd een nadere uitleg gevraagd aangaande een aantal in de tekst aangebrachte veranderingen.
- Datum antwoord: 02-11-2020 en 02-12-2020
- Verstrek(e) antwoorden: Een nadere onderbouwing voor de noodzaak om langwerkende antibiotica toe te passen en een onderbouwing voor het aantal te testen antibiotica alsmede een

go/no go beslispunt zijn toegevoegd aan het projectvoorstel. De omvang van het probleem en daarmee het belang van dit onderzoek werd nader toegelicht. Ook werd in de bijlage nader onderbouwd waarom *in silico* modellering in dit geval niet als vervangingsalternatief kan dienen en waarom het noodzakelijk is om feces en urine samples te verzamelen. Verder enige tekstuele aanpassingen. Aanvullende veranderingen in de tekst ingediend op 02-12-2020.

- De antwoorden hebben wel 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. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren: De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen bacteriële infecties en toepassing van antibiotica voor de behandeling hiervan, onderzoek met NHP, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op het gebied van ontwerp van proeven inclusief de onderbouwing van de steekproefgrootte, de proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, de ethiek en van proefdieren en hun bescherming.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Er waren geen conflicterende belangen bij de beoordeling van dit voorstel.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. In dit project wordt onderzocht of bestaande langwerkende antibiotica voor bestrijding van bacteriële infecties ook in open langdurig in een effectieve concentratie in het bloed aanwezig blijven. Het einddoel is

het beschikbaar hebben van effectieve antibiotica die in sociaal gehuisveste apen kunnen worden toegepast, zodat stress door veelvuldig uitvangen bij de te behandelen dieren en de andere dieren van de groep vermeden kan worden. Daarnaast kan een zorgvuldig en effectief antibioticagebruik bijdragen aan het voorkomen van bacteriële resistentie tegen deze middelen.

De onderzoeker heeft nader toegelicht waarom alternatieve toedieningsvormen van antibiotica niet voldoen en waarom met *in silico* modellering niet de gewenste informatie verkregen kan worden en dus dierexperimenten noodzakelijk zijn. De onderzoeker heeft aannemelijk gemaakt waarom er drie klassen antibiotica getest moeten worden en geeft duidelijke criteria aan waaraan de antibiotica moeten voldoen om in aanmerking te komen om getest te gaan worden. Het project bevat één bijlage, waarin beschreven wordt met welke proefopzet de farmacokinetiek (PK) wordt bepaald, het effect op het microbioom en selectie van resistente bacteriën. Het is duidelijk welke handelingen de individuele dieren zullen ondergaan. De uitkomsten uit dit experiment zijn helder en meetbaar. Het aantal dieren dat gebruikt zal worden is realistisch ingeschat en voor zover mogelijk statistisch onderbouwd. Er zijn geen humane eindpunten te verwachten.

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 Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelestellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek' is in zoverre toepasbaar dat de resultaten van dit onderzoek zullen worden gebruikt bij de behandeling van bacteriële infecties in NHP. De proefdieren modelleren voor de eigen en verwante diersoorten.

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. Het hoofddoel van dit project is het bepalen van de PK van langwerkende antibiotica in NHP. Een ander doel is karakterisering van mogelijke veranderingen in het microbioom inclusief het optreden van

resistentie in de darmflora ten gevolge van het toedienen van deze antibiotica. Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van langwerkende antibiotica voor effectieve behandeling van bacteriële infectie in NHP. Er is een duidelijke relatie tussen het directe en het uiteindelijke doel. Er is momenteel onvoldoende informatie beschikbaar over daadwerkelijke werkingsduur van als langwerkend bekendstaande antibiotica in apen, noch over het mogelijke effect van de antibiotica op het microbioom van de darm en het ontstaan van bacteriële resistentie. Hierdoor zijn de toepassingsmogelijkheden momenteel beperkt en zou mogelijkerwijs een verkeerde dosering gebruikt kunnen worden. Het directe doel is helder beschreven en de experimenten zijn duidelijk uiteengezet.

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 project zijn 1) de proefdieren, 2) het onderzoeksveld en 3) de samenleving.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn:

De integriteit van de dieren in het voorgestelde project zal worden aangetast door de toediening van antibiotica en de bloedafnames. De dieren zullen hiervan stress ondervinden. Anderzijds leidt kennis over de toepasbaarheid en de juiste dosering voor gebruik van langwerkende antibiotica juist tot verbetering in de behandeling van bacteriële infecties bij NHP, waarbij na succesvol verloop van dit onderzoek dieren in kolonies van makaken (en andere NHP) minder stress zullen ondergaan omdat gekozen kan worden voor middelen die minder vaak hoeven te worden toegediend. Effecten op het microbioom of ontwikkeling van resistentie worden meegenomen als nevensdoelstelling.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld binnen de internationale research consortia en d.m.v. publicatie(s). Daarmee zal toepassing binnen andere instituten waar apen gehouden worden en mogelijk ook bij andere soorten NHP worden bevorderd.

Het belang voor de samenleving is dat door optimale toepassing van langwerkende antibiotica in NHP de kans op het ontstaan van resistentie verminderd wordt en daardoor mogelijke risico's voor de volksgezondheid geminimaliseerd worden.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken? Er zijn geen substantiële milieueffecten te verwachten binnen de kaders of ten gevolge van dit project.

