



# Zorgvuldige weging van methoden voor identificatie en genetische karakterisatie



## Het NCad en haar werkwijze

Het Nationaal Comité advies dierproevenbeleid (NCad) is ingesteld voor de bescherming van dieren die worden gebruikt voor wetenschappelijke doeleinden en voor onderwijs. Door advies, kennisuitwisseling en het ontwikkelen van (inter)nationale netwerken wil het NCad een belangrijke bijdrage leveren aan het minimaliseren van het proefdiergebruik, zowel nationaal als internationaal. De ethische toetsing van dierproeven en het Vervangen, Verminderen en verfijnen (3V's) daarvan staan daarbij centraal.

### *Leden NCad*

Henk Smid (voorzitter), Reineke Hamelers, Monique Janssens, Coenraad Hendriksen, Jan-Bas Prins, Pieter Roelfsema, Wim de Leeuw

### **Contactgegevens**

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid

Postbus 93118 | 2595 AL Den Haag

Mail: [ncad@minezk.nl](mailto:ncad@minezk.nl) | Website: [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

*Coverbeeld:*

*Het beperken en het snijden van de distale falanx van zeven dagen oude muispup*

Beeld van Dagmar Schaefer, Zürich

# Inhoud

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Samenvatting</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Aanleiding</b>  | <b>6</b>  |
| <b>Inleiding</b>   | <b>7</b>  |
| <b>Alternatieve methoden</b>   | <b>14</b> |
| <b>De bijdrage van het NCad</b>  | <b>16</b> |
| <b>Conclusies</b>  | <b>19</b> |
| <b>Bijlage: Overzicht van identificatie- en karakterisatiemethoden</b> | <b>21</b> |

# Samenvatting

In oktober 2018 heeft de minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit het NCad verzocht om op basis van eerdere onderzoekbevindingen en bestaande richtsnoeren een advies uit te brengen over het gebruik van de teenknip.

Bij genetisch gemodificeerde (GM)-muizen wordt de teen(koot)knip maar ook de oorknip als methoden toegepast ter identificatie en voor genetische karakterisatie. Deze methoden worden bij voorkeur ruim vóór de speenleeftijd uitgevoerd, zodat genotyperingsresultaten vóór de speenleeftijd bekend zijn.

Om één van beide methoden te diskwalificeren ten opzichte van de andere, worden vaak dezelfde argumenten gebruikt zoals de mate van ongerief en stress, de consequenties van het mutileren van een lichaamsdeel en de leeftijd waarop de handeling wordt verricht. Vanwege de zeer geringe grootte van de pup op het moment van de teenkootknip blijkt in de praktijk dat de poging om alleen het laatste kootje af te knippen erin resulteert dat het grootste deel van de teen wordt verwijderd. Daarom wordt hierna gesproken over teenknip. Andere methoden om dieren te karakteriseren zijn het opvangen van keutels, afnemen van wangslimvlies, oogvocht of een rectale swab en het uittrekken van haar met haarzakje. Methoden om dieren te identificeren zijn het wegscheren van vacht, het aanbrengen van stiftmarkeringen, metalen of plastic oormerken, onderhuidse inktmarkering, tatoeage, het inbrengen van een onderhuidse chip of individuele huisvesting.

De methoden voor karakterisatie en/ of identificatie kunnen op basis van drie criteria worden ingedeeld:

- invasief of niet invasief
- alleen identificatie of alleen genetische karakterisatie of beide in één handeling;
- tijdelijke of permanente markering ter identificatie.

Genetische karakterisatie (genotypering) is niet noodzakelijk bij niet-genetisch-gemodificeerde dieren. In die gevallen kan worden volstaan met enkel identificatie van het individuele dier wanneer dat in een experiment wordt genomen.

Alle huidige identificatiemethoden die tijdelijk zijn, zijn niet-invasief en degene die permanent zijn, zijn invasief.

Er bestaan momenteel geen niet-invasieve methoden om dieren in één en dezelfde handeling te karakteriseren en te merken ter identificatie. Wel is het mogelijk om niet-invasieve karakterisatiemethoden en niet-invasieve identificatiemethoden te combineren. De combinatiehandeling leidt tot het vaker moeten hanteren en fixeren van ieder individueel dier en met name het fixeren van een dier veroorzaakt veel stress. De combinatiehandeling moet worden aangemerkt als dierproef wanneer deze een aantasting van het welzijn van de dieren veroorzaakt die gelijk of meer is dan de bij wet vastgestelde ondergrens.

Een dergelijke combinatiehandeling kan zowel vóór als ná speenleeftijd plaatsvinden met in achtneming van best practices.

Er is tegenstrijdige informatie over de impact op het dier bij de uitvoering van de verschillende vormen van karakterisatie en identificatie.

Ook ontbreken goede indicatoren om wetenschappelijk onderbouwd de welzijnsaantasting van de teen- en de oorknip in te schatten. Er is wel bewijs dat er welzijnsaantasting is maar niet of de ene methode meer aantasting geeft dan de andere. Op grond van het bovenstaande kan noch een verbod op de teenknip en/of de oorknip, noch het toestaan van beide, voldoende wetenschappelijk worden gemotiveerd.

Echter, het NCad acht het plausibel dat een combinatie van niet-invasieve methoden minder welzijnsaantasting veroorzaakt dan de invasieve methoden.

Het is de verantwoordelijkheid van de betrokken partijen om telkens opnieuw een zorgvuldige afweging te maken met betrekking tot de keuze van de in de voorliggende situatie meest geschikte identificatie- en karakterisatiemethoden, waarbij aspecten meegenomen dienen te worden van aantasting van integriteit, aantasting van welzijn en verbeteren van kwaliteit van wetenschap.

Het ministerie van LNV en het Ministerie van Onderwijs, Cultuur en Wetenschap (OC&W) wordt geadviseerd een concreet project uit te (laten) zetten met de opdracht om combinaties van duurzame niet-invasieve identificatie- en karakterisatiemethoden te ontwikkelen, waarbij de integriteit en het welzijn van het dier niet of minimaal wordt aangetast. En nader onderzoek te verrichten naar innovatieve technieken om dieren te kunnen identificeren en karakteriseren, zoals 'individuele gezichtsherkenning' en DNA-isolatie en analysetechnieken. Tevens dient in de evaluatie van de Wet op de dierproeven aandacht te worden besteed aan de impact op het welzijn en de integriteit van proefdieren van handelingen die buiten de definitie van dierproef vallen, maar er wel direct verband mee houden.

# Aanleiding

Het NCad heeft in oktober 2018 van de Minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) een verzoek om advies ontvangen inzake het gebruik van de teenknip bij knaagdieren. In deze brief werd aangegeven dat de Tweede Kamer de regering verzocht<sup>1</sup> heeft in te zetten op uitfasering van de teenknip als identificatiemethode bij proefdieren. Daarop heeft de minister geantwoord de teenknip te willen verbieden mits er een volwaardig alternatief voorhanden is.

Het NCad is tevens verzocht om te inventariseren in hoeverre in andere Europese lidstaten alternatieven gebruikt worden voor zowel genetische karakterisatie<sup>2</sup> (genotypering) als individuele identificatie van knaagdieren. Ook is het NCad verzocht om de bevindingen van deze inventarisatie te gebruiken voor het opstellen van een Code of Practice. Het Ministerie van LNV geeft aan dat als uitgangspunt gehanteerd moet worden dat bij een dier geen onnodige pijn of onnodig letsel mag worden veroorzaakt<sup>3</sup> en een methode niet mag worden uitgevoerd als er een 3V alternatief aanwezig is.

Er dient een zorgvuldige afweging plaats te vinden welke methode voor identificatie en/of genotypering voor welk type onderzoek daadwerkelijk noodzakelijk is en daarbij het minst belastend is voor het dier.

Vervolgens dienen de handelingen bij het dier op een zo verantwoord mogelijke manier te worden uitgevoerd. Het Ministerie geeft aan, dat het NCad bij de uitwerking eerdere onderzoeksbevindingen<sup>13,14</sup> en bestaande richtsnoeren<sup>4</sup> als startpunt kan gebruiken.

---

<sup>1</sup> Gewijzigde motie van het lid Ouwehand ( t.v.v. 33692, nr. 36) over uitfasering van de teenknip;

<sup>2</sup> Hiermee wordt bedoeld: het afnemen van een monster dat geschikt is om genetische karakterisatie uit te voeren

<sup>3</sup> Besluit Diergeneeskundigen, artikel 2.6

<sup>4</sup> Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification; Laboratory Animals 2013; 47: 2–11. DOI: 10.1177/002367712473290

# Inleiding

Bij genetisch gemodificeerde (GM)-muizen wordt de teen(koot)knip als één van de methoden toegepast ter identificatie en genetische karakterisatie.

Genetische karakterisatie (genotypering) is niet noodzakelijk bij niet-genetisch-gemodificeerde dieren. In die gevallen kan worden volstaan met enkel identificatie van het individuele dier wanneer dat in een experiment wordt genomen.

De fok van GM-muizen is erop gericht muizen te verkrijgen die de gewenste genetische modificatie bezitten. Volgens de wetten van overerving (Mendel) erft maar een deel van de gefokte pups de genetische modificatie van de ouderdieren. Om te bepalen welke pups drager zijn van de gewenste genetische modificatie, wordt op jonge leeftijd een weefselbiopt genomen waaruit het DNA wordt geïsoleerd en geanalyseerd op de aanwezigheid van de genetische modificatie. Dit proces wordt genetische karakterisatie of genotypering genoemd. In de praktijk wordt karakterisatie veelal gecombineerd met identificatie door het teen- of oorweefsel dat verwijderd wordt te gebruiken voor karakterisatie. Het afnemen van het weefselbiopt wordt gedaan bij pups ruim voordat ze de speenleeftijd (21 dagen oud) bereikt hebben. Deze handeling is geen dierproef in de zin van de wet<sup>5</sup>. Dieren met een voor het experiment of de fok ongeschikt DNA-profiel worden vervolgens nog vóór de speenleeftijd gedood en tellen dientengevolge niet mee voor de proefdierregistratie.

Om de uitslag van de genetische karakterisatie aan het juiste dier te kunnen koppelen moet de afname van het weefsel vergezeld gaan van een unieke identificatie van het dier. De unieke identificatie moet herkenbaar blijven ten minste zolang de kans op verwarring met dieren met een ander genotype reëel is. Dat is onder andere afhankelijk van de opzet van de experimenten waarvoor de dieren gefokt zijn en de eisen die aan de dieren gesteld worden voor wat betreft benodigde genotypes, geslacht en leeftijd waarop de dieren in experiment genomen worden. De praktijk is dat voor de gelijktijdige identificatie en karakterisatie van GM-dieren een biopt van het oor (oorknip) of de teen (teenkootknip) wordt gebruikt.

In 2013 publiceerde de Federation for European Laboratory Animal Science Associations, FELASA, een richtlijn voor de verfijning van karakterisatiemethoden voor GM-muizen<sup>4</sup>. De richtlijn adviseert het gebruik van de teenkootknip<sup>6</sup>, waarbij het laatste (distale) kootje van

---

<sup>5</sup> Wod, artikel 1b.7<sup>e</sup>: deze wet is niet van toepassing op praktijken die als hoofddoel hebben het identificeren van dieren

<sup>6</sup> Alleen het laatste kootje wegnemen van een teen van maximaal twee poten bij pups op een leeftijd van 7 dagen

maximaal twee tenen van verschillende poten wordt afgeknipt, in plaats van de teenknip. Echter, vanwege de zeer geringe grootte van de pup op het moment van de teenkootknip blijkt in de praktijk dat de poging om alleen het laatste kootje af te knippen erin resulteert dat het grootste deel van de teen wordt verwijderd. Daarom wordt hierna gesproken van teenknip.

Bij de uitvoering van de oorknip worden één of meer driehoekjes of rondjes uit één of beide oren geknipt of geponst. Deze techniek wordt net zoals de teenknip, bij voorkeur ruim vóór de speenleeftijd uitgevoerd, zodat genotyperingsresultaten vóór de speenleeftijd bekend zijn.

Daarnaast zijn er methoden om een dier genetisch te karakteriseren zonder dat het dier met dezelfde ingreep gemerkt wordt voor unieke identificatie achteraf. Het heeft echter geen zin om een monster bij een dier af te nemen om het dier genetisch te karakteriseren zonder dat het resultaat onomstotelijk herleidbaar is tot dat dier. Vandaar dat het alleen zinvol is genetisch te karakteriseren als het dier tevens wordt gemerkt ter identificatie.