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. De onderzoeksgroep heeft een ruime ervaring met PK studies en het werken met niet-humane primaten. Tevens zal worden samengewerkt met een ander instituut met expertise op het gebied van veterinaire farmacotherapie en farmacie.
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. Deze aanvraag bestaat uit één type proef. Hierbij wordt een langwerkend antibioticum eerst in twee dieren toegediend, waarna op een aantal tijdstippen bloed wordt verzameld voor PK analyse en feces voor bepaling van veranderingen in het microbioom en resistoom. Vervolgens wordt aan de hand van de verkregen data bepaald of aanpassing van de dosis nodig is en of deze aanpassing praktisch toepasbaar zal zijn. Indien dit niet het geval is dan wordt de studie gestopt. In het andere geval worden nog twee dieren met hetzelfde antibioticum behandeld om zodoende voldoende nauwkeurig de gemiddelde bloedwaarden van het antibioticum vast te kunnen stellen. Criteria voor selectie van de te testen antibiotica, alsmede beslismomenten die bepalen of testen van andere antibiotica nodig is, zijn toegevoegd aan de aanvraag. 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*).

- 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)

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op het feit dat zij ook de doelgroep voor de toepassing van de behandeling vormen. Verschillen in metabolisme tussen diersoorten maakt dat andere diersoorten niet in aanmerking komen om PK en de daarop gebaseerde juiste dosering in NHP vast te kunnen stellen. Ondanks het feit dat wereldwijd meer Java apen dan resus apen in biomedisch onderzoek worden gebruikt is hier gekozen voor testen in resus apen, omdat het beschikbaar hebben van langwerkende antibiotica met name van belang is bij toepassing in fokkolonies en in Europa, de Verenigde Staten en Canada deze fokkolonies voornamelijk uit resus apen bestaan. Tevens valt te verwachten dat de resultaten ook toepasbaar zullen zijn bij andere makaken soorten.

Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

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 huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III. Alleen indien het niet mogelijk blijkt te zijn om betrouwbare gegevens over uitscheiding in feces en urine te verkrijgen zal in afstemming met de IvD kunnen worden overgegaan tot tijdelijke individuele huisvesting van de dieren.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief voor de dieren is correct als matig ingeschat. Het ongerief zal vooral veroorzaakt worden door de veelvuldige bloedafname en sedatie die nodig zijn voor PK analyse. Wel zal door toepassing van

PK modelling het aantal bloedafnames tot het minimum beperkt worden.

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. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de toediening van antibiotica, frequente sedaties en bloedafnames en het geven van sondevoeding.
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. Het bereiken van een humaan eindpunt valt op basis van de beschreven handelingen niet te verwachten.
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. *In silico* technieken, zoals “physiologically based pharmacokinetic modelling” zijn bruikbaar om een initiële toe te dienen dosis vast te kunnen stellen, maar zijn niet precies genoeg om een effectieve minimale dosis in specifieke diersoorten vast te stellen. Ook zijn de verschillen in metabolisme en opname, distributie en eliminatie van de antibiotica tussen verschillende diersoorten te groot om op basis van een bij één diersoort vastgestelde optimale dosis te kunnen voorspellen wat de te gebruiken dosis in een andere diersoort moet zijn. Er zijn momenteel weinig gegevens beschikbaar over gebruik van langwerkende antibiotica in NHP. Daarnaast, zijn de effecten op het microbiom en resistoom niet afdoende *in vitro* te bestuderen, vanwege de complexiteit van het microbiom, de invloed van voedingspatronen en de interactie met de gastheer.
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. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Per te testen antibioticum worden maximaal 4 dieren gebruikt. Hierbij wordt een gefaseerde aanpak gevolgd om het aantal gebruikte dieren tot een minimum te beperken. Het antibioticum wordt eerst in twee dieren toegediend. Vervolgens wordt aan de hand van de verkregen data bepaald of aanpassing van de dosis nodig is en of deze aanpassing praktisch toepasbaar zal zijn. Indien dit niet het geval is dan wordt de studie gestopt. In het andere geval worden nog twee dieren met hetzelfde antibioticum behandeld om zodoende voldoende nauwkeurig de gemiddelde bloedwaarden van het antibioticum vast te kunnen stellen. Vanwege de te bestrijden verschillende bacterie klassen is het noodzakelijk om zowel een langwerkend penicilline, een macrolide als een tetracycline, dus drie typen antibiotica, te testen. Wanneer voor elk van deze drie typen na testen

een antibioticum met de gewenste eigenschappen is gevonden zullen er geen verdere experimenten worden gedaan.

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. De uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren. Dieren zijn zo veel mogelijk getraind om mee te werken aan bepaalde biotechnische handelingen zoals het ondergaan van verdoving, waardoor stress zo veel mogelijk wordt beperkt. Door toepassing van PK modelling bij de analyse van de data kan het aantal tijdstippen van bloedafname tot het minimum worden beperkt. Er is een uitgebreid verrijkingsprogramma binnen het instituut en dieren worden goed gemonitord wat betreft gedrag gedurende het gehele experiment. Als er dagelijkse verdovingen plaatsvinden krijgen de dieren extra voeding via een maagsonde. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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. N.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. In onderhavige projectaanvraag worden dieren van beide geslachten gebruikt.