Er zijn verschillende methoden om dieren te merken ter identificatie. Een uitgebreide beschrijving van identificatiemethoden is te vinden in de bovengenoemde FELASA-richtlijn.

De methoden voor karakterisatie en/ of identificatie zijn als volgt onder te verdelen:

- invasief of niet invasief (het lichaam binnendringend of niet);
- alleen identificatie, alleen genetische karakterisatie of beide in één handeling;
- tijdelijke of permanente markering ter identificatie.

Alle huidige identificatiemethoden die tijdelijk zijn, zijn niet-invasief en degenen die permanent zijn, zijn invasief.

Er bestaan momenteel geen niet-invasieve methoden om dieren in één en dezelfde handeling te karakteriseren en te merken ter identificatie. Wel is het mogelijk om niet-invasieve karakterisatie- en identificatiemethoden te combineren (zie tabel 1). De combinatiehandeling moet worden aangemerkt als dierproef wanneer deze een zekere mate van aantasting van het welzijn van de dieren veroorzaakt die meer is dan de bij wet vastgestelde ondergrens<sup>7</sup>. Een dergelijke combinatiehandeling kan zowel vóór als ná speenleeftijd plaatsvinden met in achtname van best practices. Een voorbeeld van een best practice is het toepassen van lokale verdoving (bijvoorbeeld lidocaine zalf) indien de oorknip op latere leeftijd wordt uitgevoerd.

---

<sup>7</sup> Wod, artikel 1.1a: elk al dan niet invasief gebruik van een dier voor experimentele of andere doeleinden, waarvan het resultaat bekend of onbekend is, of onderwijskundige doeleinden, die bij het dier evenveel of meer pijn, lijden, angst of blijvende schade kan veroorzaken als, dan wel dan het inbrengen van een naald volgens goed diergeneeskundig vakmanschap.



Indien identificatie en karakterisatie ná de speenleeftijd plaatsvinden en de dieren worden gedood zonder te zijn gebruikt voor de fok van een volgende generatie of in een dierproef, bijvoorbeeld omdat ze niet het juiste genotype hebben, leidt dat tot registratie van het dier als proefdier in de categorie 'dieren dood of gedood voor gebruik in fok of dierproef'.

In Tabel 1 zijn de verschillende methoden weergegeven.

## Toelichting bij de tabel<sup>4</sup>

### 1. Weggeschoren vacht

Een tijdelijke en niet-invasieve identificatiemethode is het scheren van de vacht. De tijdelijkheid is gerelateerd aan het feit dat de haren weer aangroeien. De methode is niet invasief. Deze methode kan worden toegepast bij behaarde pups vanaf twee weken oud en dient, afhankelijk van de haarlengte die wordt afgeschoren en de groeisnelheid van de haren, herhaald te worden. Om de muis te kunnen scheren moet het dier gefixeerd worden. Afhankelijk van het gebruikte scheerapparaat worden de dieren in meer of mindere mate blootgesteld aan ultrasoon geluid.

### 2. Stiftmarkering

Een andere tijdelijke en niet-invasieve identificatiemethode is het aanbrengen van een markering op de huid of op de vacht met een stift of een vergelijkbare marker. De stof die gebruikt wordt voor de markering kan door de huid worden opgenomen of oraal ingenomen door likken, met als mogelijk gevolg interferentie met het onderzoek. Het dier moet worden gefixeerd om een herkenbare markering aan te brengen en deze handeling moet met regelmaat herhaald worden omdat de markering vervaagt, bijvoorbeeld door likken.

### 3. Onderhuidse inktmarkering

Het onderhuids (subcutaan) aanbrengen van een inktmarkering wordt onderscheiden van tatoeage, omdat een tatoeage tussen de opperhuid en lederhuid aangebracht wordt. Het inspuiten van de inkt is pijnlijk. Bovendien kan de inkt vervagen. Er kan interferentie van stoffen in de inkt met het onderzoek optreden. Om de inkt te kunnen aanbrengen dient het dier gefixeerd te worden.

### 4. Tatoeage

Het aanbrengen van een tatoeage is pijnlijk. De inkt kan vervagen. Er kan interferentie van stoffen in de inkt met het onderzoek optreden. Het dier dient gefixeerd te worden om de tatoeage aan te brengen.

## **5. Metalen oormerk**

Het aanbrengen van een oormerk is invasief. Er is kans op onder andere het optreden van ontstekingen aan de oorschelp, het ontstaan van littekenweefsel en het uitscheuren van het oor. Als een dier een MRI-scan moet ondergaan, moet een metalen oormerk verwijderd worden, wat een extra handeling met het dier met zich meebrengt. Een oormerk aanbrengen kan pas ná speenleeftijd en het dier dient gefixeerd te worden om een oormerk aan te brengen.

## **6. Plastic oormerk**

Het aanbrengen van een plastic oormerk is invasief. In vergelijking met het metalen oormerk is de kans op het optreden van ontsteking van de oorschelp, het ontstaan van littekenweefsel en het uitscheuren van het oor kleiner. Er zijn zeer klein formaat plastic oormerken waarbij de kans dat de muis daarmee ergens in de kooi aan blijft haken kleiner is dan in het geval van een metalen oormerk. Het dier dient gefixeerd te worden om het oormerk aan te brengen.

Plastic oormerken hoeven niet verwijderd te worden voor een MRI-scan.

## **7. Onderhuidse microchip**

Het inbrengen van een onderhuidse microchip die met een uitleesapparaat uitgelezen kan worden (zoals bij huisdieren gebeurt), is invasief en kan leiden tot een ontsteking en bindweefselvorming. Een chip kan door het lichaam gaan zwerven. Dit laatste geldt minder voor de onlangs ontwikkelde zeer kleine microchip die ter hoogte van de aanhechting van de staart aan het lichaam (proximaal staarteinde) kan worden ingebracht en waarvoor een aanzienlijk dunnere inbrengnaald nodig is. Het dier dient gefixeerd te worden om de microchip in te brengen.

## **8. Keutels**

Een niet-invasieve methode voor het verzamelen van monsters voor karakterisatie is het opvangen van keutels. Het dier moet daarvoor (tijdelijk) individueel gehuisvest worden om zeker te weten dat de keutels van dat ene dier afkomstig zijn.

## **9. Wangslijmvlies, 10. rectale swab, 11. Haar met haarzakje, 12. oogvocht**

Het afnemen van lichaamsmateriaal in de vorm van wangslijmvlies, een rectale swab (met een wattenstaafje langs de anus), het uittrekken van een haar met haarzakje of het afnemen van oogvocht worden gekwalificeerd als niet-invasieve methoden. Het dier dient gefixeerd te worden om het lichaamsmateriaal af te nemen.

### 13. Teenknip en 14. Oorknip/-pons

Het dier dient gefixeerd te worden om de teen-, oorknip of oorpons uit te voeren. Zoals in dit advies wordt besproken kan er over de impact van de teenknip en de oorknip op het welzijn van het dier op basis van de gepubliceerde wetenschappelijke literatuur geen eenduidige uitspraak worden gedaan. Zie voor de verdere bespreking dit advies.

### 15. Staartknip

De staartknip houdt in dat een klein deel van de distale staart wordt afgeknipt. Ondanks het feit dat deze methode betrouwbaar is voor het verkrijgen van DNA voor karakterisatie biedt deze methode geen identificatie. Er dient dus een extra handeling te worden verricht om het dier te merken ter identificatie. Het dier dient gefixeerd te worden om de staartknip uit te voeren.

### 16. Individuele huisvesting

Om een dier te kunnen identificeren na karakterisatie kan voor individuele huisvesting worden gekozen na afname van het weefselmonster waarbij de kooi voorzien is van een eenduidige, unieke markering. Aangezien bij knaagdieren sociale huisvesting de standaard is, is individuele huisvesting in het huidige systeem geen oplossing voor een permanente identificatie.



*Identificatie in het oor met microtattoo-apparatuur*

Beeld van Richard and Anne Boutet, Québec, Canada)



*Plaats van inbrengen (grijze cirkel) van de naald (microtattoo) teenmarkering*

Bron: rapport van Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification)

**Tabel 1:** Bestaande methoden voor identificatie en karakterisatie <sup>8</sup>

|                |     | Identificatie   |  |  |
|----------------|-----|---|--|--|
|                |     | Ja  |  | Nee  |
|                |     | Niet Invasief   | Invasief   |  |
| Karakterisatie | Ja  | Niet Invasief<br>(8, 9, 10, 11, 12) +<br>(1 of 2)   |  | 8. Keutels<br>9. Wangslijmvlies<br>10. Rectale swab<br>11. Haar met haartzakje<br>12. Oogvocht |
|                | Nee | 1. Weggeschoren vacht<br>2. Stiftmarkering<br>16. (Tijdelijke) individuele huisvesting <sup>9</sup> | 13. Teenknip<br>14. Oorknip/-pons<br>3. Onderhuidse inktmarkering<br>4. Tatoeage<br>5. Metalen oormerk<br>6. Plastic oormerk<br>7. Onderhuidse microchip | 15. Staartknip   |

<sup>8</sup> Met uitzondering van methoden 8 en 16 dienen de dieren gefixeerd te worden om de handeling uit te voeren

<sup>9</sup> Niet invasief volgens de gehanteerde definitie, maar wel gepaard gaand met een zekere mate van aantasting van het welzijn

In de eerdergenoemde FELASA-richtlijn over verfijning van methoden ter karakterisatie van genetisch gemodificeerde dieren wordt aanbevolen een methode te kiezen waarbij beide doelen met één methode worden bereikt. Dat is alleen het geval bij de teenknip en de oorknip/-pons (13 en 14).

Het combineren van een niet-invasieve karakteriseringstechniek met een niet-invasieve markeringsmethode leidt tot het vaker moeten hanteren, fixeren en merken van ieder individueel dier. De kans op (tussentijds) verlies van het markeringsteken neemt toe en daarmee de kans op verwisseling van dieren.

Uit publicaties komt naar voren dat het fixeren van een dier stress veroorzaakt en zelfs als een maximale stressor moet worden aangemerkt, aangezien het effect op hartslag, motiliteit en lichaamstemperatuur veroorzaakt door het fixeren van het dier niet wordt verergerd door de daaropvolgende staartknip, oorknip, het afnemen van wangslimvlies of een rectale swab<sup>10</sup>. Dit pleit dus niet voor het vaker moeten hanteren en fixeren van dieren in het geval van het herhaald moeten aanbrengen van merktekens voor identificatie. Al is het aannemelijk dat het aantal herhalingen, de wijze van fixeren en de tijd tussen twee fixatie momenten medebepalend zijn voor het uiteindelijke cumulatieve ongerief als gevolg van het herhaald fixeren en de daaropvolgende handeling.

De FELASA-werkgroep raadt aan om de minst invasieve methode te gebruiken die een adequaat DNA-monster oplevert in termen van kwaliteit en kwantiteit om zo het ongerief voor het dier te minimaliseren. Het NCad merkt daarbij op, dat de benodigde kwantiteit mede afhankelijk is van de toegepaste DNA-isolatie- en analysetechnieken.

De FELASA-werkgroep raadt tevens aan om de monsternamen bij zo jong mogelijke dieren uit te voeren en daarbij zo min mogelijk weefsel af te nemen. Dit in verband met de voortschrijdende verbening van het skelet en ontwikkeling van het zenuwstelsel bij de pups naarmate ze ouder worden.

#### *Indien alleen identificatie van dieren noodzakelijk is*

Het komt voor dat dieren enkel gemerkt hoeven te worden ter identificatie. Daarvoor zijn zowel invasieve als niet-invasieve methoden beschikbaar. De niet-invasieve methoden zijn van tijdelijke aard en dienen herhaald te worden óf het dier dient individueel te worden gehuisvest. De identificatiemethoden van permanente aard zijn invasief. Zie de tabel in de bijlage.

---

<sup>10</sup> - Cinelli P, Rettich A, Seifert B, Bürki K and Arras M. Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Lab Anim* 2007; 41: 174–184.

- Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verbost P and Spangeberg E. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Lab Anim* 2013; 47: 2–11.

## Alternatieve methoden

Technologische innovaties bieden kansen om andere methoden voor identificatie bij proefdieren te ontwikkelen.