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. N.v.t., de dieren zullen in leven blijven aan het einde van elke dierproef.

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. Hergebruik wordt toegepast, ook binnen dit project. Hergebruik zal plaats vinden binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke criteria ten aanzien van de dierproef.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? Naar de mening van de DEC beschrijft de niet-technische samenvatting het project inhoudelijk correct en in begrijpelijke taal.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het toekomstig adequaat kunnen toepassen van langwerkende antibiotica voor effectieve behandeling van bacteriële infectie in NHP het ongerief en de aantasting van integriteit dat de dieren uit deze aanvraag wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of *in silico* modellen?
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.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en autonomie in het geding, doordat de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel zullen ondergaan. De dieren krijgen langwerkende antibiotica per injectie toegediend en er zal regelmatig bloed worden afgenomen. Het toedienen van antibiotica tast de autonomie aan. Hetzelfde geldt voor sedaties en bloedafnames. Toedienen van antibiotica kan eventueel leiden tot veranderingen in het darm microbioom of resistoom. De welzijnsaantasting kan ook bestaan uit mogelijk incidenteel optredende lichte bijwerkingen van het middel. Ongerief en lijden zullen zo veel mogelijk worden beperkt. Daarmee resulteert dit onderzoek in maximaal matig ongerief voor de dieren.

Anderszins betekent het beschikbaar komen van gegevens over de juiste dosering voor toepassing

van langwerkende antibiotica in NHP dat bacteriële infecties bij NHP in de toekomst beter en met minder ongerief behandeld kunnen worden omdat er minder vaak noodzaak is tot uitvangen en antibiotica toediening. De noodzaak van de beschikbaarheid van goede antibiotische therapeutica houdt mede verband met de huisvesting van deze dieren in grote sociale groepen, vaak met toegang tot buitenverblijven. Dit komt hun welzijn ten goede. Met inachtneming van deze beste praktijken voor de houderij kunnen bacteriële infecties niet vermeden worden door huisvesting onder striktere hygiënische omstandigheden. Behandeling met antibiotica is naar schatting jaarlijks nodig bij 5 tot 15% van de in fokkolonies en dierentuinen gehouden NHP voor behandeling van bacteriële diarree, trauma en ziekte. Gezien het grote aantal wereldwijd gehouden dieren en het percentage te behandelen dieren is het beschikbaar komen van effectieve antibiotica die minder vaak hoeven te worden toegediend van duidelijk belang voor het welzijn van de dieren.

De waarde voor het onderzoeksveld is het verkrijgen van meer inzicht in PK en effecten op het microbioom en resistoom van langwerkende antibiotica bij NHP. Deze kennis is van belang voor het veld.

De waarde voor de maatschappij is dat door optimale toepassing van langwerkende antibiotica in NHP de kans op het ontstaan van resistentie verminderd wordt en daardoor mogelijke risico's voor de volksgezondheid geminimaliseerd worden. Deze risico's zijn echter niet heel groot en daarmee is dit van ondergeschikt belang.

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 concludeert dat de belangen van de in de toekomst tegen bacteriële infectie te behandelen NHP waarvoor dit onderzoek wordt uitgevoerd zwaarder wegen dan de aantasting van de belangen/waarden van de betrokken proefdieren binnen dit project.

De mate van ongerief binnen deze studie wordt voornamelijk bepaald door de frequente bloedafnames en de daarmee samenhangende noodzaak tot uitvangen. De overige handelingen

vormen maar een geringe belasting. Tevens is het aantal dieren dat in deze aanvraag wordt gebruikt gering ten opzichte van het aantal dieren dat wereldwijd in de toekomst door de hier verkregen resultaten beter behandeld kan worden. De doelstelling van dit project kan alleen met inzet van niet-humane primaten worden behaald.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door reeds eerder uitgevoerde PK studies en het werken met niet-humane primaten. Tevens wordt samengewerkt met een ander instituut met expertise op dit gebied. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat.

De 3V-principes worden gehonoreerd door het minimale aantal dieren te gebruiken dat tot relevante uitkomsten van het experiment leidt. Er is overwogen of vervanging door *in silico* modellering mogelijk is. Echter voor deze techniek zijn er onvoldoende *in vivo* data beschikbaar en eerder is gebleken dat er dusdanig grote diersoortverschillen zijn dat dit bij de doeldiersoort onderzocht moet worden. Verfijning wordt toegepast door dieren sociaal te huisvesten, het aantal bloedafnames tot het minimum te beperken, dieren te gebruiken die getraind zijn om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de verdoving en de dieren niet onnodig te laten lijden.

Dieren van beide geslachten zullen worden gebruikt. Het ongerief is maximaal matig en wordt voornamelijk veroorzaakt door de frequente sedaties. Humane eindpunten zijn niet te verwachten.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt. Het aantal dieren dat nodig is valt te rechtvaardigen.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te

weten...

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies 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. 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. Er zijn bij de beoordeling van dit project geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.