Identificatie door middel van herkenning van biometrische kenmerken wordt al geruime tijd op verschillende vlakken toegepast, zoals gezichtsherkenning bij mensen bij grenscontroles. De bruikbaarheid van gezichtsherkenning voor identificatie is gebaseerd op het feit dat biometrische kenmerken uniek en persoonsgebonden zijn en in de tijd niet of slechts minimaal veranderen. Het blijkt inmiddels mogelijk om met computeralgoritmes varkens te herkennen aan hun snuit, waardoor oormerken of chip-implantaten overbodig zijn. Ook individuele zebrafissen en muizen kunnen worden herkend mits gehuisvest in kleine groepen. Echter, met de huidige stand van de technologie is het nog niet mogelijk om muizenpups te identificeren. Wellicht dat de verdere ontwikkeling en verfijning van de benodigde technologie voor 'gezichtsherkenning' het mogelijk maakt dat muizen ook op (zeer) jonge leeftijd geïdentificeerd kunnen worden en kan worden ingezet als alternatief voor de invasieve identificatiemethoden.

Norecopa<sup>11</sup> noemt in een rapport uit 2008 de oorprint als een mogelijke identificatiemethode. De oorprint is gebaseerd op herkenning van het bloedvatenpatroon in het oor van de muis. Deze methode was in ontwikkeling bij de Zweedse vestiging van een private instelling. Onderzoekers van die vestiging rapporteerden daarover in 2007 aan het NC3Rs (VK)<sup>12</sup>. In die rapportage concluderen de onderzoekers dat verdere ontwikkeling nodig is om het risico op foute en non-identificatie tot nul te reduceren. Bij de voorbereiding van dit advies is navraag gedaan en is gebleken dat de methode niet verder ontwikkeld is en nooit op enige schaal is gebruikt.

Wat heeft het Ministerie van LNV (voorheen Economische Zaken) tot nu toe laten onderzoeken

In opdracht van het Ministerie van Economische Zaken (EZ), heeft ZonMw in 2016 onderzocht wat de omvang van de toepassing van de teenknip was en een voorstel gepresenteerd voor een *separate call* om een alternatieve methode voor de teenknip te ontwikkelen<sup>13</sup>.

---

<sup>11</sup> Norecopa is het Nationale Platform in Noorwegen om vooruitgang te boeken op de 3V's (Vervanging, Reductie, Verfijning)

<sup>12</sup> Cameron J, Jacobson C, Nilsson K, Rognvaldsson T. Identifying laboratory rodents using earprints. London: NC3Rs. Dit artikel is niet meer te raadplegen in de online database van de NC3Rs.

<sup>13</sup> ZonMw – Inventarisatie van gebruikte methoden voor karakterisatie en/of identificatie van knaagdieren, juni 2016

**Tabel 2<sup>13</sup>:** Inventarisatie hoeveel instituten de teenkootknip als methode toepassen (bron: Beroepsgroep van Proefdierdeskundigen juni 2014). De inventarisatie is uitgestuurd naar alle vergunninghouders (circa 80). Voor maar een deel van de vergunninghouders zijn deze vragen relevant, omdat zij geregeld onderzoek en/of fok met knaagdieren uitvoeren (ZonMw rapport, 2016).

| Respondenten   | Aantal respondenten | Teenkootknip toegestaan bij | Teenkootknip uitgevoerd bij | Teenkootknip niet uitgevoerd bij |
|--|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Universiteiten, Nationale Instituten (o.a. KNAW), Bedrijven (incl. fokbedrijven) | 16                  | 13                          | 10                          | 6                                |

Alhoewel het Ministerie van EZ verzocht enkel de omvang van de toepassing van de teenknip te onderzoeken, heeft ZonMw niet alleen gekeken naar de teenknip, maar is ook de oorknip onderzocht. Het systematische literatuuronderzoek, uitgevoerd door SYRCLE in 2016 en gepubliceerd in 2017<sup>14</sup>, wees uit dat op basis van het wetenschappelijke bewijs een effect van de teenknip of de oorknip op het dierenwelzijn noch kon worden uitgesloten noch kon worden bevestigd. Als reactie daarop wilde het Ministerie van EZ, vanwege deze onduidelijkheid over de mate van ongerief, de teenknip zoveel mogelijk beperken op grond van het voorzorgsprincipe<sup>15</sup>. Dit principe stelt dat bij gebrek aan uitsluitsel over de schade van een handeling, mogelijke ernstige schade moet worden voorkomen en dat de bewijslast ligt bij diegene die de handeling wil gaan uitvoeren.

Ook heeft ZonMw middels een literatuurstudie een aantal alternatieve karakterisatiemethoden nader onderzocht, zoals methoden met behulp van wangslimvlies, rectale swabs, speeksel, haar en ontlasting. Voor deze methoden van genetische karakterisatie geldt dat er daarnaast ook nog een identificatiemethode moet worden toegepast. Er is geen sluitende informatie beschikbaar over wetenschappelijk aangetoonde voor- en nadelen van deze methoden ten opzichte van de andere methoden en de mate van ongerief.

<sup>14</sup> <https://europepmc.org/article/pmc/pmc5700778>

<sup>15</sup> Brief van de staatssecretaris van Economische Zaken aan de Tweede Kamer der Staten-Generaal, 15 december 2016, 32 336 Dierproeven, Nr. 64

# De bijdrage van het NCad

Het NCad deed navraag in verschillende gremia, zowel op nationaal als internationaal niveau, om te achterhalen welke methoden worden gebruikt voor karakterisatie en identificatie. Het NCad benaderde onder meer een aantal grote instellingen op het gebied van genetische modificatie en fok in Europa, de Nationale Comit es (NCs) van alle Europese lidstaten en fokcoördinatoren in Nederland.

## *Situatie bij universiteiten zowel nationaal als internationaal waar veel genetisch gemodificeerde dieren worden gebruikt*

Het NCad heeft een aantal universiteiten in Nederland en in Europa die een omvangrijke hoeveelheid aan genetisch gemodificeerde dieren huisvesten gevraagd welke methode zij toepassen voor karakterisatie en identificatie. Daaruit kwam naar voren dat zowel de oorknip als de teenknip wordt toegepast. De oorknip wordt echter iets vaker toegepast<sup>13</sup>. De respondenten geven vaak dezelfde argumenten om  en van beide technieken te diskwalificeren ten opzichte van de andere. Genoemde argumenten<sup>16</sup> betreffen de mate van ongerief en stress, het wel of niet kunnen missen van het gemutileerde lichaamsdeel en de leeftijd waarop de handeling wordt verricht.

Respondenten die de teenknip toepassen, geven aan dat dieren intacte oren nodig hebben voor communicatie en zij die de oorknip toepassen, geven aan dat de dieren de tenen nodig hebben om op adequate wijze te kunnen klimmen.

## *Toepassing in andere landen*

Het NCad heeft via de NCs een verkenning uitgevoerd bij andere Europese lidstaten naar de methoden die in die landen worden toegepast voor identificatie en karakterisatie. Vanuit negen landen heeft het NCad een reactie ontvangen. Zie tabel 3 voor de resultaten.

---

<sup>16</sup> Schaefer et al 2010; Lab Anim 44:7-13, Paluch et al 2014; J Am Assoc Lab Anim Sci 53:132-40, Dahlborn et al 2013; Lab Anim 47:2-11



**Tabel 3:** Identificatie en karakterisatie in Europese lidstaten

Opm.: In Bulgarije worden geen genetisch gemodificeerde dieren gefokt. In Kroatië worden minder dan honderd genetisch gemodificeerde dieren per jaar gefokt

| Land             | teenknip <sup>17</sup>  | alternatief  |
|------------------|---|--|
| Bulgarije        | geen teenknip   | meerdere alternatieven genoemd: nummering van de hokken, knippen van haar op verschillende delen van het lichaam, een genummerde ring om één van de extremiteiten <sup>18</sup>  |
| Duitsland        | toegestaan omdat ook alternatieven tot een vorm van welzijnsaantasting leiden |  |
| Estland          | Geen teenknip (wettelijke verbod)   | Voor karakterisatie wangslijmvlies of haarfollikel (geen voorkeur vanwege onbetrouwbare uitkomsten). Voor identificatie het oormerk.   |
| Groot-Brittannië | zeer sporadisch toegepast   | meestal oorknip  |
| Ierland          | geen teenknip <sup>19</sup>   | oorknip en soms staartknip <sup>20</sup>   |
| Kroatië          | geen teenknip   | Oorknip indien noodzakelijk. Staart- of vachtmarkering voor enkel identificatie.   |
| Noorwegen        | toegestaan, mits aan bepaalde voorwaarden is voldaan <sup>21</sup>            | meerdere alternatieven genoemd: oorknip, staartknip, tatoeage, chip, stiften, wangslijmvlies, haarfollikel, feces,   |
| Oostenrijk       | toegestaan, mits beargumenteerd   | geen voorkeur voor een bepaalde methode: er dient te worden aangetoond waarom voor welke methode wordt gekozen en er dient met zo min mogelijk materiaal gekarakteriseerd te worden: de staartknip wordt niet geprefereerd |
| Tsjechië         | toegestaan mits andere methoden niet mogelijk zijn                            | oorknip, omdat die snel is en tevens karakterisatie mogelijk maakt; oormerk, omdat dat snel, goed zichtbaar en, indien goed aangebracht, permanent is  |

<sup>17</sup> Het is niet bekend of in landen waar de teenknip niet wordt toegepast, deze is verboden

<sup>18</sup> Uit informatie bij een Nederlandse vergunninghouder die de methode ook gebruikte, bleek dat de methode niet betrouwbaar was bij (zeer)jonge dieren in de groei, omdat de dieren de ring zelf op relatief eenvoudige wijze verwijderden. Bij neonaten is ringen vanwege de groei van de poot als identificatie methode niet bruikbaar

<sup>19</sup> Er is geen formeel “verbod”, echter de teenknip wordt in principe niet goedgekeurd omdat de methode als te grof wordt gekwalificeerd.

<sup>20</sup> Geen identificatie en vereist daarom aparte toepassing van een identificatie methode.

<sup>21</sup> Is er een noodzakelijkheid om een grote hoeveelheid weefsel te verzamelen op de leeftijd van 1 tot 10 dagen. Dit dient in de aanvraag duidelijk te worden beschreven. Is het DNA nodig vóór speenleeftijd of betreft het een praktische en economische overweging om dieren met een ongewenst DNA-profiel zo snel mogelijk uit de kolonie te verwijderen

### *Ethische aspecten*

Aan het vraagstuk van genotypering en karakterisatie zitten verschillende ethische aspecten naast de algemene ethische aspecten van proefdiergebruik, die hier buiten beschouwing blijven.

Met de teenknip en de oorknip en elke andere invasieve methode wordt de fysieke integriteit (heelheid) en het welzijn van het dier aangetast. Het is onderdeel van de afwegingen rond dierproeven dat een zekere mate van ongerief, schade en aantasting van het fysiek van proefdieren geaccepteerd wordt ten behoeve van wetenschappelijke en/of maatschappelijke doelen.

Het is een morele verantwoordelijkheid van elke individuele onderzoeker en vergunninghouder om afwegingen rond identificatie en karakterisatie mee te nemen bij het initiëren en vormgeven van dierstudies, bovenop de wettelijk vereiste afweging.

Daarnaast brengt het instrumentele gebruik van dieren als proefdier een verantwoordelijkheid met zich mee om alles te doen wat proportioneel binnen de mogelijkheden ligt om de inbreuk op integriteit en welzijn zoveel mogelijk te beperken. Dit maakt het tot een morele plicht van de biomedische onderzoekswereld, eventueel daartoe aangezet door beleidsmaatregelen, om de zoektocht naar innovatieve niet-invasieve identificatie- en karakterisatie-methoden te versnellen.

Alhoewel buiten de scope van dit advies wil het NCad het volgende meegeven:

Moreel gezien zou deze inbreuk op de integriteit en het welzijn van het dier meegenomen moeten worden in elke ethische afweging rond dierproeven, inclusief de effecten op beide gebieden van andere ingrepen. Ofwel: dat er überhaupt extra handelingen en/of ingrepen nodig zijn om een onderzoekproject met dieren op een zinvolle manier door te laten gaan moet worden meegewogen, evenals de afweging tussen de verschillende mogelijkheden. Echter, keuzes met betrekking tot identificatie en karakterisatie worden momenteel niet meegenomen in de wettelijk verplichte ethische afweging voor het al dan niet verlenen van een projectvergunning. Dit komt doordat in de Wet op de dierproeven de teen- en de oorknip met als doel identificatie, waarbij het verzamelde weefsel gebruikt wordt voor genetische karakterisatie, niet zijn aanmerkt als dierproef, maar als onderdeel van de gangbare huisvestings- en verzorgingspraktijk.

Het NCad is van mening dat dit aspect aandacht verdient bij de evaluatie van de Wet op de dierproeven.

## Conclusies

Zoals door ZonMw eerder is geconstateerd en ook uit onze bevindingen blijkt, is er veel tegenstrijdige informatie over de impact op het dier bij de uitvoering van de verschillende vormen van karakterisatie en identificatie. De conclusie van een in 2017 gepubliceerde *systematic review*<sup>22</sup> is, dat er te weinig tot geen goed onderbouwd wetenschappelijk bewijs is om betrouwbaar de welzijnsaantasting vanwege de teen- of de oorknip in te schatten. Dit betekent niet dat er geen welzijnsaantasting is. Er is wel bewijs dat er welzijnsaantasting is maar niet of de ene techniek meer aantasting geeft dan de andere.

Het Ministerie van LNV zou enkel de teenknip willen verbieden, mits er een volwaardig alternatief is. Echter, op grond van het bovenstaande kan noch een verbod op de teenknip en/of de oorknip, noch het toestaan van beide, voldoende wetenschappelijk worden gemotiveerd. Ook andere methoden ter karakterisatie of identificatie kunnen met ongerief gepaard gaan. Het NCad heeft daarom besloten om op dit advies thans geen Code of Practice te laten volgen.

Bij de voorbereiding van dit advies heeft het NCad geen aanvullend wetenschappelijk bewijs gevonden, dat de conclusies van de *systematic review* van 2017 ter discussie stelt. Echter, het NCad adviseert vanuit de erkenning van de intrinsieke waarde van dieren en hanteert mede daarom het voorzorgsprincipe.

Het NCad constateert dat er momenteel geen methoden bestaan waarbij op niet-invasieve wijze van dieren in eenzelfde handeling een monster voor genetische karakterisatie kan worden afgenomen en het dier tegelijkertijd wordt voorzien van een unieke, in de tijd houdbare markering voor identificatie.

Wel bestaan er voor zowel genetische karakterisatie als voor merken ter identificatie niet-invasieve methoden die gecombineerd kunnen worden. Echter, dat betekent twee handelingen in plaats van één, waarvan de identificatiemethode regelmatig herhaald zal moeten worden. Het NCad acht het plausibel dat een combinatie van niet-invasieve methoden minder welzijnsaantasting veroorzaakt dan de invasieve methoden. Daarbij wordt de kanttekening gemaakt dat het fixeren van dieren een zekere mate van stress veroorzaakt en dat iedere herhaling van het aanbrengen van de identificatie gepaard gaat met fixatie van het dier. Er zijn echter mogelijkheden om die stress te verminderen, bijvoorbeeld door middel van training van de dieren.

De verantwoordelijkheden van de betrokken partijen nopen tot het telkens opnieuw maken van een zorgvuldige afweging met betrekking tot de keuze van de in de voorliggende

---

<sup>22</sup> Wever, K. E., et al. (2017). "A systematic review of discomfort due to toe or ear clipping in laboratory rodents." *Lab Anim* 51(6): 583-600.

situatie meest geschikte identificatie- en karakterisatiemethoden, waarbij aspecten meegenomen dienen te worden van schending van integriteit, schending van welzijn en kwaliteit van wetenschap.

Gezien het grote aantal dieren dat jaarlijks zowel wordt gemerkt ter identificatie als gekarakteriseerd wordt, is het NCad van mening dat ingezet moet worden op het ontwikkelen van combinaties van duurzame niet-invasieve identificatie- en karakterisatietechnieken waarbij de integriteit en het welzijn van het dier niet of minimaal wordt aangetast. Het NCad acht het raadzaam dat nader onderzoek wordt verricht naar innovatieve technieken om dieren te kunnen identificeren en karakteriseren, zoals 'individuele gezichtsherkenning' en DNA-isolatie en analysetechnieken.

Het Ministerie van LNV en het Ministerie van Onderwijs, Cultuur en Wetenschap (OC&W) wordt geadviseerd een concreet project uit te (laten) zetten met de opdracht aan bovenstaande aanbevelingen invulling te geven en daarnaast in de evaluatie van de Wet op de dierproeven aandacht te besteden aan de impact op het welzijn en de integriteit van proefdieren van handelingen die buiten de definitie van dierproefvallen, maar er wel direct verband mee houden.

## Bijlage: Overzicht van identificatie- en karakterisatiemethoden

| 2  | 1  | Methode                   |
|--|--|---------------------------|
| Stiftmarkering   | Weggeschoren vacht   | <b>uitleg</b>             |
| Tijdelijke en niet-invasieve identificatiemethode is het aanbrengen van een herkenbare markering op de huid of op de vacht met een stift of een vergelijkbare marker. De stof die gebruikt wordt voor de markering, kan door de huid worden opgenomen of oraal ingenomen door likken met als mogelijk gevolg interferentie met het onderzoek. Het dier moet worden gefixeerd om de markering aan te brengen en deze handeling moet met regelmaat herhaald worden omdat de markering vervaagd bijvoorbeeld door likken. | Tijdelijke en niet-invasieve identificatiemethode. De tijdelijkheid is gerelateerd aan het feit dat de haren weer aangroeien. De methode is niet invasief. Toe te paasen bij behaarde pups vanaf twee weken oud en dient, afhankelijk van de haarlengte die wordt afgeschoren en de groeisnelheid van de haren, herhaald te worden. Het dier moet gefixeerd worden. Afhankelijk van het gebruikte scheerapparaat worden de dieren in meer of mindere mate blootgesteld aan ultrasoon geluid. |                           |
| X  | X  | <b>Identificatie</b>      |
|  |  | <b>Karakterisatie</b>     |
| X  | X  | <b>Tijdelijk</b>          |
|  |  | <b>Permanent</b>          |
| X  | X  | <b>Vóór speenleeftijd</b> |
| X  | X  | <b>Na speenleeftijd</b>   |
|  |  | <b>Invasief</b>           |
| X  | X  | <b>Niet invasief</b>      |