25 January, 2021

5

Dear members of the CCD,

First of all, thank you for reviewing our research proposal "Long-acting antibiotics in *Macaca mulatta*: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization"

(AVD^{10.2.g}202010886). We would like to emphasize that this project is in close collaboration with the ^{10.2.e}

Despite pharmacokinetic knowledge regarding the proposed groups of antibiotics, this information is limited in relation to long-acting antibiotics. We state that therefore it is not possible to use PBPK models to obtain the essential data needed for the proposed study. There are two methods by which pharmacokinetic data can be extrapolated from one species to another, allometric scaling and physiological models (PBPK models). Under certain, well-defined conditions, these methods can be used to make reasonably good predictions of pharmacokinetic parameter values in a new species. However, these predictions can only be used to calculate the initial dose for the first studies to be conducted in the new species. As mentioned in *Appendix 2 A. Experimental approach and primary outcome parameters*, this initial dose in rhesus macaques will be predicted with allometric scaling. The dosage regimen must then always be optimized by collecting pharmacokinetic data in the new species as well. This is because, in contrast to toxicological risk assessment where safety factors can be added to deal with uncertainty, successful pharmacotherapeutic outcomes require dosage regimens to be optimized to achieve target concentrations at the site of action for the required duration of treatment. Especially for antimicrobial treatment, it is important that dosage regimens are calculated for the target species based on accurate estimates of the relevant pharmacokinetic parameters to avoid selection and development of resistance.

There are many factors that make the pharmacokinetics of a drug in a new species unpredictable. For example, although the movement of drug molecules across the wall of the gastrointestinal tract by passive diffusion is similar across species because of the

universal nature of the biomembranes of intestinal epithelial barrier, the rate and extent of absorption is also dependent on inter-species differences in gastrointestinal pH, transit time, contents, and drug transporter and metabolic enzyme activity and expression. The influence of these factors depends on the physico-chemical characteristics of the drug and its affinity and interactions with drug transporters and metabolic enzymes. There is no such data available for the antibiotics of interest in macaques. The same is true for the processes governing distribution, metabolism and excretion.

In summary, species-specific pharmacokinetic studies are essential to collect the data needed to calculate safe and effective dosage regimens for long-acting antibiotics in the target species, i.e. in this case rhesus macaques.

We trust we have provided you with sufficient information.

Yours sincerely,

10.2 e



Advies aan CCD

B

Datum 27 januari 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202010886

Instelling: 10.2.g
Onderzoeker: 10.2.e
Project: Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization
Aanvraagnummer: AVD202010886
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC en aan de aanvrager.			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		20	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Niet menselijke primaten

Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization

Citaat: Traditionally animals were housed individually when determining excretion patterns. However, recent reports demonstrate that it is not always necessary to collect individual samples^{1,2}. This welfare improvement makes us highly motivated to house the animals in pairs during these PK studies. Because both animals will receive the same dosing and sampling scheme, there is no need for single housing. In principle, the animals will always be socially housed. However, in the unexpected event that the above-mentioned collection of samples during social housing fails during the first trial and we are not able to resolve the problem otherwise, we would like to house the animals individually for the period required to collect urine and faecal samples. As soon as possible, the animals will be socially housed again. Before this will be done, it will be presented to the Animal Welfare Body (IVD) for approval.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization

Rhesusapen (Macaca mulatta) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
Maatschappij	11.1 [REDACTED]

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Het DEC advies is volledig en kan als grondslag dienen voor het besluit.</p> <p>Citaat C9: Gebruik niet humane primaten en hergebruik. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op het feit dat zij ook de doelgroep voor de toepassing van de behandeling vormen. Verschillen in metabolisme tussen diersoorten maakt dat andere diersoorten niet in aanmerking komen om PK en de daarop gebaseerde juiste dosering in NHP vast te kunnen stellen. Ondanks het feit dat wereldwijd meer Java apen dan resus apen in biomedisch onderzoek worden gebruikt is hier gekozen voor testen in resus apen, omdat het beschikbaar hebben van langwerkende antibiotica met name van belang is bij toepassing in fokkolonies en in Europa, de Verenigde Staten en Canada deze fokkolonies voornamelijk uit resus apen bestaan. Tevens valt te verwachten dat de resultaten ook toepasbaar zullen zijn bij andere makaken soorten.</p> <p>Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.</p> <p>Citaat C10: De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III. Alleen indien het niet mogelijk blijkt te zijn om betrouwbare gegevens over uitscheiding in feces en urine te verkrijgen zal in afstemming met de IvD kunnen worden overgegaan tot tijdelijke individuele huisvesting van de dieren.</p> <p>Citaat C19: De dieren zullen in leven blijven aan het einde van elke dierproef.</p> <p>Citaat C20: Hergebruik wordt toegepast, ook binnen dit project. Hergebruik zal plaats vinden binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en</p>
-------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

wetenschappelijke criteria ten aanzien van de dierproef.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

1. Rechtvaardigt het toekomstig adequaat kunnen toepassen van langwerkende antibiotica voor effectieve behandeling van bacteriële infectie in NHP het ongerief en de aantasting van integriteit dat de dieren uit deze aanvraag wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of in silico modellen?

2. Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en autonomie in het geding, doordat de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel zullen ondergaan. De dieren krijgen langwerkende antibiotica per injectie toegediend en er zal regelmatig bloed worden afgenomen. Het toedienen van antibiotica tast de autonomie aan. Hetzelfde geldt voor sedaties en bloedafnames. Toedienen van antibiotica kan eventueel leiden tot veranderingen in het darm microbioom of resistoom. De welzijnsaantasting kan ook bestaan uit mogelijk incidenteel optredende lichte bijwerkingen van het middel. Ongerief en lijden zullen zo veel mogelijk worden beperkt. Daarmee resulteert dit onderzoek in maximaal matig ongerief voor de dieren.

Anderszins betekent het beschikbaar komen van gegevens over de juiste dosering voor toepassing van langwerkende antibiotica in NHP dat bacteriële infecties bij NHP in de toekomst beter en met minder ongerief behandeld kunnen worden omdat er minder vaak noodzaak is tot uitvangen en antibiotica toediening. De noodzaak van de beschikbaarheid van goede antibiotische therapeutica houdt mede verband met de huisvesting van deze dieren in grote sociale groepen, vaak met toegang tot buitenverblijven. Dit komt hun welzijn ten goede. Met inachtneming van deze beste praktijken voor de houderij kunnen bacteriële infecties niet vermeden worden door huisvesting onder striktere hygiënische omstandigheden. Behandeling met antibiotica is naar schatting jaarlijks nodig bij 5 tot 15% van de in fokkolonies en dierentuinen gehouden NHP voor behandeling van bacteriële diarree, trauma en ziekte. Gezien het grote aantal wereldwijd gehouden dieren en het percentage te behandelen dieren is het beschikbaar komen van effectieve antibiotica die minder vaak hoeven te worden toegediend van duidelijk belang voor het welzijn van de dieren.

De waarde voor het onderzoeksveld is het verkrijgen van meer inzicht in PK en effecten op het microbioom en resistoom van langwerkende

antibiotica bij NHP. Deze kennis is van belang voor het veld.

De waarde voor de maatschappij is dat door optimale toepassing van langwerkende antibiotica in NHP de kans op het ontstaan van resistentie verminderd wordt en daardoor mogelijke risico's voor de volksgezondheid geminimaliseerd worden. Deze risico's zijn echter niet heel groot en daarmee is dit van ondergeschikt belang.

3. De DEC concludeert dat de belangen van de in de toekomst tegen bacteriële infectie te behandelen NHP waarvoor dit onderzoek wordt uitgevoerd zwaarder wegen dan de aantasting van de belangen/waarden van de betrokken proefdieren binnen dit project.

De mate van ongerief binnen deze studie wordt voornamelijk bepaald door de frequente bloedafnames en de daarmee samenhangende noodzaak tot uitvangen. De overige handelingen vormen maar een geringe belasting. Tevens is het aantal dieren dat in deze aanvraag wordt gebruikt gering ten opzichte van het aantal dieren dat wereldwijd in de toekomst door de hier verkregen resultaten beter behandeld kan worden. De doelstelling van dit project kan alleen met inzet van niet-humane primaten worden behaald.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door reeds eerder uitgevoerde PK studies en het werken met niet-humane primaten. Tevens wordt samengewerkt met een ander instituut met expertise op dit gebied. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat.

De 3V-principes worden gehonoreerd door het minimale aantal dieren te gebruiken dat tot relevante uitkomsten van het experiment leidt. Er is overwogen of vervanging door in silico modellering mogelijk is. Echter voor deze techniek zijn er onvoldoende in vivo data beschikbaar en eerder is gebleken dat er dusdanig grote diersoortverschillen zijn dat dit bij de doeldiersoort onderzocht moet worden. Verfijning wordt toegepast door dieren sociaal te huisvesten, het aantal bloedafnames tot het minimum te beperken, dieren te gebruiken die getraind zijn om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de verdoving en de dieren niet onnodig te laten lijden.

Dieren van beide geslachten zullen worden gebruikt. Het ongerief is maximaal matig en wordt voornamelijk veroorzaakt door de frequente sedaties. Humane eindpunten zijn niet te verwachten.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt. Het aantal dieren dat nodig is valt te rechtvaardigen.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Aan de aanvrager zijn vragen gesteld over, citaat: nadere onderbouwing van de noodzaak om langwerkende antibiotica te gebruiken, de noodzaak om de juiste dosering middels experimenten in niethumane primaten (NHP) te bepalen (in silico modellering als vervangingsalternatief), onderbouwing van het aantal te testen antibiotica en daarmee het aantal benodigde dieren en de criteria en go/no go beslissingen voor het testen van deze antibiotica, noodzaak om fecale en urine samples te verzamelen en noodzaak om dieren hiervoor tijdelijk alleen te huisvesten. Tevens werd gevraagd het belang van de studies nader toe te lichten en de NTS tekstueel aan te passen.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld.

U benoemt bij C9, C10 en C19 duidelijk het gebruik van NHP, huisvesting wat eventueel kan afwijken van de richtlijn en hergebruik van dieren. De mening van de DEC ontbreekt hier echter bij. De CCD zou wel graag de mening van de DEC willen horen.

De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

De CCD waardeert het dat u minder dan 20 werkdagen nodig heeft gehad om tot uw advies te komen.

4 Inhoudelijke beoordeling

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat: The main objective of this study is to assess the pharmacokinetics of antibiotics in macaques to identify those with longer half-lives requiring less frequent administration, and to characterize expected microbiome and resistome shifts in the bacterial gut population in macaques as a result of the administration of these antibiotics.</p>
<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat: Macaques are difficult to handle for daily injections and are notorious for trying to avoid medicated food. Furthermore, separating an animal from its group to achieve either of the two may have serious social consequences.</p> <p>Moreover, there are no registered medicines for primates so the off-label use of medication is common practice for zoo and wildlife veterinarians. Dosages are often based on extrapolation from dosages of domesticated species or guesstimates, potentially leading to over or under dosing, which is a risk in health management of the monkeys.¹ Underdosage is a major hazard in development of bacterial resistance against certain antimicrobials.</p> <p>In addition, the only proven efficacy of a long-acting antibiotic is ceftiofur and this is a third line antimicrobial. Regarding the WVAB, first and second line antibiotics are preferable². Therefore, veterinarians need a more comprehensive list of antibiotics to treat macaques effectively and to minimise the risk of development of bacterial resistance while doing so.</p> <p>A dosing interval of 2 to 5 days for treatment of bacterial infections in macaques would greatly reduce the need to handle and restrain the macaques, thereby, decreasing stress (3R's Refinement). A multiday treatment with one injection ensures administration of a full course of treatment. Our results will not only be important for animal health management programmes, but also for all veterinary practice regarding monkeys. We will publish our data which can be used by other zoo- and wildlife veterinarians.</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>11.1</p>
<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat C7 uit het DEC advies: De onderzoeksgroep heeft een ruime ervaring met PK studies en het werken met niet-humane primaten. Tevens zal worden samengewerkt met een ander instituut met expertise op het gebied van veterinaire farmacotherapie en farmacie.</p> <p>11.1</p>

3V's

Vervanging	<p>3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization: Citaat: The body is very complex and the in vivo interactions are not completely understood. At present there is no in vitro model available that can mimic the (macaque) body system sufficiently. Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modelling is an in silico method used in toxicology and risk assessment to predict the kinetics of compounds in a new species. PBPK models often predict the pharmacokinetics of new compounds with an error that can be up to an order of magnitude. This makes PBPK models suitable for risk assessment and the determination of initial doses to be used for in vivo studies, but not for designing effective clinical dosage regimens in target animal species. Species-specific pharmacokinetic data are still needed for in silico PKPD modeling to identify effective antimicrobial dosage regimens. This is because there are many factors that can cause inter-species differences in the absorption and disposition of antimicrobials. Not all of these factors are known, nor have the inter-species differences in these factors been quantified. Physiologically-based pharmacokinetic modeling is a tool that is used in toxicology and for inter-species scaling to determine first in-human doses, but these doses still have to be confirmed. In contrast to toxicology where uncertainty can be incorporated into predictions to manage risk, pharmacology requires precise predictions to identify appropriate and effective dosage regimens.</p> <p>In vivo studies describing the pharmacokinetics of a compound in the target animal remain the gold standard for dosage regimen design. To the authors' knowledge, there have been no pharmacokinetic studies of long-acting antibiotics in macaques other than 3rd generation cephalosporins mentioned previously.</p> <p>The analyses of the complex microbiome and resistome also requires live donor animals because the complex microflora cannot be maintained ex vivo. Determination of MIC90 values are in vitro procedures and will be performed prior to the start of the study or will be extrapolated when the sensitivity of bacteria to the selected antibiotics have already extensively been studied</p>
------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Verminderen	<p>3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization: Citaat: The PK data collected from the first two animals will be analysed using a non-linear mixed effects model. This model will then be used to predict the dosage regimen needed to achieve the target PK/PD index for that antibiotic. Two additional animals will be treated with this dosage regimen to validate the model. If the predicted dose is too high to be safely or practically administered to macaques, the study will be stopped for that particular antibiotic prior to treating the additional two animals. Regardless of the outcome, we intend to publish this data.</p> <p>The processing of the acquired samples is complicated and involves many different stages. Therefore, the outcome will be too delicate and unreliable when we start with only one animal. In addition, when using one animal in the pilot there is risk of testing an outlier. By using 2 animals we obtain more reliable data that reflect the population better. Consequently, we are able to adjust the sample frequency in the other two animals to a minimum without compromising reliability of the obtained data. Therefore, we will start with two animals for each antibiotic.</p> <p>Our aim is to find three suitable long-acting antibiotics for macaques in three different classes. With these classes of long-acting antibiotics we are able to treat the most common bacterial infections which demand treatment in macaques. Once we established this, the experiment will be stopped.</p>
Verfijnen	<p>3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization: Citaat: Animals are trained to cooperate as much as possible for the procedures such as receiving sedation. In addition, we will use PK modelling to minimise the number of blood samples needed for analysis. Also, this study itself will contribute to refinement. A positive outcome can reduce stress caused by daily dose treatment schedules.</p>
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization: Citaat:

Animals that will be used in this experiment have possibly been used in previous experiments. Their cumulative discomfort will be taken into account. The expected discomfort in this study is moderate. Due the long life expectancy of macaques, the animals are returned to the experimental stock after this study.

The limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven will be applied.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization	Nee	

Naam proef		
3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization	HEP: Worden niet verwacht	
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

In deze aanvraag zal gebruik worden gemaakt van niet humane primaten. Hierdoor zal ook de voorwaarde van beoordeling achteraf moeten worden opgenomen in de beschikking.

De dieren die worden gebruikt in deze proef kunnen al zijn ingezet in een voorgaande proef. Hergebruik zal plaatsvinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven. Het Secretariaat vindt 11.1

De dieren zullen samen worden gehuisvest. Indien het verzamelen van urine en feacale samples toch niet zou lukken dan worden de dieren voor de periode van het verzamelen van de samples individueel gehuisvest. Het Secretariaat

vindt 11.1

De dieren zullen niet worden gedood aan het einde van de proef.

Het matige ongerief dat de dieren ondergaan zal worden veroorzaakt door het veelvuldig afnemen van bloed. De aanvrager zegt over het aantal samples, citaat: 'A total of 10 to 12 samples distributed over several days is typical, to be extended in case of repeated dosing to 10 days and several more samples'. Het afnemen van het bloed zal onder anesthesie gebeuren.

Uiteindelijk zullen de resultaten van deze aanvraag zorgen voor een verfijning. De dieren zullen in de toekomst minder stress ondergaan omdat een langwerkend antibioticum minder vaak toegediend hoeft te worden, met minder uitvangen uit de groep, en lagere frequentie van toedieningstechnieken als gevolg.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat 11.1

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2026 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g
10.2.e
10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 10.2.g 202010886
Bijlagen
3

Datum 28 januari 2021
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 4 september 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202010886. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 28 januari 2021 tot en met 31 oktober 2025.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2026 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Datum:
28 januari 2021
Aanvraagnummer:
AVD 10.2.g 202010886

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 10.2.g (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 2 december 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 11 januari 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op PBPK modellering. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d van de wet. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2026 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Aanvullende opmerkingen

U heeft aangegeven dat u thans nog niet in staat bent om de toepassing van PBPK-modellen in dit onderzoek te gebruiken. De uit de nu vergunde studies verkregen resultaten kunnen daarom in de toekomst aanleiding zijn voor het toepassen van dergelijke modellen, waarmee in ieder geval een vermindering of zelfs wellicht een vervanging van in vivo studies kan worden bereikt.

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 93118, 2509 AC 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Datum:

28 januari 2021

Aanvraagnummer:

AVD **10.2.g** 202010886

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

10.2.g

deze projectvergunning voor het tijdvak 28 januari 2021 tot en met 31 oktober 2025, voor het project "Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202010886, na advies van dierexperimentencommissie 10.2.g. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.e. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 4 september 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 3 december 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization, zoals ontvangen op 3 december 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 3 december 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 2 december 2020
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 25 januari 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Long-acting antibiotics in Macaca mulatta: Pharmacokinetics, microbiome and resistome characterization			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	20	100,0% Matig

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2026 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.

Aanvraagnummer: AVD10.2.0 202010886

- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 202010886

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:

AVD 10.2.0 202010886

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

Einde van een dierproef

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

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

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

In artikel 13d van de wet 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.

Levensloofdossier

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primaat moet volgens artikel 15a van de wet een levensloofdossier bijgehouden worden.

Niet-menselijke primaten

De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e, zevende lid van de wet, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die

Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 202010886

leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.



Dit is een kopie van het CCD formulier, waarbij de invulvelden niet beveiligd zijn. Voor indiening bij de CCD moet de door de DEC goedgekeurde versie in het CCD formulier worden overgezet.
Versie CCD formulier dd. 2016-03-02

Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project

De farmacokinetiek van langwerkende antibiotica in makaken

1.2 Looptijd van het project (BEGIN- EN EINDDATUM)

November 2020-Oktober 2025

1.3 Trefwoorden (maximaal 5)

Apen, welzijnsverbetering, verfijning, langwerkend antibioticum, resistentie

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project. Fundamenteel onderzoek

Translationeel of toegepast onderzoek

Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van

Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort

Hoger onderwijs of opleiding

Forensisch onderzoek

Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project

(bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)

Het is moeilijk om aan bacteriële infectie lijdende apen in groepshuisvesting te behandelen met antibiotica. De meeste antibioticakuren moeten dagelijks, gedurende meerdere dagen, worden toegediend. Het vangen van de apen voor het toedienen van een injectie geeft veel stress voor het individu en voor de rest van de groep. Bovendien wordt orale medicatie vaak geweigerd of onvolledig ingenomen. Een antibioticum dat langer werkt en dus minder vaak gegeven hoeft te worden, geeft daarom veel welzijnsverbetering voor het individu en ook voor de groep als geheel. Deze langwerkende antibiotica zijn niet geregistreerd voor gebruik in apen. Ze zijn getest in andere diersoorten. Er wordt

aangenomen dat deze middelen werken in apen, maar daar is vaak geen bewijs voor. Als dieren worden behandeld met antibiotica die niet of onvolledig werken, wordt de ziekte niet effectief behandeld en kunnen bacteriën ongevoelig raken voor antibiotica. Dieren kunnen deze ongevoelige bacteriën op mensen overdragen, het is dan mogelijk dat een bepaald antibioticum ook niet meer bij mensen werkt.