| 5  | 4  | 3  |                           |
|--|--|--|---------------------------|
| Metalen oormerk  | Tatoeage   | Onderhuidse inktmarkering  | Methode                   |
| Methode is invasief. Er is kans op onder andere het optreden van ontstekingen aan de oorschelp, het ontstaan van (litteken)weefsel en het uitscheuren van het oor. Als een dier een MRI-scan moet ondergaan, moet een metalen oormerk verwijderd worden, wat een extra handeling met het dier met zich meebrengt. Een oormerk aanbrengen kan pas ná speenleeftijd en het dier dient gefixeerd te worden om een oormerk aan te brengen. | Het aanbrengen van een tatoeage is pijnlijk. De inkt kan vervagen. Er kan interferentie van stoffen in de inkt met het onderzoek optreden. Het dier dient gefixeerd te worden om de tatoeage aan te brengen. | Het onderhuids (subcutaan) aanbrengen van een inktmarkering wordt onderscheiden van tatoeage, omdat een tatoeage tussen de opperhuid en de lederhuid wordt aangebracht. Het inspuiten van de inkt is pijnlijk. Bovendien kan de inkt vervagen. Er kan interferentie van stoffen in de inkt met het onderzoek optreden. Om de inkt te kunnen aanbrengen dient het dier gefixeerd te worden. | <b>uitleg</b>             |
| X  | X  | X  | <b>Identificatie</b>      |
|  |  |  | <b>Karakterisatie</b>     |
|  |  |  | <b>Tijdelijk</b>          |
| X  | X  | X  | <b>Permanent</b>          |
| X  | X  | X  | <b>Vóór speenleeftijd</b> |
|  | X  | X  | <b>Na speenleeftijd</b>   |
| X  | X  | X  | <b>Invasief</b>           |
|  |  |  | <b>Niet invasief</b>      |

| 8   | 7  | 6                      |   |
|---|--|------------------------|---|
| <b>Keutel</b>   | <b>Onderhuidse microchip</b>   | <b>Plastic oormerk</b> | <b>Methode</b>  |
| Een niet-invasieve methode voor het verzamelen van monsters voor karakterisatie is het opvangen van keutels. Het dier moet daarvoor (tijdelijk) individueel gehuisvest worden om zeker te weten dat de keutels van dat ene dier afkomstig zijn. | Het inbrengen van een onderhuidse microchip die met een uitleesapparaat uitgelezen kan worden (zoals bij huisdieren gebeurt), is invasief en kan leiden tot een ontsteking en bindweefselvorming. Een chip kan door het lichaam gaan zwerven. Dit laatste geldt minder voor de onlangs ontwikkelde zeer kleine microchip die ter hoogte van de aanhechting van de staart aan het lichaam (proximaal staarteinde) kan worden ingebracht en waarvoor een aanzienlijk dunner inbrengnaald nodig is. Het dier dient gefixeerd te worden om de microchip in te brengen. | ×                      | Methode is invasief. In vergelijking met het metalen oormerk is de kans op het optreden van ontsteking van de oorschelp, het ontstaan van (litteken) weefsel en het uitscheuren van het oor minder. Er zijn zeer klein formaat plastic oormerken waarbij de kans dat de muis daarmee ergens in de kooi aan blijft haken minder is dan in het geval van een metalen oormerk. Het dier dient gefixeerd te worden om het oormerk aan te brengen. Plastic oormerken hoeven niet verwijderd te worden voor een MRI-scan. |
| X <sup>23</sup>   | ×  | ×                      | <b>Identificatie</b>  |
| X   |  |                        | <b>Karakterisatie</b>   |
| X   |  |                        | <b>Tijdelijk</b>  |
|   | X  | X                      | <b>Permanent</b>  |
|   | X  | X                      | <b>Vóór speenleeftijd</b>   |
| X   | X  |                        | <b>Na speenleeftijd</b>   |
|   | X  | ×                      | <b>Invasief</b>   |
| X   |  |                        | <b>Niet invasief</b>  |

<sup>23</sup> Dieren worden individueel gehuisvest

| 15   | 14   | 13  | 9, 10, 11, 12   | Methode   |
|--|--|---|---|---|
| <p><b>Staartknip</b></p> <p>De staartknip houdt in dat een klein deel van de distale staart wordt afgeknipt. Ondanks het feit dat deze methode betrouwbaar is voor het verkrijgen van DNA voor karakterisatie biedt deze methode geen identificatie. Er dient dus een extra handeling te worden verricht om het dier te merken ter identificatie. Het dier dient gefixeerd te worden om de staartknip uit te voeren.</p> | <p><b>Oorknip</b></p> <p>Zie teenkniip</p> | <p><b>Teenkniip</b></p> <p>Het dier dient gefixeerd te worden om de teenkniip uit te voeren. Zoals in dit advies wordt besproken kan er over de impact van de teenkniip op het welzijn van het dier op basis van de gepubliceerde wetenschappelijke literatuur geen eenduidige uitspraak worden gedaan.</p> | <p>Wangslimvlies (9), rectale swab (10), Haar met haarzakje (11), oogvocht (12)</p> | <p><b>uitleg</b></p> <p>Het afnemen van lichaamsmateriaal in de vorm van wangslimvlies, een rectale swab (met een wattenstaafje langs de anus), het uittrekken van een haar met haarzakje of het afnemen van oogvocht worden gekwalificeerd als niet-invasieve methoden. Het dier dient gefixeerd te worden om het lichaamsmateriaal af te nemen.</p> |
|  | X  | X   |   | <b>Identificatie</b>  |
| X  | X  | X   | X   | <b>Karakterisatie</b>   |
|  |  |   | X   | <b>Tijdelijk</b>  |
| X  | X  | X   |   | <b>Permanent</b>  |
| X  | X  | X   | X   | <b>Vóór speenleeftijd</b>   |
|  |  |   | X   | <b>Na speenleeftijd</b>   |
| X  | X  | X   |   | <b>Invasief</b>   |
|  |  |   | X   | <b>Niet invasief</b>  |



Dit is een publicatie van:

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid  
Postbus 93118  
2595 AL Den Haag

Mail: [ncad@minezk.nl](mailto:ncad@minezk.nl)  
Website: [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

juli 2020 | 20103149