Er is op dit moment maar één langwerkend antibioticum waarvan de werkzaamheid is bepaald in resusapen. Dit middel is echter in de humane gezondheidszorg gereserveerd voor de behandeling van multi-resistente bacteriële infecties en is daarom ook een heel belangrijk antibioticum voor mensen. Dit middel mag daarom slechts onder hele strenge voorwaarden gebruikt worden bij dieren. Daarnaast is niet elke bacterie gevoelig voor hetzelfde antibioticum. Het is erg belangrijk dat wij over meerdere antibiotica beschikken, om de verschillende bacteriën te kunnen bestrijden. Bij voorkeur zijn dit antibiotica die voor mensen zo min mogelijk van belang zijn.

Dit project zal informatie geven over de Farmacokinetiek bij apen van de te onderzoeken antibiotica. De farmacokinetiek beschrijft de processen waaraan een werkzame stof in het lichaam wordt onderworpen. Deze processen zijn; opname van een stof, verdeling in het lichaam en verwijdering van een stof uit het lichaam .

Het gebruik van langwerkende antibiotica in de goede dosering, met de juiste toedieningsfrequentie voorkomt onnodig lijden. Deze studie is daarom van belang voor alle dierenartsen die met makaken werken.

Het doel van het project is het vaststellen van werkzame doseringsschema's voor verschillende langwerkende antibiotica bij makaken. Daarnaast willen we in kaart brengen hoe de natuurlijke bacteriële darmflora (microbioom) onder invloed van antibioticatherapie verandert en of er resistentie binnen deze flora (resistoom) optreedt.

Dit project draagt direct bij aan het doeltreffend gebruik van antibiotica in de aap en mogelijk het voorkomen van resistentie-ontwikkeling.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

De opbrengst van dit project is het beschikbaar hebben van een langwerkend antibioticum dat in de juiste dosering gebruikt kan worden in apen, zodat veelvuldige toediening en stress daardoor voorkomen kan worden. Dit zal wereldwijd voor alle instellingen en dierentuinen die met makaken werken een stressreductie betekenen tijdens behandelingen. Stressreductie is belangrijk, stress kan namelijk immuunsysteem onderdrukken. Om een infectie succesvol en met zo min mogelijk stress te kunnen behandelen, willen we weten of de gekozen antibiotica werkzaam zijn in makaken. Omdat we ook het microbioom en resistoom bekijken, geeft dit project ook inzicht in eventuele resistentie ontwikkeling die gedurende de behandeling kan optreden.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Resus makaken, maximaal 20 over een periode van maximaal 5 jaar.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Kans op weefselreactie na injectie, ongemak van sedatie en bloedafnames.

Mocht het bepalen van de uitscheidingsroutes en uitscheidingsduur van het middel onverwacht niet mogelijk zijn bij duo-huisvesting, dan zullen in een uitzonderlijk geval de dieren individueel gehuisvest worden voor een beperkte duur.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Matig

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Na afloop van de studie zullen de dieren deel blijven uitmaken van de kolonie van het instituut.



4 Drie V's

4.1 Vervanging

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

Het lichaam is erg complex en veel interacties begrijpen we nog niet. Op dit moment is er geen in vitro model dat de werking van het makaken-lichaam kan imiteren. In vitro computer modellen kunnen een initiële dosis in een nieuw doeldier voorspellen. Echter, dit zijn zeer ruime voorspellingen die ongeschikt zijn voor het vaststellen van effectieve klinische dosering regimes. Voor het bepalen van het complexe microbiom en resistoom is ook een levende dier nodig. De minimale werkzame concentratie antibiotica tegen een bepaalde bacterie wordt wel in vitro vastgesteld.

4.2 Vermindering

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

Naast de ervaringen binnen het instituut maken we gebruik van rekenmodellen. De verkregen data wordt in rekenmodellen gezet. Als bij het eerste duo blijkt dat de initiële dosis niet afdoende was, kunnen we met dit model voorspellen of een werkzame dosis wel haalbaar gaat zijn. Zo voorkomen we dat er nog 2 extra dieren gebruikt moeten worden om het model te valideren.

4.3 Verfijning

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

Makaken worden veel gebruikt in de onderzoekswereld en zijn ook in dierentuinen alom vertegenwoordigd. Er is een groot gebrek aan kennis omtrent antibioticumgebruik in apen. Met deze studie hopen wij dat hiaat aan kennis op te vullen. Door het toepassen van PK modellering wordt het aantal tijdpunten van bloedafname tot een minimum beperkt. Daarnaast worden de dieren getraind om vrijwillig mee te werken aan de verdoving. Ook het project zelf draagt bij aan verfijning omdat langwerkende antibiotica dierwelzijn verbeteren zoals uitgelegd in 3.1.

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

Alle handelingen worden uitgevoerd onder verdoving. De dieren worden getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de verdoving. Tijdens de studie worden de dieren dagelijks intensief geobserveerd. Eventuele bijwerkingen worden genoteerd. Om de dieren zo veel mogelijk natuurlijk gedrag te laten vertonen is er een uitgebreid kooiverrijkingprogramma.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen
