

# Categorisering en rapportage van de ernst van het ongerief ondervonden door dieren gebruikt in wetenschappelijke procedures: rapport van de FELASA/ECLAM/ESLAV-Werkgroep<sup>a</sup>

David Smith<sup>1</sup>, David Anderson<sup>2</sup>, Anne-Dominique Degryse<sup>3</sup>, Carla Bol<sup>4</sup>, Ana Criado<sup>5</sup>, Alessia Ferrara<sup>6</sup>, Nuno Henrique Franco<sup>7</sup>, Istvan Gyertyan<sup>8</sup>, Jose M Orellana<sup>9</sup>, Grete Ostergaard<sup>10</sup>, Orsolya Varga<sup>11</sup> en Hanna-Marja Voipio<sup>12</sup>

<sup>1</sup>FELASA, Federation for Laboratory Animal Science Associations, Eye, Suffolk, UK

<sup>2</sup>LASA, PO Box 524, Hull, HU9 9HE, UK

<sup>3</sup>Domaine de Mirabel, Puylaurens, France

<sup>4</sup>Charles River Laboratories, 's-Hertogenbosch, The Netherlands

<sup>5</sup>Via Fleming 4, Verona, Italy

<sup>6</sup>Aptuit, Verona, Italy

<sup>7</sup>Instituto de Investigacao e Inovacao, Universidade do Porto, Portugal

<sup>8</sup>Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>9</sup>Universidad de Alcalá Campus, Universitario Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>10</sup>University of Copenhagen, Denmark

<sup>11</sup>University of Debrecen, Hungary

<sup>12</sup>University of Oulu, Finland

## Corresponderend auteur:

David Smith, FELASA, Federation for Laboratory Animal Science Associations, PO BOX 372, Eye, Suffolk, IP22 9BR, VK.

E-mail: davidsmith1944@btinternet.com

## Samenvatting

In Richtlijn 2010/63/EU zijn vereisten opgenomen voor de categorisering naar ernst<sup>b</sup> van het verwachte ongerief van dieren gebruikt in wetenschappelijke procedures, die bij de vergunningverlening moeten worden toegepast. Ook zijn vereisten opgenomen voor de rapportage van de werkelijk ondervonden ernst van het ongerief door elk dier dat in dergelijke procedures wordt gebruikt. Deze vereisten bieden de mogelijkheid om in de ontwerp-, uitvoerings- en rapportagefase van procedures rekening te houden met de negatieve gevolgen van procedures voor de dieren en na te denken over hoe deze gevolgen kunnen worden beperkt om het effect op het welzijn van de dieren tot een minimum te beperken. Door een betere registratie en rapportage van negatieve gevolgen komt er bovendien meer aandacht voor het stellen van prioriteiten bij de verfijning van vergelijkbare procedures in de toekomst en het benchmarken van goede praktijken. Door het rapporteren van het werkelijk ondervonden ongerief wordt het publiek beter geïnformeerd over het relatieve ongerief van verschillende velden van wetenschappelijk onderzoek. Bovendien kunnen, in de loop van de tijd, trends op het gebied van verfijning in kaart worden gebracht. Een consistente toepassing door alle lidstaten van de bepaling van het ongerief is van essentieel belang, vooral voor het overwegen van hergebruik of het invoeren van de vrijwaringsclausule. De voorbeelden die in Bijlage VIII van Richtlijn 2010/63/EU zijn opgenomen ter illustratie van de ongeriefbeoordeling, zijn beperkt in aantal en geven onvoldoende informatie ter ondersteuning van de bepaling van het ongerief. Bovendien hebben de voorbeelden vaak betrekking op de procedure en helpen niet echt om de

---

<sup>a</sup> Deze vertaling is gemaakt in opdracht van het Nederlandse Nationaal Comité advies dierproevenbeleid, met dank aan Anne-Dominique Degryse (lid van de FELASA/ECLAM/ESLAV-werkgroep) en Nelleke Verhave (voorzitter IvD-LUMC) voor het kritisch meelesen.

<sup>b</sup> **Noot bij de vertaling:** In het Engels wordt over 'severity' gesproken. De exacte vertaling hiervan is 'ernst'. Ernst wordt in het Nederlands echter niet gebruikt als losstaand woord, maar alleen in combinatie met een ander woord (ernst van de ziekte of ernst van het ongerief). In Nederland spreken we kortweg over ongerief (en niet over ernst). In de vertaling zal daarom in de regel het woord ongerief worden gebruikt en soms ernst of mate van ongerief. In de titel is 'severity' vertaald met ernst van het ongerief.

uitkomst te beoordelen, zoals bijvoorbeeld negatieve effecten die zouden kunnen optreden. Dit rapport is opgesteld als richtsnoer voor de bepaling van het ongerief, zowel vooraf als na afloop van een procedure. Een aantal huidige toegestane diermodellen is gebruikt om het proces van ongeriefbeoordeling te illustreren; van de ontwerpfase van het project via monitoring tijdens de procedure, tot de definitieve beoordeling van het werkelijke ongerief van de procedure (Bijlage I).

## **Trefwoorden**

Dieren, ernst, ongerief, humane eindpunten, verfijning, ethiek en welzijn, procedures

Datum van ontvangst: 31 oktober 2017; goedgekeurd: 1 november 2017

## **Inleiding**

Bij de invoering van Richtlijn 2010/63/EU zijn er aanvullende eisen gesteld aan de beoordeling van het ongerief van procedures die met dieren voor wetenschappelijke doeleinden worden uitgevoerd. Vooraf dient voor elke procedure het verwachte ongerief te worden ingeschat en tijdens de procedure dient het werkelijke ongerief dat door elk dier wordt ondervonden te worden vastgesteld en gerapporteerd in de statistische gegevens die elk jaar openbaar worden gemaakt (Uitvoeringsbesluit 2012/707/EU van de Commissie, zoals gewijzigd bij 2014/11/EU)<sup>1,2</sup>

Een goede projectplanning is noodzakelijk om vooraf tot een juiste beoordeling van de ernst van het ongerief te kunnen komen, en om passende, op het project afgestemde observatie-, monitoring- en beoordelingscriteria en humane eindpunten te bepalen.<sup>3,4</sup> Goed opgeleid, bekwaam personeel is een absolute vereiste voor de beoordeling van het dierenwelzijn gedurende het onderzoek.

Om voortgaande verfijning en beoordeling van het werkelijk ondervonden ongerief mogelijk te maken moet er worden gewerkt met een observatiestrategie en een gemeenschappelijk registratiesysteem waarin alle noodzakelijke gegevens in een consistent formaat worden opgeslagen. In dit document wordt uiteengezet waarom een dergelijke beoordeling nodig is en wie hiervoor verantwoordelijk is. Vervolgens wordt aan de hand van een aantal praktijkvoorbeelden besproken hoe dit moet worden aangepakt en hoe vervolgens de werkelijke ongeriefscore kan worden bepaald voor elk individueel dier in de procedure.

Bijlage VIII van de Richtlijn geeft aanvullende handvatten voor de beoordeling het ongerief vooraf, bedoeld om een gedeelde interpretatie van de Richtlijn te bevorderen.

De voorbeelden geven echter weinig informatie over hoe de beoordeling van het ongerief tot stand was gekomen en bevatten een mix van eenvoudige procedures, zoals kortdurende beperking in metabole kooien en meer complexe procedures die uit meerdere stappen bestaan, zoals een orgaantransplantatie, een procedure die verdoving, chirurgie en afstotingsbeheer vereist.

De criteria voor de indeling in een ongerief-categorieën (uiteengezet in Deel II van Bijlage VIII) geven aan dat bij elk onderzoek voorafgaand aan de beoordeling van het ongerief een reeks factoren in aanmerking moet worden genomen. In de wetenschappelijke wereld zijn veel zorgen geuit dat de voorbeelden in Bijlage VIII toch onvoldoende informatie bevatten om de indeling naar ongerief bevredigend toe te lichten, en dat voorbeelden voor een aantal belangrijke onderzoeksgebieden, zoals pijn en artritis, ontbreken. Zonder verdere toelichting zullen er waarschijnlijk aanzienlijke verschillen zijn in toegekende ongeriefbeoordeling, wat uiteindelijk zou kunnen leiden tot misleidende informatie over diergebruik en, wellicht nog zorgelijker, ongepast hergebruik van dieren. Een andere mogelijke zorg ten aanzien van dierlijke pijnmodellen, is dat het mogelijk is om hetzelfde model in ten minste twee verschillende ongeriefcategorieën in te delen, afhankelijk van de verfijningen die in procedures worden toegepast. Naast de toepassing van vroege eindpunten is ook de mate waarin pijn, angst en lijden worden verzacht een belangrijke factor.

In 2012 hebben leden van de FELASA/ECLAM/ ESLAV Werkgroep bijgedragen aan de discussies tijdens een bijeenkomst belegd door de Europese Commissie over de indeling in categorieën van het ongerief. Gebruik makend van 'eigen' materiaal heeft de werkgroep meegewerkt aan de ontwikkeling van een aantal aanvullende leidraden en enkele voorbeelden van ongeriefbeoordeling die werden goedgekeurd in een National Contact Point (NCP) vergadering en kunnen worden geraadpleegd op de website van de EC.<sup>5</sup>

Een belangrijk doel van dit gezamenlijke FELASA/ECLAM/ ESLAV-rapport is om aanvullende informatie en ondersteuning te bieden voor de beoordeling van het ongerief vooraf en bepaling van het werkelijke ongerief dat

gedurende een procedure door de dieren wordt ondervonden. Hiertoe wordt een aantal aanvullende illustratieve voorbeelden uit verschillende onderzoeksvelden gegeven, gebaseerd op bestaande systemen, waarin naast uitbreiding op de voorbeelden in Bijlage VIII, voorbeelden worden gegeven van verschillende niveaus van ongerief. Er is bewust een aantal modellen met ernstig ongerief opgenomen ter illustratie van gebieden van wetenschappelijk diergebruik die in Bijlage VIII ontbreken, ter bevordering van het delen en verspreiden van goede praktijken.

Er is gekozen voor modellen die, bij de totstandkoming van dit rapport, in fundamenteel en toegepast onderzoek in gebruik waren, gecombineerd met een aantal voorbeelden die worden gebruikt bij veiligheidsbeoordelingen. De voorbeelden bevatten *enige* informatie over hoe het niveau van ongerief kan worden verlaagd door toepassing van verfijningsstrategieën. Na beoordeling door de moederorganisaties (FELASA/ECLAM/ ESLAV) zijn verdere suggesties voor verfijning opgenomen.

Zelfs als de voorbeelden gegeven ter illustratie representatief zijn voor huidige praktijken neemt dit niet weg dat bij elk voorstel om een diemodel te gebruiken, elke onderzoekscomponent kritisch moet worden bekeken om te waarborgen dat alle mogelijkheden voor verdere toepassing van 3V's worden benut.

Met het oog op de aanvullende vereisten van 2010/63/EU is het van belang dat alle betrokkenen bij diergebruik, inclusief de verantwoordelijken voor de projectbeoordeling, een gedeeld begrip en aanpak van 'ongerief classificatie' ontwikkelen en overeenkomen, zodat een 'gelijk speelveld' binnen de Europese onderzoeksgemeenschap wordt bevorderd. Op die manier wordt gewaarborgd dat het ongerief dat dieren tijdens procedures ondervinden, op consistente wijze wordt gerapporteerd in de statistische gegevens over diergebruik.

## Het regelgevingskader

De nieuwe Richtlijn 2010/63/EU betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt, werd op 22 september 2010 goedgekeurd en ging op 1 januari 2013 in de lidstaten van kracht.

Net als Richtlijn 86/609/EEG schrijft de nieuwe richtlijn voor dat experimenten zo worden opgezet dat pijn, lijden, angst en blijvende schade bij dieren tot een minimum worden beperkt.

Alle wetenschappelijke procedures worden uitgevoerd onder een projectvergunning die in elke lidstaat wordt toegekend door de bevoegde instantie (vergunningverlener). In elke aanvraag voor een projectvergunning dient een schatting te worden opgenomen van het waarschijnlijke ongerief van elke procedure. Deze inschattingen van het ongerief vooraf worden in het projectbeoordelingsproces door de vergunningverlener in de overweging meegenomen, voordat een besluit wordt genomen over vergunningverlening voor het project. Na overweging van de in de aanvraag verstrekte informatie, stelt de vergunningverlener voor elke procedure de ernst van het ongerief vast (Artikel 38).

Het werkelijke ongerief dat door elk dier bij elke afzonderlijke procedure wordt ondervonden, wordt door elke lidstaat (Artikel 54, lid 2) jaarlijks gerapporteerd, in het jaar waarin de procedure is afgerond.

Daarnaast zal het **werkelijke ongerief** van eventuele eerdere procedures een belangrijk aspect zijn om te bepalen of een dier in een nieuwe procedure kan worden hergebruikt (Artikel 16). Dieren mogen alleen worden hergebruikt als het ongerief van de eerdere procedure 'licht' of 'matig' was; als de algemene gezondheid en het welzijn van het dier volledig zijn hersteld; als de verdere procedure is ingedeeld als 'licht', 'matig' of 'terminaal' en deze in overeenstemming is met diergeneeskundig advies waarbij rekening wordt gehouden met de volledige levensloop van het dier. Onder de volledige levensloop van het dier wordt verstaan alle aspecten van gezondheid, welzijn en zorg en de impact van alle wetenschappelijke procedures. De combinatie van al deze effecten kan worden beschouwd als 'cumulatief' ongerief. In uitzonderlijke omstandigheden en nadat een dierenarts het dier heeft onderzocht, kan de vergunningverlener bij wijze van uitzondering het hergebruik van een dier toestaan dat eerder hevige pijn, angst of daarmee gelijkstaand lijden heeft ondervonden.

Artikel 3 definieert een procedure als *'elke al dan niet invasieve handeling ten aanzien van een dier voor experimentele of andere wetenschappelijke 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 het inbrengen van een naald volgens goed diergeneeskundig vakmanschap'*.

Hiermee is een 'ondergrens' gedefinieerd voor wetenschappelijke procedures, waarvoor geen projectvergunning nodig is. Deze definitie geeft een indicatie van het pijnniveau dat als 'grenswaarde' kan worden beschouwd, maar informatie over vergelijkbare grenswaarden voor lijden, angst of blijvende schade ontbreekt.

Na de goedkeuring van de Richtlijn werden in 2012 Europese richtsnoeren voor ongerief beoordeling ontwikkeld en goedgekeurd en in een discussiestuk van de NCP-vergadering in januari 2016 werd aanvullende informatie opgenomen om een consistente rapportage te bevorderen.<sup>6,7</sup>

## Waarom is een systeem voor de categorisering van ongerief nodig?

Doordat in de nieuwe Richtlijn een systeem voor indeling naar ongeriefcategorieën is opgenomen, is het mogelijk om doorlopend aandacht te besteden aan verfijning, van ontwerp tot afronding van een procedure, zodat de kwaliteit van onderzoek en dierenwelzijn verbeteren. Opname van het werkelijke ongerief dat door elk dier wordt ondervonden in de statistische rapportage, vergroot bovendien de transparantie en het vertrouwen van het publiek in het gebruik van dieren voor wetenschappelijk onderzoek. Op termijn kunnen deze publicaties informatie opleveren over trends op het gebied van verfijning.

Een aantal Europese landen, waaronder Finland, Duitsland, Ierland, Nederland, Polen, Zweden, Italië, Zwitserland en het VK, en Australië, Canada en Nieuw-Zeeland hanteren al een aantal jaren een systeem voor indeling naar ernst van het ongerief van dierproeven.

Veel van de bestaande systemen rapporteren vooraf, waarbij het aantal categorieën varieert van 3 tot 9.<sup>8</sup> Echter, geen van die systemen gebruikt een combinatie van verwacht, werkelijk en cumulatief ongerief, noch de categorieën zoals vermeld in de nieuwe Richtlijn. Bepaling van het ongerief vooraf, en rapportage van het werkelijk ondervonden ongerief zijn noodzakelijk om een vergelijking te kunnen maken, wanneer een beoordeling achteraf is vereist.

De categorieën van ongerief zijn in Bijlage VIII van de Richtlijn als volgt gedefinieerd:

De ernst van het ongerief van een procedure wordt bepaald aan de hand van de mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die een individueel dier tijdens de procedure naar verwachting zal ondervinden.

### Terminaal:

Procedures die worden uitgevoerd onder algehele verdoving en waarna het dier niet meer bij bewustzijn komt, worden ingedeeld als 'terminaal'.

### Licht:

Procedures waarbij de dieren waarschijnlijk gedurende korte tijd een lichte vorm van pijn, lijden of angst zullen ondervinden, en procedures die geen significante aantasting van het welzijn of de algemene toestand van de dieren opleveren, worden ingedeeld als licht.

### Matig:

Procedures waarbij de dieren waarschijnlijk gedurende korte tijd een matige vorm van pijn, lijden of angst, dan wel langdurig een lichte vorm van pijn, lijden of angst zullen ondervinden en procedures die waarschijnlijk een matige aantasting van het welzijn of de algemene toestand van de dieren zullen opleveren, worden ingedeeld als matig.

### Ernstig:

Procedures waarbij de dieren waarschijnlijk een ernstige vorm van pijn, lijden of angst, dan wel langdurig een matige vorm van pijn, lijden of angst zullen ondervinden en procedures die waarschijnlijk ernstige aantasting van het welzijn of de algemene toestand van de dieren zullen opleveren, worden ingedeeld als ernstig.

Opmerking: Lidstaten hebben de mogelijkheid om in uitzonderlijke omstandigheden en om wetenschappelijk verantwoorde redenen een voorlopige maatregel te treffen om het gebruik van een procedure die leidt tot een ernstige mate van pijn, lijden of angst die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, toe te staan. Voordat dergelijke handelingen doorgang mogen vinden, dient zo'n voorlopige maatregel te worden beoordeeld en goedgekeurd door een EU-comité (Artikel 55).

Voor elke procedure dient te worden ingeschat hoe ernstig het ongerief is dat het dier naar verwachting zal ondervinden. Dit vereiste biedt een kans om in de ontwerpfasen van het onderzoek rekening te houden met de toepassing van de 3V's en te waarborgen dat het ongerief zoveel als mogelijk wordt beperkt binnen de wetenschappelijke beperkingen van het onderzoek.<sup>9,10</sup>

Het overwegen van de ernst van het ongerief kan zo ten goede komen van de dieren door het ongerief te verminderen. Bovendien kan dit de robuustheid van het wetenschappelijk opzet van het onderzoek verbeteren door rekening te houden met de effecten van procedures op bijvoorbeeld fysiologie of gedrag waar een slechtere gezondheidstoestand/welzijn van het dier de uitkomsten kan beïnvloeden, en manieren opleveren waardoor zulke veranderingen geminimaliseerd worden, opdat kwaliteit en consistentie van resultaten verbeteren.

Daarnaast draagt de bepaling van het ongerief bij aan een duidelijke vaststelling van bovengrenzen aan het lijden waaraan dieren worden blootgesteld, en daardoor aan de toepassing van humane eindpunten.

Gedurende het project moeten de 3V's voortdurend worden herbezien door zowel de direct bij het gebruik van dieren betrokkenen als door de Instantie voor Dierenwelzijn (IvD, zoals bepaald in Artikel 27 van de Richtlijn).

Indien vereist, biedt een beoordeling achteraf van een project een verdere mogelijkheid om de welzijnskosten/-schade voor de dieren te herbeoordelen, zodat kan worden vastgesteld of de doelstellingen zijn gehaald en, de juistheid van de indeling naar ernst van het ongerief kan worden heroverwogen, ten behoeve van toekomstig onderzoek.

## Wie bepaalt de ernst van het ongerief?

Bij de aanvraag van een projectvergunning door de gebruiker of de persoon verantwoordelijk voor het project dient voor elke procedure verplicht een ongeriefcategorie te worden voorgesteld (Bijlage VI van de Richtlijn).

De vergunningverlener die de projectevaluatie uitvoert (Artikel 38), voert ook een '*beoordeling en vaststelling van de categorisering naar ernst van het ongerief van de procedures*' uit. De vergunningverlener houdt daarbij, gegeven het projectvoorstel, rekening met de relevante wetenschappelijke expertise, het ontwerp van proeven, de proefdierkundige praktijk dan wel de diergeneeskundige praktijk met betrekking tot wilde dieren en het houden en verzorgen van dieren, zoals passend bij het projectvoorstel.

De vergunningverlener kent bij de projectevaluatie-vooraf aan elke procedure een ongeriefcategorie toe, gebaseerd op de meest ernstige gevolgen die waarschijnlijk door een individueel dier zullen worden ondervonden nadat alle verfijningen zijn toegepast.

De IvD (Artikel 26 en 27) volgt de ontwikkeling en de resultaten van projecten en geeft advies over de mogelijkheden om de 3V's toe te passen binnen deze projecten.

Het **werkelijke ongerief** van procedures wordt door lidstaat in de jaarlijkse statistische rapportages gerapporteerd. Dit betreft de hoogste mate van ongerief ondervonden door het dier als gevolg van de procedure. Dergelijke informatie zal worden verstrekt door de gebruiker of de persoon verantwoordelijk voor het project, waar nodig geïnformeerd door inbreng van wetenschappers, verzorgend personeel, dierenartsen en ter zake kundige experts betrokken bij het project.

De Nationale Comit es voor de bescherming van dieren die worden gebruikt voor wetenschappelijke doeleinden (Artikel 49) worden geacht beste praktijken in de Unie te bevorderen en uit te wisselen. Een belangrijk aspect van hun rol is om een consistente toepassing van ongeriefcategorie en te bevorderen.

## Terminologie

Om een gedeelde aanpak van de beoordeling van en categorisering naar ernst te waarborgen, is enige verduidelijking en standaardisatie van terminologie nodig.

De werkgroep van technische deskundigen (TEWG) die zich in 2003 in opdracht van de Europese Commissie over verschillende aspecten van de nieuwe Richtlijn heeft gebogen, heeft een aantal aanbevelingen gedaan ten

aanzien van de te gebruiken terminologie. Deze aanbevelingen zijn niet rechtstreeks overgenomen en het ontbreken van verdere toelichting in Bijlage VIII heeft geleid tot verdere verwarring over welke aspecten van de procedures (binnen een project) moeten worden beoordeeld op ernst van het ongerief.

#### Richtlijn 2010/63/EU – Artikel 3

Onder ‘procedure’ wordt verstaan: elke al dan niet invasieve handeling ten aanzien van een dier voor experimentele of andere wetenschappelijke 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 het inbrengen van een naald volgens goed diergeneeskundig vakmanschap. Dit omvat ieder gebruik waarvan het doel of het mogelijke gevolg de geboorte of het uit het ei breken van een dier is, dan wel het in een dergelijke toestand brengen en houden van een genetisch gemodificeerde dierenlijn, maar niet het doden van dieren met als enig doel het gebruik van hun organen of weefsels<sup>c</sup>.

Onder ‘project’ wordt verstaan: een werkprogramma met een welomschreven wetenschappelijk doel dat één of meer procedures omvat.

De TEWG-subgroep Autorisatie adviseerde om onderscheid te maken tussen een ‘experiment’ en een ‘project’, en raadde aan de term ‘experiment’ te vervangen door ‘procedure’, om zowel procedures met bekende uitkomsten (bijv. procedures op het gebied van de productie van antilichamen) als met onbekende uitkomsten (bijv. procedures uitgevoerd om een hypothese te testen) onder de definitie te brengen.

Dit begrip werd opgenomen, het verdere aanbevolen onderscheid echter niet.

#### Techniek:

Een technische handeling ten aanzien van één of meer dieren voor een experimenteel of ander wetenschappelijk doel, die bij het dier of de dieren pijn, lijden, angst of blijvende schade kan veroorzaken. Voorbeelden van technische handelingen zijn gavage, injectie, laparotomie, onthouden van voedsel/water.

#### Procedure:

Een combinatie van één of meer technische handelingen ten aanzien van een dier voor een experimenteel of ander wetenschappelijk doel die bij het dier pijn, lijden, angst of blijvende schade kan veroorzaken.

#### Project:

Een samenhangend werkprogramma met een welomschreven wetenschappelijk doel of doelen dat één of meerdere procedures omvat.

Op een NCP-vergadering in oktober 2011 kreeg het begrip éénstaps- en meerstapsprocedure de voorkeur boven het begrip ‘techniek’, aangezien deze term niet is opgenomen in de Richtlijn.

De term ‘procedure’ zou daarom moeten worden gebruikt om de *volledige* reeks stappen (technieken) te beschrijven die moeten worden uitgevoerd om een specifiek experimenteel of ander wetenschappelijk doel te vervullen. Sommige procedures bestaan uit slechts één stap (techniek) (bijv. bloedafname bij een ‘normaal’ dier voor in vitro-onderzoek), maar in de meeste gevallen omvatten procedures meerdere stappen (technieken) (bijv. een vaccinonderzoek, dat kan bestaan uit de toediening van het vaccin, blootstelling aan een ziekteverwekker en bemonstering of biopsie van weefsel).

In Bijlage VIII van de Richtlijn staan voorbeelden van procedures die voor elke categorie van ongerief zijn aangewezen. Er zijn zowel éénstapsprocedures als procedures met meerdere stappen opgenomen.

Bij het bepalen van het ongerief van een procedure moet rekening worden gehouden met de bijdrage van elke stap (techniek) (en de consequenties van elke stap) binnen een procedure aan het algehele ongerief. Bij het injecteren van een stof moet bijvoorbeeld rekening worden gehouden met de impact van de injectie zelf en tevens met de effecten van de geïnjecteerde stof.

---

<sup>c</sup> Noot van de vertaler: Volgens de Nederlandse wet is het doden van dieren met als enig doel het gebruik van hun organen of weefsel, wel een dierproef.

## *Ongeriefbeoordeling vooraf*

De uiteindelijke beoordeling van de ernst van het ongerief van een procedure wordt bepaald door de meest ernstige gevolgen die voor **een individueel dier** verwacht worden. Dit levert een schatting op van het hoogste niveau van lijden dat elk individueel dier binnen een procedure waarschijnlijk zal ondervinden. Deze informatie kan worden gebruikt om een geschikte monitoringstrategie voor de dieren te bepalen en passende humane eindpunten te definiëren.

## *Rapportage van het werkelijk ondervonden ongerief*

Anders dan de ongeriefbeoordeling vooraf, moet het werkelijke (hoogste) ongerief dat door **elk afzonderlijk dier** gedurende de procedure wordt ondervonden, worden vastgesteld aan de hand van observaties die gedurende de procedure zijn geregistreerd, waarna in de jaarlijkse statistische rapportages de werkelijke ernst van het ongerief wordt gemeld.

Het ligt dus voor de hand dat er verschillen in ernst zijn tussen de ongeriefbeoordeling die voorafgaand aan de procedure wordt gemaakt en het gerapporteerde werkelijke ongerief voor elk in de procedure gebruikt dier.

## **‘Onderdrempel’ voor regulering**

Richtlijn 2010/63/EU definieert een ‘procedure’ als *‘een interventie die bij het dier evenveel, of meer, pijn, lijden, angst of blijvende schade kan veroorzaken als het inbrengen van een naald volgens goed diergeneeskundig vakmanschap’*.

Bijlage VIII geeft een aantal voorbeelden die onder deze drempel vallen. Zoals bijvoorbeeld een minimale beperking van het uitwendig aanbrengen van telemetrietoestellen bij daaraan gewende dieren, geringe aanpassingen aan het dieet, waaronder variaties in teststof en beschikbaarheid, mits hiervan geen negatieve gevolgen te verwachten zijn.

In de Bijlage wordt er tevens op gewezen dat een bepaalde frequentie of combinatie van interventies ‘onder de drempel’ een cumulatief effect kan opleveren, waardoor de procedure als ‘licht of hoger’ moet worden ingedeeld.

Een voorbeeld is wetenschappelijk onderzoek naar nieuwe houderij-praktijken, waarbij sprake is van significante veranderingen in schoonmaakfrequentie en verstoring van sociale groepen. Dit zal waarschijnlijk een bepaalde mate van leed en angst veroorzaken, waardoor een projectvergunning nodig kan zijn.

## **Beoordeling van de ernst van het ongerief van procedures en de schade-batenanalyse van projecten**

De bij de projectbeoordeling verplichte schade-batenanalyse (Artikel 38) heeft betrekking op het waarschijnlijke effect op alle bij het project gebruikte dieren. Hierin moet dus rekening worden gehouden met alle potentiële schades voor *alle* dieren.

De categorisering naar de mate van ongerief van elke afzonderlijke procedure levert daarentegen een indicatie op van het hoogste niveau van lijden per individueel dier gebruikt in de procedure. Hieruit volgt dat voor een projectevaluatie veel meer gedetailleerde informatie nodig is over de schade aan het welzijn van alle dieren, dan een eenvoudige indeling naar mate van ongerief van de procedures, die onderdeel uitmaken van het project oplevert.

In een vaccinonderzoek kunnen bepaalde dieren (ongevaccineerde controlegroep) bijvoorbeeld een ernstige klinische ziekte ontwikkelen, waardoor de procedure als ‘ernstig’ moet worden ingedeeld.

Daar staat tegenover dat de meerderheid van de dieren die een effectief vaccin krijgen toegediend, waarschijnlijk slechts lichte negatieve gevolgen zullen ondervinden.

Een dergelijk gedetailleerd inzicht in de waarschijnlijke impact op alle dieren die bij een project worden gebruikt, is noodzakelijk voor een gefundeerde schade-batenanalyse.<sup>10</sup>

In het bovenstaande projectvoorbeeld, de ontwikkeling van een nieuw vaccin tegen een ziekte met een hoog sterftecijfer, zal de schade-batenanalyse van het project waarschijnlijk gunstig uitvallen. Uiteraard is een gunstig oordeel afhankelijk van nog vele andere factoren, zoals ervaring en de toepassing van de 3V's in de procedures.

## **Planning van een procedure**

De aanvrager dient het projectvoorstel te bespreken met de dierenarts (of, indien opportuun, een voldoende gekwalificeerde deskundige), verzorgend personeel en/of IvD, om te overwegen welke procedures er worden gebruikt, welke mogelijkheden er zijn voor toepassing van de 3V's, zoals geschikte toedienings- en bemonsteringsstrategieën, en om passende criteria voor monitoring/beoordeling, interventies om lijden tot een minimum te beperken en, waar van toepassing, humane eindpunten overeen te komen.

Alle personen die betrokken zijn bij de ongeriefbeoordeling, dienen te beschikken over een gedegen inzicht in diergedrag en dierenwelzijn en kennis van indicatoren van ontoereikend welzijn, pijn en leed bij de gebruikte soorten.<sup>4</sup>

Dit proces waarborgt dat al het bij het onderzoek betrokken personeel kan bijdragen aan de opzet van het onderzoek, en dat alle betrokkenen zich bewust zijn van de potentiële negatieve gevolgen, hoe de dieren worden gemonitord en welke methoden worden toegepast om het lijden tot een minimum te beperken.

Een effectieve samenwerking tussen alle betrokkenen is noodzakelijk om te zorgen voor een consistente interpretatie en minimalisatie van lijden, verenigbaar met de wetenschappelijke doelstellingen.

### *Training in ongeriefbeoordeling*

Hoewel de projectleider de gegevens met betrekking tot het werkelijk ondervonden ongerief doorgeeft voor de nationale statistieken (in Nederland de inspectie), wordt de beoordeling van dat werkelijke ongerief vaak uitgevoerd door de personen die direct betrokken zijn bij het uitvoeren van procedures en het observeren en verzorgen van de dieren.

Het is dan ook van essentieel belang dat alle betrokkenen naar behoren zijn opgeleid en over een goede kennis beschikken van normaal en abnormaal gedrag van de gebruikte soort/lijn.

## **Hoe moet de ernst van het ongerief worden bepaald?**

### *Beoordeling van het ongerief van procedures vooraf*

Voor een juiste indeling naar de ernst van het ongerief van een procedure moet rekening worden gehouden met een groot aantal factoren.

Hoewel een beoordeling grotendeels subjectief is, verbetert met het beschikbaar komen van meer wetenschappelijke informatie ons inzicht in hoe pijn, lijden en angst te herkennen zijn. Daarom is het van belang om de ontwikkelingen in dit snel veranderende onderzoeksveld te blijven volgen.

In Bijlage VIII van de Richtlijn 2010/63/EU en in het Ernstbeoordelingskader is een aantal voorbeelden opgenomen van indeling naar ernst van het ongerief van procedures.

Bij het bepalen van een passende indeling naar ernst moet rekening worden gehouden met de impact van elke stap van de geplande procedure op het dier:

- i. *Wat gebeurt er tijdens deze procedure met de dieren?*
- ii. *Welk effect zal dit op de dieren hebben?*
- iii. *Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken?*
- iv. *Welke interventies zijn er mogelijk om de impact op de dieren te beperken?*



(i) *Wat gebeurt er tijdens deze procedure met de dieren?*

Alle stappen van de procedure moeten in beschouwing worden genomen:

- Verandering van normale omgeving, houderij- en verzorgingspraktijken
- Conditionering/training; hantering en beperking
- Toediening/injectie van stoffen: routes, volumes, frequentie
- Bemonstering: wat er wordt bemonsterd, waar het monster wordt genomen, hoeveel en hoe frequent worden de monsters genomen
- Chirurgische en andere invasieve interventies
- Gebruik van verdoving: lokaal, algemeen, regionaal en/of analgesie
- Duur van het onderzoek
- In geval van veldonderzoek: vangstmethode en -frequentie, onbedoelde vangst van niet-doelsoorten, tijdelijke huisvesting, etc.

(ii) *Welk effect hebben deze interventies op de dieren?*

Veranderingen in de omgeving, houderij- en verzorgingspraktijken kunnen in eerste instantie gevolgen hebben voor het dierenwelzijn en leiden tot veranderingen in gedrag (bijv. toegenomen agressie), maar gewenning van de dieren zal potentiële angst verminderen.<sup>11</sup> Hetzelfde geldt voor procedures waarbij hantering en in bedwang houden aan de orde is. Gedragsconditionering bij de dieren, zoals adaptatie aan hantering of structurele positieve bekrachtigingstraining kan de dieren beter voorbereiden op procedures en deze effecten verminderen.

Toediening van stoffen en bemonsteringsprocedures kunnen negatieve gevolgen hebben voor het welzijn op lange of korte termijn, afhankelijk van de routes, volumes en effecten van de toegediende stoffen.

Chirurgische interventies zullen waarschijnlijk enige pijn veroorzaken, zelfs met goede perioperatieve zorg (inclusief het gebruik van analgesie).

(iii) *Hoeveel lijden zullen deze interventies veroorzaken?*

Er moet rekening worden gehouden met alle individuele elementen, en hoe deze op elkaar inwerken.

De aard, intensiteit en duur van elke interventie is van invloed op de algehele ernst van het ongerief.

Ook dient rekening te worden gehouden met de frequentie van interventies en de hersteltijd tussen interventies.

De duur van het onderzoek is een belangrijke factor om te overwegen, evenals de periode waarin het dier pijn, lijden of angst kan ondervinden. Bij een veiligheidsevaluatie/toxicologie-onderzoek kan een acuut onderzoek, afhankelijk van de dosering, bijvoorbeeld veel ongerief veroorzaken als gevolg van de toediening van medicatie. Dit is echter over het algemeen van korte duur. Ter vergelijking: een dier kan op jonge leeftijd worden blootgesteld aan besmet materiaal (bijv. scrapie/BSE) zonder aanvankelijke negatieve gevolgen en, als gevolg van de zeer lange incubatietijd, een goede gezondheid houden tot de eerste klinische symptomen van de ziekte zich voordoen.

Bij onderzoeken naar chronische toxicologie kunnen dieren over een groot aantal maanden lichte/matige negatieve gevolgen ondervinden als gevolg van een combinatie van dagelijkse dosering en de effecten van de teststof.

Bij onderzoek in het wild is een zorgvuldige beoordeling van de projectvergunning uiterst relevant, aangezien er alleen een ongeriefbeoordeling moet worden gerapporteerd voor de gebruikte dieren, zoals beschreven onder de projectvergunning.<sup>7</sup>

Wanneer in overeenstemming met Artikel 10 uitzonderingen worden gemaakt voor het gebruik van in het wild gevangen dieren, is **het heel belangrijk om te controleren of de vangst in het wild wordt beschouwd als onderdeel van de wetenschappelijke procedure** en die handeling bijgevolg in de ongeriefrapportage moet worden opgenomen. **Wanneer de vangst en het transport geen onderdeel zijn van het project** (bijv. 100 vissen gevangen en overgebracht naar een lab waar ze worden verdeeld over verschillende projecten over een bepaalde periode en twee vissen sterven tijdens het vangstproces door letsel in netten) **moet het ongerief niet worden gerapporteerd, aangezien noch de vangst, noch het transport een specifiek onderdeel vormt van de wetenschappelijke doelstelling.**

**Als ‘dieren uit het wild halen’ echter één van de wetenschappelijke doelen is (bijv. effect van vangst en transport op gedrag van dieren) dan moet de geobserveerde ernst van het ongerief worden meegenomen in de rapportage van het werkelijke ongerief.**

Vanzelfsprekend moet een gepast welzijn tijdens vangst en transport onder de Richtlijn gewaarborgd zijn: het vangen van dieren moet gebeuren door een deskundig persoon/personen met methoden die bij de dieren geen pijn, lijden, angst of blijvende schade veroorzaken die vermijdbaar is; dieren moeten onder geschikte omstandigheden worden vervoerd met gebruik van passende insluitingsmethoden. Dieren die gewond blijken of in slechte gezondheid verkeren, moeten door een dierenarts of een ander deskundig persoon worden onderzocht waarna maatregelen worden genomen om de dieren zo weinig mogelijk te laten lijden. Er moet bijzondere aandacht worden besteed en er moeten speciale maatregelen worden genomen voor de acclimatisatie, quarantaine, huisvesting, houderij en verzorging van in het wild gevangen dieren, en wanneer aan de orde moeten voorzieningen worden getroffen om hen na afloop van de procedures vrij te laten.

(iv) *Welke interventies zijn er mogelijk om het effect op de dieren te beperken?*

Hoe kan het lijden tot een minimum worden beperkt? Hoe zijn de 3V's toegepast in het project/de procedure?

- Streef naar zo min mogelijk verstoring op het gebied van huisvesting, houderij- en verzorgingspraktijken.
- Ontwikkel processen voor acclimatisering, voer in voorkomend geval trainingsprogramma's in.
- Overweeg procedures voor toediening en bemonstering die het effect op dieren tot een minimum te beperken. Toediening via een minipomp kan er bijvoorbeeld voor zorgen dat de negatieve impact op het welzijn kleiner is dan bij meerdere toedieningen per dag, die soms stressvolle inbedwanghouding en gewenning aan hantering vereisen. Dit voordeel moet echter worden afgewogen tegen de noodzaak van een chirurgische ingreep en de relatieve grootte van het implantaat, dat van invloed kan zijn op de voortbeweging en/of het gedrag.
- Chirurgische interventies dienen gepaard te gaan met effectieve perioperatieve zorg en passende preëemptieve en postoperatieve analgesie.
- Denk bij de planning van procedures na over de ontwikkeling van monitoring/scoringsystemen voor dierenwelzijn en het in kaart brengen van waarschijnlijke klinische symptomen en het bepalen van vroege eindpunten (verenigbaar met wetenschappelijke doelen).

Elk element van een procedure dient kritisch te worden bekeken om er zeker van te zijn dat de 3V's op de juiste manier zijn toegepast. Deze zaken dienen eerst door de aanvrager van het project te worden overwogen, op basis van informatie verkregen uit gesprekken met de dierenarts, het verzorgend personeel en de IvD, voordat de details van de procedure definitief worden vastgesteld en er in de aanvraag een ongeriefbeoordeling wordt toegekend.

Besprekingen vooraf met al het relevante personeel waarborgen dat de meest verfijnde procedure wordt ontwikkeld.

Dit overleg dient gedurende de hele procedure te worden voortgezet om te waarborgen dat alle mogelijkheden worden benut om verdere verfijningen te ontwikkelen en toe te passen naarmate deze beschikbaar komen, bijvoorbeeld door nieuwe publicaties.

## **Beoordeling achteraf en het 'werkelijke' ongerief**

Zoals eerder aangegeven, bevat de Richtlijn vereisten voor de beoordeling van het werkelijk ondervonden ongerief door elk dier en dat, voor bepaalde projecten, een beoordeling achteraf wordt uitgevoerd (Artikel 39).

Bepaling van het werkelijk ondervonden ongerief is om een aantal redenen noodzakelijk:

- verstrekking van informatie voor de jaarlijkse statistische rapportages over diergebruik;
- afweging van verzoeken voor hergebruik van dieren mogelijk maken;
- als bijdrage aan de beoordeling achteraf van projecten (waar vereist).

Een beoordeling achteraf vereist naast het werkelijke ongerief dat de dieren hebben ondervonden, ook een beoordeling of de doelstellingen van het project werden bereikt, en of verdere mogelijkheden voor het in de praktijk brengen van de 3V's zijn gevonden. Alle projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en projecten die als 'ernstig' gecategoriseerde procedures omvatten, **moeten** aan een beoordeling achteraf worden onderworpen.

Een beoordeling achteraf kan vereist zijn voor andere projecten – deze worden door de vergunningverlener bepaald tijdens de projectevaluatie en de aanvrager wordt geïnformeerd waar en wanneer een beoordeling achteraf vereist is.

Om het 'werkelijke' ongerief te kunnen bepalen, is het nodig om project-specifieke systemen te ontwikkelen voor registratie en beoordeling, waarin alle noodzakelijke informatie wordt vastgelegd in een formaat dat latere beoordeling en categorisering van het werkelijke ongerief mogelijk maakt.

## **Ontwikkeling van een systeem voor monitoring en beoordeling van het welzijn**

Er zijn veel publicaties die richtlijnen bieden voor de beoordeling van het welzijn van dieren die wetenschappelijke procedures ondergaan (zie onderstaande verwijzingen). De Werkgroep verwijst lezers in het bijzonder naar drie artikelen over het ontwerp en gebruik van formulieren voor follow-up en evaluatie, namelijk artikelen door Morton, Buchanan-Smith en het rapport van de BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement.<sup>12-14</sup> Deze artikelen bieden niet alleen achtergrondinformatie over dit onderwerp, ze behandelen ook de voordelen van het gebruik van dergelijke formulieren voor de proefdieren, het verzorgende personeel en het wetenschappelijke project. Andere nuttige referenties zijn de Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits, de Rabbit Grimace Scale – een nieuwe methode voor pijnbeoordeling bij konijnen, en de publicatie van de FELASA uit 1994, waarin richtlijnen worden gegeven ten aanzien van pijn en angst, met algemeen advies over klinische symptomen bij knaagdieren en haasachtigen corresponderend met een ongeriefcategorie.<sup>15-17</sup>

Een ideaal beoordelingssysteem zou eenvoudige, objectieve maatstaven bevatten die consistent kunnen worden toegepast en gebruikt om het ontstaan van pijn, lijden en angst bij dieren die wetenschappelijke procedures ondergaan, op te merken en de ontwikkeling daarvan te monitoren. Helaas bestaat zo'n systeem niet en zal dit er waarschijnlijk ook nooit komen, gezien de brede variatie aan gedragingen en gedragsreacties bij verschillende soorten, lijnen en individuele dieren en de specifieke kenmerken van procedures.

Het gebruik van specifiek op het project afgestemde beoordelingssystemen, tezamen met opgeleid, ervaren personeel, kan bijdragen aan significante verfijningen in diermodellen. Het is dus belangrijk om een lijst van mogelijke en/of geobserveerde gedragsreacties of klinische reacties op te stellen, die bovendien waar mogelijk moet worden geëvalueerd en gekwantificeerd of gescoord, en wellicht helpt adequate humane eindpunten te identificeren. Er zijn bijvoorbeeld infectieonderzoeken waarbij met succes de monitoring van lichaamstemperatuur wordt gebruikt om vroege passende eindpunten aan te wijzen voordat sprake was van klinisch bewijs van ziekte, zonder dat dit de wetenschappelijke doelstellingen van het onderzoek in de weg stond.<sup>18</sup>

Bij de ontwikkeling van een systeem voor monitoring en beoordeling moet rekening worden gehouden met de volgende punten:

- Het moet gericht zijn op een individueel dier en niet op een groep proefdieren, hoewel dit moeilijk kan zijn wanneer gewerkt wordt met grote groepen (bijv. bij bepaalde onderzoeken met vissen).
- Het niveau van ongerief dat door elk dier wordt ondervonden, moet worden gerapporteerd aan de hand van de categorieën licht, matig en ernstig.
- In de opzet van het registratiesysteem moet rekening worden gehouden met de administratieve lastendruk.
- Het systeem dient, waar mogelijk, gebruik te maken van objectieve maatstaven om het niveau van pijn, lijden of angst te beoordelen dat door het dier gedurende de procedure wordt ondervonden.
- Het systeem dient een definitie en beschrijving van humane eindpunten te bevatten.
- Het volgende moet worden gemonitord: (a) dierenwelzijnsaspecten, zowel verwacht als onverwacht, die optreden in de loop van het project, (b) alle verfijningsmaatregelen die in de loop van het project zijn genomen.
- Er dienen beoordelingscriteria te worden opgenomen voor de ongeriefclassificatie. Veel van de gepubliceerde systemen pleiten voor een numeriek scoringsysteem in de een of andere vorm, waarbij klinische symptomen worden geëvalueerd en gekoppeld aan een bepaalde ongeriefcategorie. Vanzelfsprekend is objectieve scoring beter mogelijk op grond van expertise en een deskundig oordeel.
- Gestandaardiseerde registratie is van essentieel belang. Hoewel wordt erkend dat alle scoringsystemen criteria zullen bevatten die in zekere zin subjectief zijn, dient de geregistreerde informatie specifiek te zijn voor het model en de gebruikte soort.

### *Ontwikkeling van een geschikt registratiesysteem*

- Ontwikkel, afgestemd op het onderzoeksproject, een beoordelingsblad voor dierenwelzijn door middel van gesprekken met onderzoekers, verzorgend personeel en de dierenarts (of, indien opportuun, een voldoende gekwalificeerde deskundige).
- Scoor waar van toepassing de tekenen van ongerief op een gebruiksvriendelijke schaal van normaal (score = 0) tot het hoogste niveau van ongerief. Gebruik waar mogelijk objectieve scoring.
- Breng interventiecriteria in kaart – vermeld bijvoorbeeld symptomen die veterinaire controle/interventie vereisen.
- Definieer de grens van aanvaardbaar of toelaatbaar ongerief (bijv. een maximumscore voor klinische symptomen/gedrag voor de procedures die niet mag worden overschreden. Deze score kan vervolgens worden gebruikt als de score waarbij een humaan eindpunt wordt toegepast).
- Besteed ook aandacht aan de beoordeling van gecumuleerd lijden en, in voorkomende gevallen, criteria voor hergebruik.
- Een formulier in elektronische vorm kan het invoeren van gegevens vereenvoudigen; informatie kan op elk moment worden gewijzigd, zodat onverwachte gebeurtenissen en nieuwe gebeurtenissen die zich in de loop van het project voordoen, kunnen worden geregistreerd, en informatie kan gemakkelijk door alle betrokkenen (biotechnici, onderzoekers, dierenartsen, IvD, etc.) worden gedeeld.
- Het beoordelingsblad moet eenvoudig en gemakkelijk te gebruiken zijn voor ervaren en onervaren of beginnende waarnemers en gebaseerd zijn op en werken met overeengekomen terminologie (bijv. de 'Begrippenlijst van klinische symptomen' (Glossary of Clinical Signs) van de FELASA).<sup>19</sup> De opzet van het beoordelingsblad moet zodanig zijn dat de resultaten van verschillende momenten van observatie van de proefdieren, zoals bij hantering, van dichtbij of van afstand, kunnen worden geregistreerd.
- De opzet van het beoordelingsblad moet zodanig zijn dat het gemakkelijk kan worden aangepast aan veranderende situaties, type project en diersoort.
- Op het beoordelingsblad moet, waar nodig, kunnen worden geregistreerd op welk tijdstip gedurende het project elke procedure of techniek is uitgevoerd, of verfijning is toegepast.
- Het beoordelingsblad dient de gehele duur van een project bruikbaar te zijn. Het bijhouden van dit soort beoordelingen is van nut bij zowel de evaluatie van het project als voor het aanscherpen van verbeteringen in toekomstig onderzoek.

### **Bepaling van het werkelijke ongerief**

Het algehele of cumulatief ongerief van een dier kan worden ingeschat aan de hand van de aard en hoeveelheid van negatieve en onverwachte gevolgen die in de loop van een procedure zijn opgetreden. Het niveau van ongerief dat elk dier gedurende een procedure ondervindt, wordt beïnvloed door verschillende factoren, die allemaal moeten worden meegenomen.

De onderstaande, niet-uitputtende lijst geeft een indicatie van de factoren die van invloed kunnen zijn op de hoeveelheid en het niveau van het ongerief dat een proefdier kan ondervinden gedurende een wetenschappelijke procedure, en waarmee rekening moet worden gehouden bij het bepalen van het gecumuleerde lijden van een proefdier:

- de duur van het project/de procedure;
- de duur van negatieve gevolgen;
- het aantal procedures dat op het dier is uitgevoerd;
- de frequentie waarmee de procedures zijn uitgevoerd;
- informatie over of het in dit project gebruikte dier wordt hergebruikt;
- een beoordeling van de klinische conditie en het fysieke welzijn van het dier aan het einde van de procedure, inclusief vaststelling van de factoren die van invloed zijn op het lichaamsgewicht en de lichaamsconditie;
- een beoordeling van de impact op het gedrag of het psychologisch welbevinden van het dier, bijvoorbeeld het optreden van abnormaal, stereotiep of agressief gedrag.

Bij de bepaling van het werkelijke ongerief kan tevens rekening worden gehouden met de volgende factoren:

- hoe het dier is geconditioneerd (bijv. adaptatie, training);
- het aantal (chirurgische) interventies;
- de routes, volumes en frequenties van toediening van stoffen en geneesmiddelen;
- de fysische en chemische eigenschappen van de toegediende teststof of oplossing, bijvoorbeeld of herhaaldelijke injecties of injecties van zure of basische stoffen tot plaatselijke irritatie en necrose hebben geleid;

- de routes, frequentie en afgenomen volumes bij bloedafnames;
- de methode en frequentie van inbedwanghouding;
- veranderingen in sociale structuur/separatie en individueel huisvesten van sociale dieren.

Hoewel elk element van invloed kan zijn op het ongerief, zal het werkelijk ondervonden ongerief grotendeels worden bepaald door de effectiviteit van de maatregelen die worden genomen om de negatieve gevolgen van de procedure te verzachten – bijvoorbeeld het gebruik van analgesie om postoperatieve pijn te verminderen.

Om het werkelijk ongerief te kunnen bepalen, is een evaluatie nodig van de toepassing en consequenties van de toegepaste procedures en de effectiviteit van maatregelen die zijn genomen om het lijden tot een minimum te beperken. Het werkelijke ongerief kan alleen worden bepaald na een beoordeling van alle gevolgen die gedurende de hele procedure door het dier worden ondervonden. Dit betekent dat er gerichte klinische registraties moeten worden bijgehouden en in aanmerking genomen.

Het werkelijke ongerief dat voor elk individueel dier wordt gerapporteerd, dient te worden gebaseerd op het hoogste niveau van ongerief dat in de loop van de procedure wordt ondervonden en niet op het ongerief aan het einde van de procedure.

## **Bepaling van het werkelijke ongerief als dieren tijdens het onderzoek dood worden aangetroffen**

Ondanks zorgvuldige monitoring van de dieren is het mogelijk dat een dier dood wordt aangetroffen als gevolg van de experimentele procedure, dan wel van andere, ongerelateerde, oorzaken. Enkele richtsnoeren voor het indelen naar ernst van dergelijke gevallen worden aangereikt in het werkdocument van de Commissie inzake een ernstbeoordelingskader en in het discussiestuk uit 2016.<sup>6,7</sup> Hierin staat: *‘Ten behoeve van statistische rapportage moet de werkelijke ernst van het ongerief voornamelijk gekoppeld zijn aan de ernst van het ongerief van de experimentele procedures en niet aan ongerelateerde incidenten zoals uitbraken van ziekten of overstroming van kooien’ en ‘het werkelijke ongerief voor dood aangetroffen dieren moet worden gerapporteerd in de categorie ‘ernstig’, tenzij kan worden aangetoond dat het dier voorafgaand aan de dood geen ernstig lijden heeft ondervonden. Als het onwaarschijnlijk is dat de dood vooraf is gegaan door ernstig lijden, moet de indeling naar het werkelijke ongerief de bekende ervaring voorafgaand aan de dood weerspiegelen. Factoren zoals frequentie van monitoring, gebruik van analgesie, etc. moeten naar behoren in aanmerking worden genomen.’*

Elke dood van een dier moet zo snel mogelijk zorgvuldig worden geëvalueerd door de betrokkenen (bijv. wetenschapper/verzorgend personeel/dierenarts) om te waarborgen dat alle relevante informatie beschikbaar is om vast te stellen of de dood procedure-gerelateerd is en om een passend ongeriefniveau te kunnen bepalen voor rapportagedoeleinden. *Ongeacht de oorzaak* moeten maatregelen worden genomen om herhaling te voorkomen.

Wanneer het werkelijk ondervonden ongerief het voorafgaand aan de procedure verwachte niveau overstijgt, kan het noodzakelijk zijn om de autoriteiten op de hoogte te stellen en/of projectvergunning te herzien.

Verdere richtlijnen voor de toekenning van het werkelijke ongerief als dieren tijdens het onderzoek dood worden aangetroffen, zijn te vinden in het EU-discussiestuk van januari 2016, dat een illustratief beslisschema bevat ter ondersteuning van de vaststelling van de ernst van het ongerief van dood aangetroffen dieren ten behoeve van statistische rapportage (hieronder opgenomen).<sup>7</sup>

1. Is de dood wel of niet *gerelateerd* aan *de procedure* die het dier onderging?

1.1. Ongerelateerd

Voorbeelden van ongerelateerde dood:

- tekortkomingen in uitrusting of omgevingsbeheersing, zoals het overstromen van kooien, defecte verwarming/ventilatie;
- onjuiste houderij- of verzorgingspraktijken zoals onjuiste voeding (bijv. onevenwichtig) of besmet voer (bijv. slechte opslagmethode);
- agressie tussen dieren bij groepshuisvesting;
- ongerelateerde ziekten en infecties;
- *Oudere dieren*: sterfte bij dieren in langdurige onderzoeken moeten worden geëvalueerd om **duidelijk onderscheid te maken tussen** sterfte als **gevolg van de procedure** en sterfte als **gevolg van het**

**natuurlijke verouderingsproces.** Sterfte in dergelijke onderzoeken moet niet automatisch in de categorie ernstig worden geplaatst en de klinische geschiedenis en conditie van het dier op het moment van de laatste observatie moeten naar behoren in aanmerking worden genomen.

- Bij het fokken van *genetisch gemodificeerde dieren van een bestendige lijn*, waarbij de **genetische modificatie niet geacht wordt sterfte te veroorzaken** op basis van de welzijnsbeoordeling uitgevoerd op de bestendige lijn, is het onwaarschijnlijk dat gedurende het fokprogramma optredende sterfte te wijten is aan de genetische modificatie.

Het werkelijke ongerief voor het dier moet het hoogste niveau van ongerief weerspiegelen dat door het dier in de loop van de procedure is ondervonden (*met uitzondering* van het niveau van ongerief gerelateerd aan de dood).

1.2. Gerelateerd: ga verder naar vraag 2.

**2. Kan er een geïnformeerde beslissing worden genomen over de gebeurtenissen die hebben geleid tot de dood?** Factoren zoals frequentie van monitoring, gebruik van analgesie, etc. moeten naar behoren in aanmerking worden genomen.

2.1. **Ja**, bijvoorbeeld:

- dier is in postoperatieve periode niet meer tot volledig bewustzijn gekomen, maar er is voortdurend passend pijnstillingsprotocol toegepast;
- gedurende de hele procedure zijn geen klinische afwijkingen geregistreerd, noch verwacht, maar enkele uren na klinisch onderzoek is het dier dood aangetroffen.

Het gerapporteerde werkelijke ongerief dient het ongerief als gevolg van de aangenomen gebeurtenissen die tot de dood hebben geleid, te weerspiegelen.

2.2. **Nee**

De werkelijke ernst van het ongerief moet worden gerapporteerd als 'ernstig'.

## Hergebruik van dieren en cumulatief ongerief

Hergebruik van dieren in verdere procedures is onder Richtlijn 2010/63/EU toegestaan, maar is afhankelijk van een aantal factoren, waaronder: het werkelijk ondervonden ongerief van de eerdere procedure, de algemene gezondheid en het welzijn van het dier moeten volledig zijn hersteld en hergebruik moet in overeenstemming zijn met diergeneeskundig advies, waarbij rekening wordt gehouden met de volledige levensloop van het dier.<sup>20</sup>

Het kan moeilijk zijn om het ongerief te beoordelen dat een dier zal ondervinden door een individuele wetenschappelijke procedure, als dieren over een langere periode een aantal meerstappoprocedures ondergaan, vooral wanneer de aard van de procedures betekent dat de dieren worden blootgesteld aan veranderingen in normale huisvesting en verzorgingspraktijken (bijv. perioden van individuele huisvesting).

Om hergebruik te kunnen toestaan, is een dergelijke beoordeling echter nodig, waarbij de volledige levensloop van het dier in aanmerking moet worden genomen. Daarmee is er nog een gebied dat in aanmerking moet worden genomen, aangezien nu niet alleen rekening moet worden gehouden met directe pijn, lijden of angst veroorzaakt door de verschillende stappen van de procedure, maar ook met incidenteel lijden als gevolg van de manier waarop het dier gedurende zijn hele levensloop wordt gehouden en verzorgd.

Lijden over de gehele levensloop of cumulatief ongerief kan worden beschouwd als de combinatie van direct lijden (als gevolg van de toepassing van wetenschappelijke procedures), eventuele klinische aandoeningen waaraan het dier heeft geleden (al dan niet als gevolg van de uitgevoerde procedure, bijv. tussentijds optredende ziekte of operatiewond) en incidenteel lijden (huisvesting, houderij, vervoer, etc.). Hierbij dient rekening te worden gehouden met de duur van deze gebeurtenissen.

De belangrijkste aspecten waarmee bij de beoordeling van de volledige levensloop rekening moet worden gehouden, zijn:

- de duur van blootstelling aan pijn, lijden, angst of blijvende schade – een langere duur zal waarschijnlijk leiden tot een hoger ongerief;

- de aard en intensiteit van de effecten op de dieren;
- het interval tussen procedures – hoe korter het interval, hoe minder kans het dier (meestal) heeft om terug te keren naar zijn normale toestand;
- de aard van de interventies en maatregelen die worden genomen om het lijden te verzachten;
- een overweging van eventueel incidenteel lijden.

## **Voorbeelden ter illustratie van de indeling naar ongerief en rapportage van ongerief zijn opgenomen in bijlage 1**

De bijgevoegde uitgewerkte voorbeelden (Bijlage 1) waren actueel op het moment van totstandkoming van dit rapport en zijn voorbeelden uit de praktijk van hoe indeling naar ernst van het ongerief en rapportage kunnen worden aangepakt. Ze werpen licht op de wetenschappelijke en welzijnsaspecten waarmee rekening moet worden gehouden, bevatten suggesties voor verbeteringen die kunnen worden aangebracht door kritisch te kijken naar de opzet van onderzoeken, en geven realistische indelingen naar mate van ongerief voor illustratieve doeleinden. De voorbeelden bevatten tevens voorbeelden van registratiesystemen die tijdens onderzoeken kunnen worden gebruikt om het werkelijke ongerief te monitoren en beoordelen en elementen bij te dragen voor de beoordeling van een project achteraf.

Aangezien het mogelijk is dat er sinds de ontwikkeling van deze voorbeelden verdere mogelijkheden voor toepassing van de 3V's zijn bijgekomen, is het niet de bedoeling dat deze voorbeelden in ongewijzigde vorm door onderzoekers worden gebruikt. Elk project is anders en met name verschillen in wetenschappelijke doelstellingen kunnen van grote invloed zijn op het algehele ongerief van een procedure. De voorbeelden zijn bedoeld om uitleg te geven bij deze stapsgewijze benadering van indeling naar mate van ongerief, en gebruik hiervan te stimuleren. Indien juist toegepast, zou dit moeten leiden tot het beoogde resultaat, namelijk verbeterde wetenschappelijke resultaten, verbeterd dierenwelzijn en een consistente beoordeling en rapportage van het werkelijke ongerief.

De werkgroep heeft diersmodellen gekozen die binnen de wetenschappelijke wereld algemeen worden gebruikt en heeft voor elk van deze modellen de vier eerdergenoemde vragen beantwoord, te weten: *Wat gebeurt er tijdens dit onderzoek met de dieren? Welk effect zal dit op de dieren hebben? Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken? Welke interventies zijn er mogelijk om het effect op de dieren te beperken?*

### *In dit rapport opgenomen modellen*

1. Infectiebestrijding: beoordeling van de bescherming van kandidaat-vaccins in een muis-model van tuberculose en screening van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen
2. Neuropathische pijn: spinale zenuwligatie bij ratten
3. Beroerte: werkzaamheid van een nieuw therapeutisch agens bij afsluiting van middelste hersenslagader (MCAO) m.b.v. intraluminale draad bij penseelapen
4. Cardiovasculaire evaluatie van nieuwe therapieën: het telemetriemodel bij honden
5. Atriumfibrillatie: evaluatie van nieuwe anti-aritmica bij konijnen
6. Ecotoxicologie: bepaling van bioaccumulatie m.b.v. de doorstroomtest bij vissen
7. Regulatorische toxicologie: beoordeling van acute orale toxiciteit bij ratten
8. Farmacokinetiek: bepaling van de farmacokinetica na eenmalige toediening van een teststof bij honden

## **Verklaring van tegenstrijdige belangen**

De auteur(s) verklaart/verklaren geen potentiële belangenverstremming te hebben met betrekking tot het onderzoek, auteurschap en/of publicatie van dit artikel.

### Financiële ondersteuning

De auteur(s) vermeldt/vermelden de volgende financiële ondersteuning te hebben ontvangen voor publicatie van dit artikel. Publicatie van ons werk werd ondersteund door een beurs van Laboratory Animals Limited.

### Dankbetuiging

De auteurs danken Laszlo Dezsi voor technische ondersteuning bij het spinale zenuwligatie-model en Pascale van Loo voor technische ondersteuning bij het farmacokinetische model.

## Referenties

1. The European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off J Eur Union* 2010; L276: 33–79.
2. European Commission. Implementing decision of 20 December 2013 correcting Annex II to implementing Decision 2012/707/EU establishing a common format for the submission of the information pursuant to Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes (2014/11/EU). *Off J Eur Union* 2014; L10: 18.
3. Rüllicke T, Montagutelli X, Pintado B, et al. Guidelines for the production and nomenclature of transgenic rodents: FELASA Working Group Report. *Lab Anim* 2009; 41: 301–311.
4. Voipio HM, Baneux P, Gomez de Segura IA, et al. Guidelines for the veterinary care of laboratory animals: report of the FELASA/ECLAM/ESLAV Joint Working Group on Veterinary Care. *Lab Anim* 2008; 42: 1–11.
5. European Commission. Examples to illustrate the process of severity classification, day-to-day assessment and actual severity assessment, [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/examples.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/examples.pdf) (2013, accessed 14 May 2017).
6. National Competent Authorities for the Implementation of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Working document on a severity assessment framework, [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/Endorsed\\_Severity\\_Assessment.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Endorsed_Severity_Assessment.pdf) (2012, accessed 14 May 2017).
7. Bioscience for the Future Research Council. Discussion paper for the purposes of promoting consistent reporting of statistical data (actual severity and animal numbers) under Article 54(2) of Directive 2010/63/EU and Commission Implementing Decision 2012/707/EU, [http://www.bbsrc.ac.uk/documents/1601-discussion-paperreporting-statistical-data-pdf\(2016.accessed14May2017\)](http://www.bbsrc.ac.uk/documents/1601-discussion-paperreporting-statistical-data-pdf(2016.accessed14May2017)).
8. Fenwick N, Ormandy E, Gauthier C, et al. Classifying the severity of scientific animal use: a review of international systems. *Anim Welf* 2011; 20: 281–301.
9. Russell WMS and Burch RL. Principles of humane experimental technique, Special ed. Wheathampstead, UK: UFAW, 1992.
10. Smith JA, van den Broek FA, Martorell JC, et al. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: FELASA Working Group on Ethical Evaluation of Animal Experiments. *Lab Anim* 2007; 41: 143–160.
11. FELASA. Standardization of enrichment 2006, [http://www.felasa.eu/media/uploads/WG\\_Enrichment\\_2006\\_Report-Final.pdf](http://www.felasa.eu/media/uploads/WG_Enrichment_2006_Report-Final.pdf) (2016, accessed 14 May 2017).
12. Morton DB. A systematic approach for establishing humane endpoints. *ILAR J* 2000; 41: 80–86.
13. Buchanan-Smith HM, Rennie AE, Vitale A, et al. Harmonising the definition of refinement. *Anim Welf* 2005; 14: 379–384.
14. Hawkins P, Morton DB, Burman O, et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim* 2011; 45: 1–13.
15. American College of Laboratory Animal Medicine. Guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits, [www.aclam.org/Content/files/files/Public/Active/position\\_pain-rodent-rabbit.pdf](http://www.aclam.org/Content/files/files/Public/Active/position_pain-rodent-rabbit.pdf) (2006, accessed 14 May 2017).
16. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. The Rabbit Grimace Scale – a new method for pain assessment in rabbits, <https://www.nc3rs.org.uk/news/rabbit-grimacescale-%E2%80%93-new-method-pain-assessment-rabbits> (2012, accessed 14 May 2017).
17. Baumans V, Brain PF, Bruge' re H, et al. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs: report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. *Lab Anim* 1994; 28: 97–112.
18. Becker MJ and De Marie S. Clinical signs predicting imminent death in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis. In: Hendriksen FM and Morton DB (eds) *Humane endpoints in animal experiments for biomedical research*. Zeist, The Netherlands: The Royal Society of Medicine Press, 1998, pp.127–132.
19. Fentener van Vlissingen JM, Borrens M, Girod A, et al. The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. *Lab Anim* 2015; 49: 267–283.
20. Garrod K, Ryder K and Anderson D. Cumulative suffering, how can it be assessed. In: *7th World congresses on alternatives & animal use in the life sciences*, Rome, Italy, 30 August–3 September 2009, ID ABS: 282.



## **Bijlage 1: Voorbeelden ter illustratie van de indeling naar en rapportage van ernst van ongerief**

### **Beheersing van infecties - muismodellen van tuberculose (TB)**

*Algemene context* In 2010 werden 8,8 miljoen gevallen van actieve longziekte vastgesteld; in dat jaar stierven rond de 1,2 tot 1,5 miljoen mensen aan tuberculose. Daarmee is het de op één na grootste oorzaak van infectie-gerelateerde sterfte wereldwijd, na hiv/aids.<sup>1</sup> Hoewel er een aantal effectieve geneesmiddelen beschikbaar is voor de behandeling van menselijke TB, is er bij de bestrijding van deze infectie momenteel sprake van een aantal pittige uitdagingen, zoals de toename van co-infecties met hiv, het ontstaan van multiresistente stammen van *Mycobacterium tuberculosis*, nalevingsproblemen met de huidige lange-termijnmedicatie en de behoefte aan nieuwe vaccins ter vervanging van BCG, waarvan de gerapporteerde effectiviteit varieert tussen 0 en 80%.<sup>1-4</sup> Dit maakt het gebruik van muismodellen van TB in de preklinische fase belangrijker dan ooit.<sup>5,6</sup>

Experimentele besmetting van muizen met *M. tuberculosis* wordt al sinds het vroege werk van Robert Koch gebruikt om menselijke TB te modelleren. Deze modellen zijn sindsdien van cruciaal belang geweest voor het begrip van de interacties tussen gastheer en ziekteverwekker en voor het testen van therapeutische en preventieve strategieën voor deze ziekte.<sup>5,7-10</sup>

Tussen verschillende muizenstammen bestaan duidelijke verschillen in vatbaarheid voor TB-besmetting. In tegenstelling tot bij de meeste mensen, is echter geen enkele muizenstam in staat de ziekte onder controle te houden tot een werkelijk latente toestand. Zonder behandeling bezwijken uiteindelijk alle dieren door het voortschrijden van de ziekte.<sup>11</sup> Bij alle stammen wordt experimentele infectie snel gevolgd door een uitgesproken en voortdurende toename van het aantal bacteriën in de longen. De meer resistente muizenstammen (bijv. de C57BL/6) zijn na deze eerste respons in staat tot een specifieke immunerespons, en kunnen zo de ziekte vanaf 3-4 weken na infectie beheersen tot een chronisch stadium. In dit stadium blijft de hoeveelheid bacteriën in de longen een aantal maanden tot meer dan een jaar hoog, maar relatief stabiel (hoewel longpathologie volgt) en lijken dieren asymptomatisch. Uiteindelijk breekt de ziekte door en verergert tot de dood volgt,<sup>1,12</sup> als dit proces niet eerder wordt afgebroken door een humaan eindpunt.<sup>13</sup> De meer vatbare stammen kunnen de toename van het aantal bacteriën in de longen na eerste infectie niet remmen of controleren, resulterend in een snel voortschrijdende, uitgesproken symptomatische ziekte, uitmondend in een vroege dood.<sup>14,15</sup> Afgezien van de muizenstam zijn er nog andere belangrijke parameters die van invloed zijn op de resistentie tegen infectie, zoals het kiemgetal (in kve's) en de gekozen infectieroute.<sup>11,16,17</sup> Afhankelijk van deze verschillende parameters varieert de mediane overlevingsduur van met *M. tuberculosis* geïnfecteerde muizen van minder dan 20 dagen tot meer dan 300 dagen.<sup>11,18</sup>

Onderstaand worden twee verschillende procedures beschreven, één voor het testen van vaccins, en één voor het screenen van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen.

#### ***Voorbeeld van een procedure (1) – beoordeling van bescherming van kandidaat-vaccins in een muismodel van TB-infectie***

*Onderzoeksopzet.* Doel van het onderzoek is het vinden van kandidaat-vaccins die het aantal kolonievormende eenheden (kve's) in de longen kan verminderen tot ten minste 1,5 log lager dan bereikt wordt met het BCG-vaccin. In een pilotstudie is vastgesteld dat bij een standaardafwijking van 1,2 log de effectgrootte uitkomt op rond de 1,65. Voor een alfa van 0,01 en een power van 90% is een minimum aantal van 11 dieren nodig om dit gemiddelde verschil in bescherming tussen BCG en een ander antigeen vast te stellen. Om rekening te houden met onverwachte sterfte wordt gewerkt met een groepsgrootte van 12. Tien groepen van elk 12 vrouwelijke BALB/c-muizen worden gebruikt voor het testen van kandidaat-vaccins voor infectie met *M. tuberculosis*. Acht teststofgroepen worden geïmmuniseerd via intramusculaire injectie (drie keer met intervallen van twee weken) met een kandidaat-vaccin; één controlegroep wordt geïnjecteerd met enkel het medium en een andere controlegroep met BCG ('gouden standaard' controle). Dertig dagen na de laatste immunisatie worden alle muizen middels een aerosol besmet met een lage dosis *M. tuberculosis*. Uit elke groep worden drie muizen gedood, één, twee en drie maanden na infectie, om de bacillaire belasting in longen en milt te bepalen. De resterende muizen worden gemonitord aan de hand van een aangepast klinisch scoresysteem voor infectiestudies<sup>19</sup> dat wordt gebruikt voor het bepalen van humane eindpunten. Muizen worden groepsgewijs gehuisvest in kooien voorzien van degelijke vloeren, strooisel, nestmateriaal en kartonnen buizen. Dieren krijgen *ad libitum* voedsel en water. Alle dieren worden gedood door toediening van een overdosis pentobarbitalnatrium.

Inventarisatie van specifieke verfijningen en humane eindpunten

Wat gebeurt er tijdens dit onderzoek met de dieren?	Wat zullen de dieren ondervinden? Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken? Wat zou het lijden erger kunnen maken?	Hoe wordt lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
<p><b>Intramusculaire immunisatie</b> Driemaal injectie van kandidaat-vaccinantigenen met adjuvans in beide achterpoten met intervallen van twee weken</p>	<p>Injectie kan pijnlijk zijn en/of leiden tot mechanisch trauma en potentiële zenuw schade. Immunoreactie kan leiden tot pijnlijke zwelling. Eerder trauma door deze antigeen-inoculatie techniek kan de pijn bij volgende immunisaties verergeren.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Goed opgeleid personeel</li> <li>• Opvolgen van aanbevolen richtlijnen voor toediening van stoffen.</li> <li>• Dieren zorgvuldig monitoren na elke injectie van het antigeen.</li> </ul>	<p>Dieren worden gedood als na injectie blijvende verlamingsverschijnselen en/of ander tekenen van niet voorbijgaande pijn of angst worden waargenomen.</p>
<p><b>Infectie middels aerosol</b> 30 dagen na de laatste immunisatie worden de Balb/c-muizen groepsgewijs in een blootstellingskamer van een aerosol-genererend toestel geplaatst. Het toestel wordt zo gekalibreerd dat bij elk dier een specifieke dosis levensvatbare bacteriën uit een suspensie met mycobacteriën in de longen wordt gebracht.</p>	<p>Mogelijk geringe angst door hantering en beperking in aerosolkamer gedurende een cyclus van 20 minuten. Primaire infectie wordt gewoonlijk gekarakteriseerd als asymptomatisch. Er is echter melding gemaakt van muizen die in deze fase voorbijgaande koorts vertoonden. Drie tot vier weken na infectie worden de dieren geacht de infectie tot een chronische toestand te beheersen. Gedurende de chronische infectie zijn de muizen ogenschijnlijk asymptomatisch.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dieren worden dagelijks gemonitord.</li> <li>• Er wordt een relatief klein aantal kiemen (~2 log<sub>10</sub> kve) gebruikt, om een versterkte immunoreactie en excessieve bacillaire belasting in het chronische stadium te vermijden.</li> <li>• Gedurende primaire infectie zijn geen uitgesproken negatieve gevolgen te verwachten. Alle dieren worden geacht de infectie tot een chronische toestand te beheersen.</li> </ul>	<p>Er worden geen negatieve gevolgen verwacht.</p>
<p><b>Beoordeling van de bescherming van vaccins</b> Eén, twee en drie maanden na de experimentele infectie wordt uit elke groep een groep van drie muizen gedood middels een overdosis van een verdovend middel, om het aantal bacteriën in longen en milt te bepalen.</p>	<p>Alle tijdstippen waarop gegevens worden verzameld, worden geacht samen te vallen met asymptomatische of licht symptomatische ziektestadia.</p>	<p>In dit stadium zorgvuldige monitoring van de dieren met behulp van klinische scoresystemen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deze observaties worden geacht plaats te vinden op tijdstippen voordat sprake is van openlijke klinische symptomen.</li> <li>• Als dieren om welke reden dan ook een vooraf bepaalde klinische score bereiken, worden ze gedood.</li> </ul>

<p><b>Bepaling van overlevingstijd</b> De drie resterende muizen van elke groep worden gemonitord op tekenen van terugkeer van de ziekte. Het eindpunt wordt bepaald aan de hand van de klinische score. Postmortem analyse wordt uitgevoerd om verdere gegevens te verzamelen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Terugkeer van de ziekte wordt gekenmerkt door de overgang van een niet-klinisch chronisch stadium naar een duidelijk symptomatisch stadium, met een voortschrijdende ernst. Symptomen geassocieerd met actieve ziekte zijn onder meer ademnood, gebogen houding, gebrek aan verzorging; niet kunnen eten of drinken, koorts en cachexie (gewichtsverlies).</li> <li>• Tenzij dit wordt voorkomen met humane eindpunten, neemt de ernst van de symptomen toe totdat een hypokinetische niet-responsieve ('stervende') toestand wordt bereikt, met de dood tot gevolg.</li> </ul>	<p>Zorgvuldige monitoring van dieren en dagelijks wegen van dieren om het omslagpunt van subklinische chronische ziekte naar openlijke ziekte te bepalen, in welk geval een humaan eindpunt moet worden toegepast.</p>	<p>Humane eindpunten bepaald door klinische score. Ongeacht de klinische score worden alle dieren die meer dan 15% van hun lichaamsgewicht verliezen (ten opzichte van piekgewicht) gedood.</p>
---	--	--	---

*Initiële beoordeling vooraf.* Hoewel bacteriële belasting en immunologische parameters worden gebruikt als indicatoren voor de bescherming door het vaccin (zie tussentijdse beoordeling), levert de duur van de overleving belangrijke gegevens op en wordt deze in dit type onderzoek algemeen gebruikt. Er worden echter objectieve criteria gebruikt, beoordeeld aan de hand van klinische scores, om humane eindpunten toe te passen om te voorkomen dat dieren gevorderde stadia van de ziekte bereiken. Desondanks bestaat het risico dat ten minste enkele dieren onverwacht significante niveaus van lijden en angst bereiken als gevolg van experimentele infectie (met name medium-controlegroep), of als gevolg van accidentele zenuwschade of een versterkte immunoreactie, en zwelling door antigeeninjectie (cfr 3 intramusculaire injecties bij muizen in het dijbeen).<sup>20,21</sup> Bijgevolg moet de ernst van het ongerief vooraf worden ingedeeld als **MATIG**.

Zou het ongerief **ERNSTIG** kunnen zijn?

Niet als de voorgestelde verfijningsmaatregelen op de juiste manier worden toegepast. Met name het gebruik van de scoresystemen kan van waarde zijn om vroege tekenen van actieve ziekte te identificeren, zodat vroege eindpunten kunnen worden bepaald, waarmee significant lijden van dieren wordt voorkomen.

Zou het ongerief **LICHT** kunnen zijn?

Afhankelijk van het tijdstip van euthanasie, is het mogelijk dat dieren nog geen tekenen van ontwikkeling van de ziekte vertonen, waardoor de indeling **LICHT** zou zijn.

Bij overlevingsonderzoeken, in gevallen waarin de bestrijding met het vaccin doeltreffend is geweest en de mogelijkheden voor verfijning maximaal zijn benut, bestaat de mogelijkheid dat deze dieren slechts **LICHTE** klinische symptomen vertonen. Echter, aangezien bij muizen zelfs BCG-vaccinatie de bacteriële belasting slechts vermindert (zie inleiding) en dus alle dieren uiteindelijk de controle over de infectie verliezen, is een ongeriefindeling als **LICHT** onwaarschijnlijk.

*Klinische observatie/scoresysteem.* De dieren werden vanaf het moment van experimentele infectie zorgvuldig gemonitord. Een voorbeeld van een gecombineerd systeem voor klinische observatie en scoring dat wordt gebruikt om de klinische toestand van de dieren gedurende de procedure te monitoren, is aan het einde van dit voorbeeld opgenomen.

Behalve één dier dat moest worden gedood en uit het onderzoek werd verwijderd als gevolg van uitgesproken kreupelheid van één achterpoot na de tweede immunisatie, herstelden alle dieren zonder onverwachte complicaties van het immunisatieprogramma. Er werden geen complicaties geassocieerd met infectie middels aerosol-toediening.

Alle muizen die op de vooraf bepaalde tijdstippen werden gedood (drie per groep, drie tijdstippen) vertoonden geen openlijke ziektesymptomen.

Resultaten en beoordeling van het werkelijk ondervonden ongerief

Tien groepen van 12 dieren:	Controle	Vaccin 1	Vaccin 2	Vaccin 3	Vaccin 4	Vaccin 5	Vaccin 6	Vaccin 7	Vaccin 8	BCG	Ongerief
									1 gedood uitgesproken kreupelheid na 2e IMM		<b>MATIG 1/120</b>
Gedood na 1 mnd.	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	<b>LICHT 29/120</b>
	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	
Gedood na 2 mnd.	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	<b>LICHT 30/120</b>
	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	
Gedood na 3 mnd.	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	<b>LICHT 30/120</b>
	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	geen openlijke ziektesymptomen	
Overleving-onderzoek	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	<b>MATIG 30/120</b>
	tekenen van actieve ziekte	vertraagde ontwikkeling van de ziekte lange overlevingstijd	tekenen van actieve ziekte	tekenen van actieve ziekte	tekenen van actieve ziekte	tekenen van actieve ziekte	tekenen van actieve ziekte	tekenen van actieve ziekte	vertraagde ontwikkeling van de ziekte bescherming vergelijkbaar met BCG	vertraagde ontwikkeling van de ziekte bescherming vergelijkbaar met BCG	vertraagde ontwikkeling van de ziekte

Statistische rapportage 31 MATIG en 89 LICHT

Van de acht gevaccineerde groepen vertoonden er drie een lagere bacteriële belasting in alle geanalyseerde organen, een vertraagde ontwikkeling van de ziekte en een significant langere overlevingstijd dan niet-gevaccineerde groepen, waarvan twee gevaccineerde groepen met een beschermingsniveau gelijk aan de BCG-groep. In de resterende groep kwam de pathologie overeen met die van controles, die als eerste tekenen van terugkeer van de ziekte vertoonden. Ondanks verschillen in het moment van ontwikkeling van de ziekte, de progressiesnelheid en overleving, vertoonden alle dieren in het overlevingsonderzoek uiteindelijk tekenen van terugkeer van de ziekte en werden ze tijdig gedood conform de vooraf bepaalde klinische score. Er werd geen onverwacht verlies (bijv. spontane dood) van dieren geregistreerd.

89 dieren (gedood op de vooraf bepaalde tijdstippen, behalve het kreupele dier) werden geacht LICHT ongerief te hebben ondervonden.

31 dieren (30 gebruikt in overlevingsonderzoeken en één geëuthanaseerd als gevolg van kreupelheid) werden geacht MATIG ongerief te hebben ondervonden.

*Voorbeeld klinische observatie/scoresysteem*

<b>Vocalisaties</b>	Geen vocalisatie	0
	Opgeroepen vocalisatie, bij hantering	1
	Spontane vocalisatie, pijngerelateerd	2
<b>Activiteit</b>	Interactie met andere dieren, voor de soort-specifieke bewegingen en gedrag, nieuwsgierig, responsief, normale geprovoceerde gedragspatronen (bijv. vluchtreactie, bij benadering)	0
	Onderbrekingen in activiteit, stil gedrag, zelfs bij provocatie, afgenomen voedsel- en waterinname	1
	Niet-responsief, lusteloos, geen voedsel- en waterinname	2
<b>Vachtconditie</b>	Glanzende vacht, aanliggend	0
	Glanzende vacht, gedeeltelijke pilo-erectie	1
	Opstaande, doffe vacht, zware pilo-erectie	2
<b>Uitdroging</b>	Normale huidspanning	0
	Verlaagde huidspanning (staande huidplooi)	1
<b>Uitscheiding (oog, neus)</b>	Geen uitscheiding	0
	Afscheiding uit ogen en neus, waterige secretie	1
	Afscheiding uit ogen en neus, overvloedig en etterend	2
<b>Verzorging</b>	Normale verzorging	0
	Verminderde verzorging, besmeurde anaalstreek	1
	Geen verzorging, besmeurde anaalstreek met korstvorming, fecale verstopping	2
<b>Voortbeweging</b>	Spontane voortbeweging zonder provocatie, of naslaap, na opening van de kooi en provocatie	0
	Voortbeweging na provocatie, wankele ataxie, moeizame gang.	1
	Geen beweging	2
<b>Houding</b>	Normaal	0
	Intermitterend bolle rug	1
	Permanent bolle rug, deels zijdelings (muizen op hun zij)	2
<b>Ademhaling</b>	Normaal	0
	versnelde of abnormaal ademhalingspatroon	1
	Versnelde ademhaling, zware ademhaling, abnormaal ademhalingspatroon, incidentele onderbrekingen	2
<b>Overige</b>		

Bij een totaalscore van 10 is het humane eindpunt bereikt waarop de dieren worden gedood.

***Voorbeeld van een procedure (2) – screening van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen in een muizenmodel van TB-infectie***

*Onderzoeksopzet.* Het doel is om geneesmiddelen te vinden die de effectiviteit van huidige antibiotica evenaren en dieren tot zes maanden na infectie laten overleven zonder terugval. Voor deze periode hebben we in onbehandelde controles een overleving van 20% waargenomen. Om een dergelijk verschil in overleving te

kunnen vaststellen, met een power van 90% en een alfa van 0,05, zijn slechts zes dieren nodig (Fisher's exact test). Om rekening te houden met onverwachte verliezen, worden er echter acht dieren per groep gebruikt. Er worden 13 groepen van  $n = 8$  voor TB vatbare vrouwelijke C3H/ HeJ-muizen gebruikt om de effectiviteit van vier nieuwe kandidaat-geneesmiddelen tegen een infectie met *M. tuberculosis* te vergelijken met bestaande goedgekeurde producten. Alle muizen worden intratracheaal besmet (3 log kve in 100  $\mu$ l PBS, beschouwd als een passende dosis in vorige testen) middels een incisie in de trachea. Vanaf een week na infectie krijgen vier groepen muizen twee weken lang, vijf dagen per week, dagelijks een lage dosis van de toegewezen teststof toegediend middels orale gavage. Vier groepen krijgen hoge doses van de teststof. Eén groep controlemuizen krijgt alleen het medium toegediend en vier andere groepen krijgen één van de twee geneesmiddelen die op dit moment in gebruik zijn als gouden standaard (GS-A, GS-B; positieve controles) in twee doses voor elk geneesmiddel. Overleving wordt geregistreerd voor alle groepen muizen. Er wordt een klinische score gebruikt om humane eindpunten te definiëren. Muizen worden gehuisvest in kooien voorzien van bodemplaten, strooisel, nestmateriaal en kartonnen buisjes. Dieren krijgen ad libitum voedsel en water. Alle overlevende dieren worden aan het einde van het experiment (14 dagen na dosering) gedood door toediening van een overdosis pentobarbitalnatrium.

*Inventarisatie van specifieke verfijningen en humane eindpunten.*

Wat gebeurt er tijdens dit onderzoek met de dieren?	Wat zullen de dieren ondervinden? Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken? Wat zou het lijden erger kunnen maken?	Hoe wordt lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
<b>Intratracheale instillatie</b> Muizen worden geïnfecteerd middels een incisie in de trachea onder algehele verdoving ingeleid door intraveneuze injectie of een combinatie van ketamine/medetomidine.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Negatieve gevolgen van algehele verdoving</li> <li>Postoperatieve complicaties, pijn op wondlocatie, heropening van de wond, infectie</li> <li>De wond geneest gewoonlijk binnen 2–3 dagen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Passende verdoving en analgesie, tegen bekende negatieve gevolgen gedurende inleiding en herstel</li> <li>Aseptische techniek, verwarmingselement gedurende verdoving.</li> <li>Niet-farmacologische beheersing van pijn en angst.</li> <li>Dagelijks observatie</li> <li>Goed opgeleid personeel</li> </ul>	Postoperatieve complicaties conform gedefinieerde eindpunten
<b>Toediening van geneesmiddelen</b> Orale toediening van kandidaat-geneesmiddelen via dagelijkse gavage, gedurende twee weken, beginnend één week na infectie.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Orale gavage is een moeilijke procedure die kan leiden tot aspiratie van vloeistof in de longen, perforatie van de slokdarm of maagwand, irritatie, zwelling en zweervorming van de slokdarm door herhaalde toediening.</li> <li>Eetlustgebrek en gewichtsverlies als gevolg van door gavage veroorzaakte stress of bijwerkingen van het geneesmiddel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>In een pilotstudie zal een poging worden gedaan tot verfijning van de orale gavage, door een gavagenaald voor te behandelen met sucrose, een methode die naar verluidt muizen kalmeert en aanspoort tot slikken, en daarmee procedure-gerelateerde stress zou moeten verminderen.</li> <li>Goed opgeleid personeel.</li> </ul>	Dieren die tekenen van gavagegerelateerde verwondingen vertonen, worden geëuthanaseerd.

<p><b>Ziekteverloop en beoordeling van overlevingstijd</b>          Muizen worden gemonitord op tekenen van doorbraak van de ziekte. Het eindpunt wordt bepaald aan de hand van de klinische score. Postmortem analyse wordt uitgevoerd om verdere gegevens te verzamelen.</p>	<p>Symptomen geassocieerd met actieve ziekte zijn onder meer ademnood, gebogen rug, gebrek aan verzorging, niet kunnen eten of drinken, koorts en cachexie). Indien onbehandeld, toenemend tot een hypokinetische niet-reactieve ('stervende') toestand, uitmondend in de dood.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alle dieren worden zorgvuldig gemonitord en krijgen een klinische score toegekend met behulp van een klinisch scoresysteem.</li> <li>• Bij overlevingsonderzoeken wordt het humane eindpunt vastgesteld op basis van een vooraf bepaalde klinische score.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humane eindpunten bepaald door klinische score.</li> <li>• Doding als gewichtsverlies meer dan 15% van het lichaamsgewicht (ten opzichte van het piekgewicht) bedraagt.</li> <li>• Dieren die tekenen van hevig leed vertonen, te bepalen aan de hand van lichaamsconditiescore, worden gedood.</li> </ul>
--	---	---	---

*Initiële beoordeling vooraf.* Het gebruik van intratracheale instillatie brengt, in vergelijking met andere besmettingsroutes, aanvullende dierenwelzijnsbezwaren met zich mee, aangezien het algehele verdoving vereist is en er, afgezien van met het herstel samenhangend leed, complicaties kunnen optreden voordat de wond volledig is genezen.<sup>22</sup> Ondanks dat maakt deze methode een accurate, gestandaardiseerde en succesvolle inoculatie mogelijk. Met een geoptimaliseerde chirurgische procedure wordt beoogd postoperatieve complicaties te voorkomen en variabiliteit te reduceren.

Hoewel de overleving moet worden gemeten, zal de dood worden vervangen door humane eindpunten gebaseerd op objectieve en eenvoudig meetbare klinische parameters. Aangezien C3H-muizen niet in staat zijn tot langdurige controle van een infectie met *M. tuberculosis*, bestaat niettemin de kans dat ten minste enkele dieren bij het starten van de behandeling al gevorderde stadia van de ziekte bereiken (met name bij de medium-controlegroep), of als gevolg van de lage effectiviteit van de experimentele behandeling.

Bijgevolg moet de ernst van het ongerief vooraf worden ingedeeld als **ERNSTIG**.

Zou het ongerief **MATIG** kunnen zijn?

Waar progressie van de ziekte bij dieren in de 'gouden standaard'-groep, en mogelijk ook in groepen behandeld met de teststof, wordt onderbroken door behandeling met medicatie, kan voor deze dieren achteraf wellicht worden vastgesteld dat zij de categorie MATIG niet hebben overschreden.

Zou het ongerief **LICHT** kunnen zijn?

Nee, chirurgische ingrepen onder algehele verdoving worden per definitie als MATIG beschouwd.

*Klinische observatie/scoresysteem.* Dieren worden zeer nauwkeurig gemonitord; waar nodig worden analgesie en lokale ondersteunende therapie geboden.

Het gecombineerde systeem voor klinische observatie en scoring dat wordt gebruikt om de klinische toestand van de dieren gedurende de procedure te monitoren, is hetzelfde als het systeem dat in het voorgaande voorbeeld is gebruikt.

Voorbeeld van een klinisch scoresysteem voor het dier in de groep Teststof 3 LD dat op Dag 5 dood werd aangetroffen (gavagefout).

Projectnummer:		Procedurenummer: . . . . .					
Diernummer: . . . . .							
Onderzoeknummer: . . . . .							
Startdatum van procedure: . . . / . . . / . . .							
Klinische symptomen	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Activiteit (0-2)	0	0	1	2			
Vachtconditie (0-2)	0	0	1	2			
Uitdroging (0-2)	0	0	0	2			
Uitscheiding (0-2)	0	0	0	0			
Verzorging (0-2)	0	0	1	1			
Voortbeweging (0-3)	0	0	0	0			

Houding (0-2)	0	1	0	0			
Ademhaling (0-2)	0	0	0	0			
Vocalisaties (0-1)	0	0	0	0			
Overige					Dood aangetroffen		
Tijdstip van de dag	10.00 u.	10.00 u.	10.00 u.	10.00 u.	10.00 u.		
Initialen waarnemer							

(zie tabel volgende pagina) Eén dier stierf onder verdoving. Alle overige dieren overleefden en herstelden van intratracheale instillatie, zonder complicaties van deze handeling. Controles met de gouden standaard vertoonden aan het einde van de behandeling geen tekenen van ziekte. De voorgestelde pilotstudie liet zien dat dieren beter meewerkten aan orale gavage als gavagenaalden met een suikerlaagje werden gebruikt. Niettemin werden drie dieren dood aangetroffen aan het einde van de behandeling met geneesmiddel (één van de controlegroep met gouden standaard, twee van teststof 3 LD), waarbij postmortem analyse gavagegerelateerde verwondingen als de meest waarschijnlijke oorzaak aanwees.

Twee groepen muizen behandeld met teststof 1 (lage en hoge dosis) vertoonden resultaten vergelijkbaar met de medium-controlegroep, evenals één groep met een lage dosering van teststof 3. Al deze dieren bereikten symptomatische ziektestadia, maar spontane sterfte werd voorkomen door nauwkeurige monitoring voor humane eindpunten. Teststoffen 2 en 4 verhinderden ontwikkeling van de ziekte bij zowel groepen met een lage als een hoge dosering, en teststof 3 alleen bij dieren die waren behandeld met een hoge dosis.

1 dier stierf onder verdoving tijdens initiële immunisatie (uit negatieve controlegroep): **TERMINAAL**

71 (31 controledieren met lage en hoge dosis gouden standaard geneesmiddel + 32 muizen met lage en hoge dosis testgeneesmiddel en 8 muizen met hoge dosis testgeneesmiddel): hoewel ontwikkeling van de ziekte werd voorkomen en er zich geen klinische symptomen ontwikkelden, is de indeling vanwege de chirurgische ingreep **MATIG**

29 dieren (7 negatieve controles + 16 muizen met lage en hoge dosis testgeneesmiddel en 6 muizen met lage dosis teststof): **MATIG**

3 gavagegerelateerde incidenten (1 dier uit gouden-standaard-groep, 2 uit dezelfde met lage dosis behandelde groep): **ERNSTIG**

---



*Resultaten en beoordeling van het ongerief*

TOTAAL – 13 groepen van 8 dieren													
CONTROLE	Teststof 1 LD	Teststof 1 HD	Teststof 2 LD	Teststof 2 HD	Teststof 3 LD	Teststof 3 HD	Teststof 4 LD	Teststof 4 HD	GS-A LD	GS-A HD	GS-B LD	GS-B LD	ONGERIEF
1 gestorven onder verdoving													<b>TERMINAAL 1/104</b>
					2 dood aangetroffen; gavagegerela teerd				1 dood aangetroffen; gavagegerela teerd				<b>ERNSTIG 3/104</b>
7 klinische ziekte HEP toegepast	8 klinische ziekte HEP toegepast	8 klinische ziekte HEP toegepast			6 klinische ziekte HEP toegepast								<b>MATIG 29/104</b>
			8	8		8	8	8	7	8	8	8	<b>MATIG 71/104</b>
			geen klinische ziekte	geen klinische ziekte		geen klinische ziekte	geen klinische ziekte	geen klinische ziekte	geen klinische ziekte	geen klinische ziekte	geen klinische ziekte	geen klinische ziekte	

**Statistische rapportage:**

**3 ERNSTIG, 100 MATIG en 1 TERMINAAL**

## Referenties

1. World Health Organization. *Global tuberculosis control*. Geneva, Switzerland: WHO, 2011.
2. Palomino JC, Ramos DF and da Silva PA. New antituberculosis drugs: strategies, sources and new molecules. *Curr Med Chem* 2009; 16: 1898–1904.
3. Kaufmann SHE, Hussey G and Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. *Lancet* 2010; 375: 2110–2119.
4. Koul A, Arnoult E, Lounis N, et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 2011; 469: 483–490.
5. Apt A and Kramnik I. Man and mouse TB: contradictions and solutions. *Tuberculosis* 2009; 89: 195–198.
6. Rylance J, Pai M, Lienhardt C, et al. Priorities for tuberculosis research: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 886–892.
7. Orme IM and Collins FM. Mouse model of tuberculosis. In: Bloom BR (ed.) *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994, pp.113–134.
8. Gupta UD and Katoch VM. Animal models of tuberculosis. *Tuberculosis* 2005; 85: 277–293.
9. Flynn JL. Lessons from experimental Mycobacterium tuberculosis infections. *Mic Infect* 2006; 8: 1179–1188.
10. Dharmadhikari AS and Nardell EA. What animal models teach humans about tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 503–508.
11. Medina E and North RJ. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to Mycobacterium tuberculosis and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp1 genotype. *Immunology* 1998; 93: 270–274.
12. Rhoades ER, Frank AA and Orme IM. Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent Mycobacterium tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1997; 78: 57–66.
13. Franco NH, Correia-Neves M and Olsson IA. How “humane” is your endpoint? Refining the science-driven approach for termination of animal studies of chronic infection. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002399.
14. North RJ and Jung YI. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 599–623.
15. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Ann Rev Immunol* 2009; 27: 393–422.
16. North RJ. Mycobacterium tuberculosis is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. *J Infect Dis* 1995; 172: 1550–1553.
17. Chackerian AA and Behar SM. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis: lessons from inbred strains of mice. *Tuberculosis* 2003; 83: 279–285.
18. Nikonenko BV, Averbakh MM, Apt AS, et al. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. *Tuber Lung Dis* 2000; 80: 15–25.
19. Munder A and Tümmler B. Assessing pseudomonas virulence using mammalian models: acute infection model. In: (eds) *Pseudomonas methods and protocols*. The Netherlands: Springer, 2014, pp.773–791.
20. Morton DB, Jennings M, Buckwell A, et al. Refining procedures for the administration of substances. *Lab Anim* 2001; 35: 1–41.
21. Baumans V and Pekow C. Common nonsurgical techniques and procedures. In: *Handbook of Laboratory Animal Science, Volume I*. 3rd ed. London: CRC Press, 2010, pp.401–445.
22. Morton, D.B., et al., Refining procedures for the administration of substances. *Lab Anim.*, 2001. **35**(1): p. 1-41.

## Neuropathische pijn – spinale zenuwligatie (ruggemerg-letsel)

### Algemene context

Neuropathische pijn (zenuwpijn, NP) is een verzamelnaam van pijnsyndromen (bijv. spontane brandende pijn, allodynie, hyperalgesie, aftersensation, paresthesie) veroorzaakt door initiële zenuw schade die zorgt voor een verhoogde responsiviteit en pathologische signaaltransmissie in de pijnbanen van het zenuwstelsel. De geschatte prevalentie van NP in de algehele bevolking is 1 tot 1,5%. De grootste patiëntengroep betreft patiënten met diabetische perifere neuropathie (ongeveer 45–70% van de diabetespatiënten); de tweede meest voorkomende oorzaak van NP is post-therapeutische neuralgie. Ook aids en kanker/chemotherapie kunnen aanleiding geven tot NP. Traumatisch zenuwletsel kan leiden tot een pijnsyndroom dat causalgie of complex regionaal pijnsyndroom type II (CRPS II) wordt genoemd en dat beschouwd wordt als de ernstigste vorm van neuropathische pijn. NP reageert niet op conventionele pijnstillers en vormt als zodanig een grote therapeutische uitdaging. Ondanks recente verbeteringen in de behandeling dankzij de introductie van een aantal nieuwe geneesmiddelen, bestaat er nog altijd een enorme medische behoefte aan nieuwe geneesmiddelen met een hogere effectiviteit, een snellere werking en een gunstiger bijwerkingenprofiel.

Een veelvoorkomend en nauwelijks te verdagen symptoom van NP is allodynie, pijn veroorzaakt door mechanische of thermische prikkels (bijv. huidcontact met kleding) die normaal gesproken niet pijnlijk zijn. Geneesmiddelen met anti-allodynische effecten kunnen het lijden van neuropathiepatiënten aanzienlijk verlichten.

Experimentele zenuw schade in dieren kan worden geïnduceerd met een aantal methodes die verschillende ziekteoorzaken van NP nabootsen.<sup>1</sup> Dieren met streptozotocine-geïnduceerde diabetes ontwikkelen tevens

pijnlijke perifere neuropathie, terwijl toxische polyneuropathie kan worden gemodelleerd door behandeling met cytotoxische middelen, bijv. vincristine of cisplatine. Ook zijn er verschillende modellen op basis van chirurgisch letsel aan een grote zenuwbaan (partiële ligatie of transectie) ontwikkeld die min of meer directe vertalingen zijn van CRPS II bij mensen. Het geanalyseerde model induceert mechanische allodynie door middel van spinale zenuwlaesie, om de werking van pijnstillende middelen te testen.<sup>2</sup> Er wordt een unilaterale spinale zenuwligatie uitgevoerd op L5-niveau, waarna de dieren 2 weken de tijd krijgen om te herstellen. Het voordeel van het spinale-zenuwlaesie-model ten opzichte van andere zenuwletselmodellen, zoals het chronische-constrictiemodel of partiële ligatie van de nervus ischiadicus, is dat de mate van letsel meer uniform is en daarmee de ontwikkeling van allodynie meer consistent is. Bovendien zijn de motorische uitval en pootafwijkingen na de selectieve L5-laesie minder ernstig. De mechanische en nociceptieve drempel van ratten worden vóór en na de chirurgische ingreep bepaald door middel van de Dynamic Plantar Aesthesiometer en/of von Frey filamenten.<sup>3</sup> Thermische allodynie kan eveneens worden gemeten door stimulatie van de poot met warmtestraling. Teststoffen worden gewoonlijk toegediend volgens een schema voor herhaalde toediening, startend na de herstelperiode wanneer zich reeds allodynie heeft ontwikkeld.

### Voorbeeld van een procedure

*Onderzoeksopzet.* In dit voorbeeld ondergaan 30 mannelijke Sprague-Dawley-ratten een unilaterale spinale zenuwligatie. Na de operatie krijgen ze 2 weken de tijd om te herstellen. Gedurende deze twee weken worden de conditie van de wond, de aangedane poot en de algemene gezondheidstoestand inclusief meting van lichaamsgewicht en observatie van het gedrag in de thuishok, dagelijks gemonitord. Op de 14e dag na operatie worden de mechanische en nociceptieve drempels gemeten om de ontwikkeling van mechanische allodynie te bevestigen. Alleen dieren waarbij de drempel die preoperatief met de Dynamic Plantar Aesthesiometer is gemeten ten minste 20% is verlaagd, en met die een von Frey-drempel hebben < 5,4 g, worden opgenomen in de behandelgroepen. Allodynische ratten worden willekeurig ingedeeld in drie behandelgroepen die intraperitoneaal (i.p.) worden behandeld met respectievelijk teststof A in een lage dosis, in een hoge dosis en een controlemedium. Er wordt een 8-daags doseringsschema gehanteerd met herhaalde toediening en dagelijkse behandelingen, waarbij het anti-allodynische effect op *Dag 1*, *Dag 4* en *Dag 8* van de behandeling, 30 en 60 min. na de injectie, wordt vastgesteld. Aan het einde van het onderzoek worden alle dieren gedood. In dit onderzoek wordt geen pijnstilling gegeven, aangezien dit de onderzoeksresultaten beïnvloedt.

### Inventarisatie van specifieke verfijningen en humane eindpunten.

Wat gebeurt er tijdens dit onderzoek met de dieren?	Wat zullen de dieren ondervinden? Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken? Wat zou het lijden erger kunnen maken?	Hoe wordt lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
Uitgangsmeting van mechanische en nociceptieve drempel	Herhaalde tactiele stimulatie van de poot tot aan de sensorische drempelwaarde of de cut-offwaarde	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gebruik van von Frey-haren en Dynamic Plantar Aesthesiometer</li> <li>• Gebruik van cut-offwaarden voor stimulussterkte</li> </ul>	Ratten met een lage uitgangsmeting worden uitgesloten
<b>Chirurgische ingreep:</b> ligatie van de L5 spinale zenuw	Mogelijke complicaties tijdens ingreep: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Potentiële cardio-respiratoire depressie/stilstand</li> <li>• Weefselschade als gevolg van chirurgische ingreep</li> <li>• Bloeding</li> <li>• Schade aan aangrenzende zenuwbanen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kiezen van de juiste verdoving; zorgvuldige dosering</li> <li>• Verwarming, zuurstofmonitoring</li> <li>• Uitstekende chirurgische vaardigheden</li> <li>• Verfijning van oorspronkelijk gepubliceerde model om weefselschade te beperken door een alternatieve chirurgische exploratietechniek waardoor het dwarsuitsteeksel van de wervel gespaard wordt.</li> </ul>	Hart- en ademhalingsproblemen, niet herstellen van algehele verdoving (Zeer onwaarschijnlijke gebeurtenissen, bij goed chirurgisch vakmanschap slechts theoretisch mogelijk)

Herstel gedurende twee weken	<p>Mogelijke complicaties gedurende postoperatief herstel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ademnood (gedurende postoperatief herstel)</li> <li>• Wondinfectie</li> <li>• Pijn en ongerief</li> </ul> <p>Effect van ingreep:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pijn in de aangedane poot, poot wordt ontzien bij belasting.</li> <li>• Motorische uitval in aangedane poot</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adequate postoperatieve zorg na ontwakken.</li> <li>• Goed opgeleid personeel</li> <li>• Aseptische chirurgische technieken</li> <li>• Gebruik van antibiotica indien nodig</li> <li>• Observatie van juiste wondgenezing</li> <li>• Algemene observatie van het dier</li> <li>• Meting lichaamsgewicht</li> <li>• Zacht beddingmateriaal in thuishok; voorzichtige hantering van het dier</li> <li>• Zorgen voor ruim voldoende ruimte, zodat dieren kunnen liggen zonder met elkaar in contact te komen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Slechte algehele toestand In geval van wondinfecties worden dieren gedood, aangezien behandeling de wetenschappelijke uitkomsten zou beïnvloeden. (zeer onwaarschijnlijke gebeurtenissen)</li> <li>• Dieren die ernstige motorische uitval in de aangedane poot of tekenen van automulatie, anders dan nagelbijten aan de aangedane poot, vertonen, worden gedood. (zeer onwaarschijnlijke gebeurtenissen indien operatie conform is uitgevoerd)</li> <li>• Dieren die na twee weken herstel niet de vooraf bepaalde mate van allodynie ontwikkelen, worden uitgesloten en gedood.</li> </ul>
Vaststelling van mechanische allodynie [Thermische allodynie kan eveneens worden gemeten]	Pijnstimulus op de aangedane poot	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gebruik van technieken voor vaststelling van de mechanische nociceptieve drempel bij dieren die niet in bedwang gehouden worden (bijv. von Frey-haren, Dynamic Plantar Aesthesiometer) in plaats van het toedienen van supramaximale stimuli</li> <li>• [Voor vaststelling van de thermische nociceptieve drempel wordt stralingswarmte toegepast]</li> </ul>	
Toediening van te testen stof of medium (i.p.) Herhaalde dagelijkse dosering gedurende 8 dagen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Voorbijgaand ongerief geassocieerd met toedieningsroute</li> <li>• Mogelijke bijwerking van teststof</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bekwaam personeel opgeleid om de teststof op de juiste wijze te injecteren volgens goed vakmanschap.</li> <li>• Dagelijkse klinische observatie van ratten</li> <li>• De dosis wordt bepaald op basis van eerdere analgesie en testen van eventuele neveneffecten op het gedrag (bijv. bewegingsactiviteit)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Doding aan het einde van de procedure</li> <li>• Doses van de teststof worden niet geacht negatieve bijeffecten te hebben, maar dieren worden gedood als ernstige klinische symptomen worden opgemerkt.</li> </ul>

*Initiële beoordeling vooraf.* De interventies in dit model overschrijden op zichzelf niet matig ongerief. Als de chirurgische ingreep wordt uitgevoerd met de juiste vaardigheden en, bijgevolg, geen complicaties optreden, valt dit deel van de procedure in de categorie matig. Na de chirurgische ingreep waarborgen zorgvuldige monitoring duidelijke eindpunten opdat geen enkel dier de categorie matige ongerief overschrijdt.

Een indeling vooraf naar ernst van het ongerief als **MATIG** is daarom passend.

Zou het ongerief **LICHT** kunnen zijn?

Nee. Aangezien het model op grond van de langdurige pijn veroorzaakt door deze interventies moet worden aangemerkt als matig, en beoordeling van de pijn zelf het doel van het onderzoek vormt, is het niet mogelijk om deze procedure uit te voeren in een categorie LICHT.

*Klinische observatie/scoresysteem.* De dieren worden vanaf de ingreep tot het einde van de procedure zorgvuldig gemonitord. Er werden twee nociceptieve tests uitgevoerd om de latentie bij terugtrekking van de achterpoten te meten: (1) er werden verschillende von Frey-haren met een variabele stijfheid gebruikt om te bepalen welke haar een terugtrekreactie van een achterpoot opriep; (2) Dynamic Plantar Aesthesiometer. Bij de tests werd geen aanvullend agens gebruikt.

Een voorbeeld van een observatiesysteem en een scoresysteem voor monitoring van de klinische toestand van de dieren gedurende de procedure, is aan het einde van dit voorbeeld opgenomen.

*Resultaten en beoordeling van het werkelijke ongerief.* Alle dieren, behalve één in de met medium behandelde groep, herstelden zonder onverwachte complicaties van de operatie, dankzij de intensieve perioperatieve ondersteuning die werd geboden.

Nociceptieve tests lieten zien dat er lichte of matige pijn werd ondervonden.

Groep waarbij medium werd toegediend

1/10 dieren herstelde niet van operatie. **TERMINAAL**

1/10 dieren vertoonde tekenen van automutilatie en werd gedood. **MATIG** ongerief.

1/10 dieren bereikte een humaan eindpunt en werd gedood. **MATIG** ongerief.

7/10 dieren presteerden slecht in de nociceptieve tests en gedragstests in vergelijking met behandelde dieren. Ze vertoonden echter geen andere klinische effecten en bleven op gewicht. De klinische score was vergelijkbaar met behandelde dieren na de operatie. Deze dieren ontwikkelden matige neurologische bewegingsstoornissen en vertoonden een na verloop van tijd geleidelijk afnemende klinische score, mogelijk resulterend uit hun vermogen tot compensatie en aanpassing aan langdurige neurologische stoornissen. **MATIG** ongerief.

Behandelgroepen

10/10 dieren behandeld met lagere doses vertoonden een lichte verbetering in bewegingsfunctie, evenals een verbetering van de klinische score. Het agens had een anti-allodynamisch effect, in vergelijking tot het medium. Geen specifieke bijwerking gerapporteerd. **MATIG** ongerief.

10/10 dieren behandeld met hogere doses vertoonden een significante verbetering in bewegingsfunctie, evenals een verbetering van de klinische score. Het agens had een duidelijk anti-allodynamisch effect, in vergelijking tot het medium. Geen specifieke bijwerkingen gerapporteerd. **MATIG** ongerief.

Hoewel dieren in de behandelde groepen minder pijn ondervonden, werd als gevolg van de chirurgische ingreep en langdurige allodyn timer de ongeriefcategorie voor alle dieren als matig beoordeeld.

### *Voorbeeld klinische observatie/scoresysteem*

Het ongerief wordt beoordeeld aan de hand van een cumulatieve score van een combinatie van algemene klinische observaties (lichaamsgewicht, voorkomen, gedrag, kooi omgeving, voedsel- en waterinname, lichaamsfunctie) en een procedurespecifieke evaluatie.

Algemene klinische symptomen	Score
<b>Voorkomen</b>	
5–10 % gewichtsverlies	1
11–15% gewichtsverlies	2
16–20% gewichtsverlies	3
20 %+ gewichtsverlies	HEP
Vacht enigszins onverzorgd	1
Lichte pilo-erectie	2
Zware pilo-erectie	3
<b>Lichaamsfunctie</b>	
Snelle, trage of diepe ademhaling – licht	1
Snelle, trage of diepe ademhaling – matig	2
Snelle, trage of diepe ademhaling – sterk	3
<b>Voedsel- en waterinname</b>	
Drinkt niet maximaal 10% van het lichaamsgewicht per 24 u.	1
Drinkt helemaal niet	3
Verminderde voedselinname	1
Anorexia	3

<b>Gedrag</b>	
Licht afgenomen mobiliteit	1
Duidelijk afgenomen mobiliteit	2
Wezenlijke mobiliteitsproblemen	3
Immobiliteit > 24 u.	HEP
Gespannen en nerveus bij hantering	2
Merkbaar angstig bij hantering, bijv. trillen, vocaliseren, agressief	3
Procedurespecifieke indicatoren	Score
<b>Wondgenezing</b>	
Wondranden zijn glad en gesloten, geen tekenen van ontsteking	0
Wondranden zijn licht gezwollen en erythemateus	1
Wond is duidelijk ontstoken/deels geopend	3
Geen verbetering van wondinfectie door lokale en systemische behandeling/wond is volledig geopend	HEP
<b>Toestand van geopereerde poot</b>	
Licht verminderde belasting	1
Duidelijke problemen met lopen (lamheid)	2
Ernstige problemen met lopen/poot vaak voortdurend geheven	3
Ernstige motorische uitval > 24 u na operatie/tekenen van automutilatie	HEP
<b>TOTAAL</b>	

HEP = humaan eindpunt

Score 0–5 plus chirurgische ingreep = **MATIG**

**2 scores van 3 in willekeurige** categorieën, of een totaalscore van 12 of hoger = **HEP**

Opmerking: Aangezien complicaties doorgaans optreden in de herstelfase direct na de operatie, zijn de eerste 24 uur zorgvuldige monitoring en een deskundig, empathisch oordeel van cruciaal belang om te waarborgen dat negatieve gevolgen worden opgemerkt en maatregelen worden genomen om deze te bestrijden. Dieren worden op humane wijze gedood als hun lijden de categorie 'matig' overschrijdt.

1 – Monitoringfrequentie herzien.

4 – Extra verzorging bieden, bijv. puree en extra vloeistoffen

Uitdroging/diarree: Ringer-lactaat of regulier serum

Opgezwollen buik (ascites): drainage voor drukverlichting

Gewichtsverlies: zacht voedsel

5 – Voortschrijding doornemen met dierenarts

**2 scores van 3 in willekeurige** categorieën, of een totaalscore van 12 of hoger = **HEP**

#### Referenties

1. Jaggi AS, Jain V and Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25: 1–28.
2. Kim SH and Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50: 355–363.
3. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53: 55–63.

## Beroerte: werkzaamheid van een nieuw therapeutisch agens in een MCAO-model met filamentenmethode bij de penseelaap

### Algemene context

Een beroerte wordt gedefinieerd als een verlies of aantasting van de normale lichaamsfuncties als gevolg van onvoldoende bloedtoevoer naar een deel van de hersenen. Hoewel het inzicht in de pathofysiologie van vasculair hersenletsel is verbeterd, is er nog altijd een belangrijke behoefte aan effectieve behandelingen voor beroerten en wordt er nog steeds onderzoek gedaan naar geschikte preventieve en therapeutische behandelwijzen.

In menselijke patiënten worden drie soorten beroerte onderscheiden: ischemische beroerte, intracerebrale bloeding en meningeale bloeding. De meeste diersmodellen die op dit moment beschikbaar zijn, zijn echter gebaseerd op het ischemische type. Beroertemodellen vormen een uitdaging vanuit dierenwelzijnsoogpunt. Een goede samenwerking en communicatie tussen alle betrokkenen bij de wetenschappelijke procedures

(dierenartsen, onderzoekers, dierwetenschappers, biotechnici en verzorgend personeel) is van cruciaal belang om een gulden middenweg te vinden tussen het tot stand brengen van een valide model in dit onderzoeksveld en het tot een minimum beperken van dierenleed.

Een beroerte wordt doorgaans in knaagdieren en niet-menselijke primaten geïnduceerd door de middelste hersenslagader tijdelijk of permanent af te sluiten (Middle Cerebral Artery Occlusion; MCAO-model). Dit MCAO-model heeft tot doel de focale cerebrale ischemie waarvan sprake is bij een beroerte experimenteel te reproduceren, en het is op grote schaal gebruikt om het mechanisme van letsel te bestuderen, om potentiële targets in kaart te brengen en om potentieel neuroprotectieve agentia te testen.

In een standaard onderzoeksopzet worden de dieren getraind om bepaalde gedragstests te verrichten voorafgaand aan de MCAO-procedure. Tijdens het therapeutische tijdvenster, vastgesteld naargelang van het werkingsmechanisme van het geneesmiddel en de doelstelling van het onderzoek, krijgen dieren de teststof toegediend. De uitkomstanalyse moet informatie bevatten over omvang van het infarct, sterftecijfer, frequentie van complicaties (bijv. meningeale bloeding), evenals een functionele en neurologische beoordeling om de voortschrijding te monitoren. Seriële MRI (beeldvorming door middel van magnetische resonantie) is een krachtig instrument gebleken om informatie te verkrijgen over de ontwikkeling van de infarctomvang, maar kan ook aanvullende informatie verschaffen over bloedstroom of metabolische toestand. Histologische, biochemische en moleculaire eindpunten kunnen ook worden betrokken.

Er zijn diverse gedragstests die kunnen worden toegepast op beroertemodellen. De eenvoudigste tests omvatten neurologische scoresystemen, die de globale neurologische status beoordelen, en tests betreffende het positioneren van ledematen, gebruikt om motorische reflexen te meten. Deze worden veelal gebruikt om dieren in de acute postberoertefase te beoordelen. Bij longitudinale studies kunnen complexere tests worden gebruikt om sensorische en motorische functies (bijv. hoe lang het duurt om een sticker van voorpoten te verwijderen, over een balk lopen, rotarod of traptest) en cognitieve functies waaronder het geheugen (bijv. passieve vermijdingstests, of evaluaties van leerstrategieën).

Het is goede praktijk om een aantal gedragstests uit te voeren, waaronder tenminste één voor elke fase (acuut en lange termijn), teneinde omvattende informatie te verzamelen over het effect van sensorische, motorische en cognitieve functies. Deze tests moeten zorgvuldig worden gekozen om eventuele effecten van de potentiële behandelstrategieën vast te leggen. Gedetailleerde beschrijvingen van elk van deze gedragstests, waaronder trainingsschema's, zijn hier niet opgenomen, maar voor een omvattend overzicht van het gebruik ervan, zie Schaar et al.<sup>1</sup>

In veel recente aanbevelingen voor preklinisch onderzoek naar nieuwe beroerte-therapieën wordt het gebruik van hogere soorten, zoals niet-menselijke primaten, aanbevolen als aanvulling op de ratmodellen.<sup>2-5</sup> De gewone penseelaap (*Callithrix jacchus*) kan worden beschouwd als de voorkeurssoort voor onderzoek naar de pathofysiologie en de behandeling van cerebrale ischemie. Deze primate staat dicht bij de mens dan de rat voor wat betreft cerebrovasculair systeem, hersenstofwisseling en de ratio grijze stof/witte stof, en heeft een rijker gedragsrepertoire. Bovendien is de soort gemakkelijker te hanteren dan apen van de oude wereld en dat is gunstig voor gedragsonderzoek en postoperatieve verzorging. Omdat de ligging en anatomie van de MCA bij de penseelaap de voor ratten gebruikte aanpak minder geschikt maakte, werd er een invasiever chirurgisch model ontwikkeld, waarbij een groot botluik werd gemaakt om toegang te krijgen tot de hersenen en de MCA. Meer recent is echter ook het gebruik van de filamentenmethode bij de penseelaap beschreven.<sup>6</sup> De intravasculaire aanpak biedt een aantal voordelen ten opzichte van eerder gebruikte methoden en moet worden beschouwd als een duidelijke verfijning. Vooral het niet uitvoeren van een craniotomie en het relatieve non-invasieve karakter leveren minder negatieve gevolgen (bijv. ernstige invaliditeit/mortaliteit) in de postoperatieve periode op.

Net als bij knaagdieren zijn de eerste 48 u na de ingreep cruciaal. De dieren zijn niet goed in staat voor zichzelf te zorgen en veel voorkomende beperkingen zijn hemiparese van de linker arm, abnormale grijpreflex, linkszijdig neglect, nystagmus en oogrotatie.<sup>7</sup> In het algemeen zijn de dieren na 3–7 dagen in staat voor zichzelf te zorgen en kunnen ze terug naar hun thuishooi. De motorische vaardigheden keren geleidelijk (ongeveer 2 weken na de ingreep) grotendeels terug, zodat de dieren vrij door hun kooi kunnen springen en klimmen.

### *Voorbeeld van een procedure*

*Onderzoeksopzet.* In dit voorbeeld, waarin de werking van een nieuwe stof wordt onderzocht, zullen zes mannelijke en zes vrouwelijke in het laboratorium gefokte penseelapen (*Callithrix jacchus*) onder algehele verdoving een transiënte een 3-urige MCAO ondergaan met gebruikmaking van de intraluminale

filamentmethode. Voorafgaand aan de ingreep worden de penseelapen getraind en onderworpen aan een aantal neurologische tests ter beoordeling van de algemene neurologische functie, motoriek en ruimtelijk inzicht. Direct na de tMCAO krijgen de penseelapen een bolus van zoutoplossing ( $n = 6$ ) of de teststof A ( $n = 6$ ), en wordt er subcutaan een mini-osmosepomp geïmplant, waarmee 48 u. zoutoplossing of geneesmiddel wordt toegediend. Tot 45 dagen na MCAO zal wekelijks worden gemonitord op sensomotorische beperkingen en na 1 u. en op D8 en D45 wordt onder algehele verdoving een MRI-scan uitgevoerd. De dieren worden 46 dagen na MCAO gedood.

*Inventarisatie van specifieke verfijningen en humane eindpunten.*

Wat gebeurt er tijdens dit onderzoek met de dieren?	Wat zullen de dieren ondervinden? Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken? Wat zou het lijden erger kunnen maken?	Hoe wordt lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
Gedurende 1 week, voorafgaand aan MCAO, training in gedragstests: tactiele stimulatie, 'hill-and-valley staircase, six-tube choice' en verwijderen van een sticker.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dit zijn gedragsobservaties die vrijwillig door de dieren worden uitgevoerd en geen pijn, lijden of blijvende schade veroorzaken.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alle tests worden uitgevoerd in de aangepaste thuishok</li> </ul>	Doorgaans wordt een tijdslimiet vastgesteld voor de verrichting van de gevraagde taak waarna een eindscore wordt toegekend. Dieren die geen baselineprestatie halen, worden uitgesloten van het onderzoek
Onder algehele verdoving wordt de MCA tijdelijk (3 u.) afgesloten met behulp van de filamentenmethode via de halsslagader.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pijn en ongemak als gevolg van operatie</li> <li>Potentieel voor onverwachte chirurgische complicaties, bijv. meningeale bloedingen, ipsilateraal netvliesletsel, intraluminale thrombusformatie, hersenoedeem, hypothalamus-betrokkenheid met als gevolg hyperthermie, of temporele spier necrose. Deze kunnen zich op een aantal verschillende manieren manifesteren, bijvoorbeeld: plotse collaps, verlamming, ernstig schuine stand van de kop, toevallen</li> <li>Potentieel effect van anesthesie op fysiologische variabelen, zoals hypothermie, hypotensie, hypoxie</li> <li>Geringe voedselinname als gevolg van verminderd bewustzijnsniveau, aangetast kauwen en geringe motiliteit, doorgaans in de eerste 48 uur na MCAO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gebruik van passende verdoving met passende analgesie (d.w.z. werkzaam maar met minimale neuroprotectieve eigenschappen)</li> <li>Goed opgeleide chirurg die passende aseptische chirurgische technieken toepast (met regelmatige analyse van slagingspercentages)</li> <li>In stand houden van homeostase tijdens anesthesie</li> <li>Gebruik van gestandaardiseerde monofilamenten en operatietechniek om variabiliteit en complicaties als gevolg van omvangrijke beschadigingen te verminderen</li> <li>Intensieve postoperatieve zorg gedurende eerste 3–5 dagen, waaronder externe warmtebronnen.</li> <li>Regelmatige controles van lichaamsgewicht; dagelijkse observatie en wondverzorging</li> <li>Eenvoudig toegankelijk voer en water tijdens de herstelperiode, of extra voeder (puree, vloeibaar) en hulp bij voeding indien noodzakelijk; rehydreren (bijv. injectie van zoutoplossing) indien noodzakelijk</li> </ul>	Dieren worden op humane wijze gedood als een van de volgende gebeurtenissen zich voordoet: <ul style="list-style-type: none"> <li>Significante technische problemen tijdens operatie.</li> <li>Niet volledig herstellen van anesthesie</li> <li>Tekenen van onverwachte chirurgische complicaties</li> <li>Als het dier meer dan 20% van zijn gewicht voorafgaand aan de operatie verliest, ondanks aanvullende voeding en/of rehydratie, of langer dan 24 uur immobiel blijft</li> </ul>



Intraveneuze bolus van zoutoplossing/teststof, gevolgd door subcutane implantatie van een minipomp onder algehele verdoving (als onderdeel van de MCAO-procedure, d.w.z. geen aanvullende anesthesie vereist).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pijn en ongemak als gevolg van operatie (implantatie van een minipomp)</li> <li>• Geen negatieve gevolgen verwacht bij de toegediende dosisniveaus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dieren zullen nauwlettend worden geobserveerd op bijwerkingen van de teststoffen</li> </ul>	Dieren zullen op humane wijze worden gedood als ernstige bijwerkingen van de nieuwe therapeutische agentia worden waargenomen
Gedragstests worden de eerste week na MCAO dagelijks uitgevoerd, en gedurende 6 weken wekelijks; tactiele stimulatie, 'hill-and-valley staircase, six-tube choice' en verwijderen van een sticker	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dieren kunnen de taken als stressvol ervaren als hun motorische vermogens zijn aangetast</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toezien op gedragsindicatoren die wijzen op angst of stress</li> <li>• Dieren worden voortdurend geobserveerd door ervaren medewerkers</li> </ul>	Doorgaans wordt een tijdslimiet (cut-off) vastgesteld voor het verrichten van de gevraagde taak en wordt een eindscore toegekend
Longitudinale MRI onder narcose op 1 u, 8 en 45 dagen na MCAO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herhaalde anesthesie</li> <li>• Effect van anesthesie en fysiologische variabelen (hypothermie, bloeddruk, bloedgassen) op resultaat na beroerte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gebruik van passende verdoving en analgesie (d.w.z. werkzaam maar met minimale neuroprotectieve eigenschappen)</li> <li>• In stand houden van homeostase tijdens anesthesie</li> </ul>	Dieren die niet volledig herstellen van anesthesie worden gedood

*Initiële beoordeling vooraf.* Dit model wordt beschouwd als **ERNSTIG** vanwege de chirurgische ingreep en de negatieve gevolgen van de MCAO voor het welzijn van het dier, met name in de eerste week. De negatieve gevolgen voor het welzijn van het dier kunnen echter sterk worden verminderd door intensieve postoperatieve zorg in de eerste 48 uur en tot 7 dagen, en zorgvuldige monitoring in de daarop volgende fase. Uit experimenteel oogpunt kan verfijning en standaardisering van elke afzonderlijke stap in de procedure leiden tot een verminderde incidentie van complicaties en variabiliteit, en daardoor tot betere gegevenskwaliteit en een vermindering van het aantal benodigde dieren.

De onderzoeker, de dierenarts, dierwetenschappers en biotechnici dienen een klinisch scoresysteem te ontwikkelen met criteria voor monitoring en euthanasie. Op dit blad moet tevens de neurologische score worden geregistreerd, evenals andere klinische criteria als lichaamsgewicht, vermogen voor zichzelf te zorgen of reactie op stimuli.

Zou de ernst van het ongerief **MATIG** kunnen zijn?

De incidentie van de negatieve gevolgen ondervonden door de dieren kan significant worden verminderd door te werken met ervaren/opgeleid personeel, toezicht door dierenartsen en intensieve zorg in de eerste periode na MCAO, tezamen met overeengekomen eindpunten.

*Klinische observatie/scoresysteem.* In de postoperatieve periode worden dieren zorgvuldig gemonitord. Analgesie en lokale ondersteunende therapie worden toegediend. Een voorbeeld van een gecombineerd neurologisch/klinisch scoresysteem dat wordt gebruikt om de klinische toestand van de dieren gedurende de procedure te monitoren, is aan het einde van dit voorbeeld opgenomen.

*Resultaten en beoordeling van het ongerief.* Alle dieren hebben zich van de operatie hersteld zonder onverwachte complicaties. Bij alle dieren was de klinische score in de eerste 48 uur na MCAO gelijk en alle dieren ontvingen intensieve perioperatieve zorg. Noch in de controlegroep, noch bij de behandelde dieren werd na inductie van ischemie significante ipsilaterale uitval waargenomen. Bij alle dieren werd een gedeeltelijk herstel van contralaterale neurologische uitval waargenomen.

- Alle zes met medium behandelde dieren ontwikkelden matige contralaterale neurologische uitval, in combinatie met een slechte prestatie in de gedragstest in vergelijking met behandelde dieren. Desondanks verbeterde de klinische score na verloop van tijd, mogelijk als gevolg van hun vermogen tot compensatie en aanpassing aan langdurige neurologische uitval.  
Beoordeling: **ERNSTIG**

- 2 van de 6 behandelde dieren ontwikkelden matige contralaterale neurologische uitval, in combinatie met een slechte prestatie in de gedragstest in vergelijking met behandelde dieren. Desondanks verbeterde de klinische score na verloop van tijd, mogelijk als gevolg van hun vermogen tot compensatie en aanpassing aan langdurige neurologische uitval.  
Beoordeling: **ERNSTIG**
- 4 van de 6 behandelde dieren vertoonden vanaf 48 uur na MCAO een significante verbetering in neurologische score, evenals een verbetering in de klinische score.  
Beoordeling: **MATIG**

Concluderend werd het ongerief van 8 dieren als **ERNSTIG** beschouwd en van 4 dieren als **MATIG**.

### *Voorbeeld van een klinisch observatie/scoresysteem*

Het ongerief wordt beoordeeld aan de hand van een combinatie van algemene klinische observaties (lichaamsgewicht, voorkomen, gedrag) en een procedure-specifieke neurologische evaluatie. Voor de neurologische scoring werd gebruik gemaakt van een aangepaste versie van het systeem beschreven door Bihel et al. waarbij afwezigheid (score 0), matige aanwezigheid (score 1) of aanwezigheid (score 2) van een aantal afwijkende bewegingen/houdingen afzonderlijk voor elke lichaamskant worden beoordeeld (d.w.z. ipsilateraal en contralateraal ten opzichte van MCAO-laesie).<sup>6</sup>

	Score
<b>Voorkomen</b>	
5–10 % gewichtsverlies	1
11–15% gewichtsverlies	2
16–20% gewichtsverlies	3
20 %+ gewichtsverlies	HEP
Gebrek aan verzorging	1
Lichte pilo-erectie	2
Zware pilo-erectie	3
<b>Gedrag</b>	
Enigszins abnormale gang	1
Zeer abnormale gang	2
Wezenlijke mobiliteitsproblemen	3
Immobiliteit > 24 u.	HEP
Gespannen en nerveus bij hantering	2
Merkbaar angstig bij hantering, bijv. trillen, vocaliseren, agressief	3

HEP = humaan eindpunt

Daarnaast wordt een afzonderlijke neurologische scoring uitgevoerd. De ledematen worden afzonderlijk beoordeeld, met een maximale hemilaterale score van 10. Bij controledieren wordt in de eerste week na MCAO een hoge score (max. 10) verwacht aan de contralaterale zijde van het lichaam, met een geleidelijk herstel in de volgende weken. Er is geen significant ipsilateraal deficit te verwachten (aangezien dit zou betekenen dat het ischemische gebied te groot is).

Neurologische score:

Score	Afwezig	Licht aanwezig	Sterk aanwezig
Voorpoten glijden weg of hangen onder de zitstok, in rust of in beweging.	0	1	2
Achterpoten glijden weg of hangen onder de zitstok, in rust of in beweging.	0	1	2
Hand gekruist over de borst	0	1	2
Scheve kop (voor en na stimulatie)	0	1	2
Gebrek aan reactie op visuele prikkel	0	1	2

Elk ledemaat wordt afzonderlijk beoordeeld en gescoord. In de eerste week na MCAO wordt ernstige contralaterale neurologische uitval in combinatie met slechte klinische condities verwacht, terwijl ipsilaterale neurologische schade zeer beperkt/afwezig zou moeten zijn.

De neurologische score voor elk ledemaat wordt opgeteld bij de klinische observatiescore, zodat een cumulatieve score wordt verkregen.

### Week 1 na MCAO

Het is bekend dat direct na MCAO een hoge cumulatieve score te verwachten is, met progressieve verbetering in de eerste week na de ingreep. In deze **kritische** periode ontvangen de dieren intensieve zorg en worden ze frequent gemonitord onder toezicht van een dierenarts. Met name de eerste periode van 48–72 uur is toezicht van cruciaal belang om te waarborgen dat chirurgische complicaties worden opgemerkt en maatregelen worden genomen om deze tijdig te bestrijden.

≥ 22 – HEP<sub>tpb</sub> 1pc

### Week 2–6 na MCAO

1–10 – regelmatig monitoren, evalueren in combinatie met klinische score

10–20 – frequent monitoren, zorg bieden indien dier niet in staat is voor zichzelf te zorgen, klinische score evalueren en met team alle beschikbare onderzoeksgegevens beoordelen (d.w.z. MRI, gedragstests) om onverwachte complicaties uit te sluiten, zoals hersenbloeding, oedeem, etc.

≥ 20 – HEP

### *Voorbeeld van een individueel observatiesysteem (dag 0–4)*

Dag	0	1	2	3	4
<b>Voorkomen</b>					
Lichaamsgewicht (g) (score)	340 (1)	305 (3)	320 (2)	323 (2)	335 (1)
Vacht onverzorgd/pilo- erectie	1	1	1	1	1
<b>Gedrag</b>					
Gang	3	3	3	3	3
Reactie op hantering	0	0	2	0	0
Totale klinische score	4	7	8	5	5
Totale neurologische score	15	14	14	10	10
Letselomvang (MRI- onderzoek) *	7%				
<b>Overige observaties</b>	Herstelde probleemloos van operatie	Beweegt heen en weer in de incubator (met ernstige contralaterale stoornis)		Reikt met ipsilaterale hand naar voedsel	

\* 'letselomvang' (beoordeeld met behulp van MRI) moet door de onderzoeker aan het einde van het onderzoek worden ingevuld. Deze gegevens kunnen vervolgens worden gecorreleerd met klinische en gedragsobservaties om verdere verfijning van monitoring, diervoorzorg en procedures mogelijk te maken

### **Referenties**

1. Schaar KL, Brenneman MM and Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med* 2010; 2: 13.
2. Freret T, Bouet V, Toutain J, et al. Intraluminal thread model of focal stroke in the non-human primate. *J Cereb Blood Flow Met* 2008; 28: 786–796.
3. Freret T and Bouet V. Improvements of the stroke model guidelines: animal body weight and long-term functional concerns. *Exp Transl Stroke Med* 2009; 2: 28–31.
4. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999; 30: 2752–2758.
5. Virley D, Hadingham SJ, Roberts JC, et al. A new primate model of focal stroke: endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion and reperfusion in the common marmoset. *J Cereb Blood Flow Met* 2003; 24: 24–41.
6. Bihel E, Pro-Sistiaga P, Letourneur A, et al. Permanent or transient chronic ischemic stroke in the non-human primate: behavioural, neuroimaging, histological, and immunohistochemical investigations. *J Cereb Blood Flow Met* 2010; 30: 273–285.
7. Marshall JW and Ridley RM. Assessment of cognitive and motor deficits in a marmoset model of stroke. *ILAR J* 2003; 44: 153–160.

# Cardiovasculaire evaluatie van nieuwe therapieën - het telemetriemodel in de hond

## *Algemene context*

Voor elk geneesmiddel dat in de handel wordt gebracht, moet niet alleen de werkzaamheid, maar ook de veiligheid worden aangetoond. Daarom moeten zelfs middelen bestemd voor gebruik op heel andere gebieden (bijv. neurofarmacologie) worden beoordeeld op potentiële cardiovasculaire effecten.

Cardiovasculaire effecten van middelen kunnen op uiteenlopende manieren worden onderzocht: met invasieve terminale procedures op dieren onder narcose, met tijdelijk in bedwang gehouden dieren met op de buitenkant van het lichaam aangebrachte monitoringapparatuur, of in zich vrij bewegende dieren die vooraf zijn geïmplantéerd met monitoringapparatuur (telemetriesystemen). De afgelopen decennia zijn telemetriesystemen in toenemende mate gebruikt voor het meten van fysiologische en bioelektrische variabelen (zoals bloeddruk, hartslag, ECG) bij onderzoek naar en ontwikkeling van geneesmiddelen.<sup>1</sup> Dat de dieren tijdens de metingen niet worden aangebonden, gehanteerd of gefixeerd, biedt een uitgelezen kans om proefdieren over een langere tijdsperiode te bestuderen zonder extra stress of fysiologische verstoring (anesthesie). Bovendien kunnen dieren tussen de metingen groepsgewijs worden gehuisvest.

Telemetrie kan het aantal benodigde dieren verkleinen. Ten eerste kunnen dieren, omdat telemetriesystemen maandenlang (en mogelijk zelfs jaren) stabiel zijn, worden gebruikt als hun eigen controles, wat de variabiliteit vermindert en daarmee het per behandelgroep benodigde aantal dieren. Ten tweede biedt telemetrie de mogelijkheid om doorlopend een aantal variabelen te registreren, zodat er in vergelijking met conventionele methodes significant meer gegevens kunnen worden verkregen uit een bepaald aantal dieren. Ten derde zijn de verkregen gegevens van hogere kwaliteit door afwezigheid van potentiële stressoren, zoals inbedwanghouding en vaatkatheters. Telemetriesystemen kunnen bovendien indicaties geven over het dierenwelzijn en zo bijdragen aan de toepassing van vroegere, meer humane eindpunten.<sup>2</sup> Telemetrie wordt dan ook algemeen beschouwd als een positieve bijdrage aan de wetenschap, waarmee tevens de impact op het dierenwelzijn kan worden geminimaliseerd. De noodzaak van passende chirurgische training moet echter niet worden onderschat, aangezien dit aspect direct van invloed is op het dierenwelzijn. Een gedegen basis- en gevorderde opleiding in experimentele chirurgie en goede praktische kennis van deze toestellen zijn absoluut essentieel alvorens over te gaan tot implantatie.

## *Voorbeeld van een procedure*

*Onderzoeksopzet.* In dit voorbeeld zullen drie voorgeselecteerde mannelijke beagles (geschikt temperament) worden gebruikt. De dieren fungeren als hun eigen controle.

Na een nacht onthouding van voedsel worden de dieren onder algehele verdoving gebracht. Er wordt een telemetrietoestel geïmplantéerd waarmee de lichaamstemperatuur en cardiovasculaire parameters (ECG, bloeddruk) doorlopend kunnen worden gemeten. Implantatie van deze telemetrietoestellen is een chirurgische procedure die niet-invasief is voor lichaamsholten, aangezien de zender niet intraperitoneaal wordt geïmplantéerd, maar in een intermusculaire zak. De katheter wordt ingebracht via de liesslagader en naar de aorta geleid. ECG-elektroden worden onderhuids aangebracht. Het veroorzaakte ongerief hangt samen met de implantatie en de ontstane operatiewonden en de noodzaak om de dieren onder algehele verdoving te brengen.

In de 3 weken durende herstelperiode worden de dieren getraind om 2 u. lang sociaal te worden geïsoleerd (bijv. telemetrische registratie).

Na de herstelperiode vereist de procedure voortgezet gebruik: dieren worden wekelijks gebruikt om cardiovasculaire effecten van het nieuwe therapeutische agens bij twee verschillende dosisniveaus te evalueren (één dag met medium; de volgende dag met de teststof). De eerste behandeling bestaat uit toediening van het medium, gevolgd door toediening van het nieuwe farmaceutische agens. Tussen de registratiemomenten worden de dieren sociaal gehuisvest. Tussen de testsessies wordt een minimale uitwasperiode in acht genomen (zoals bepaald in farmacokinetische studies).

Doel van het onderzoek is het beoordelen van de potentiële cardiovasculaire effecten van nieuwe agentia bij voorgestelde therapeutische doses.

Aan het einde van het onderzoek worden de dieren sociaal gehuisvest, in afwachting van mogelijk hergebruik.

*Inventarisatie van specifieke verfijningen en humane eindpunten.*

Wat gebeurt er tijdens dit onderzoek met de dieren?	Wat zullen de dieren ondervinden? Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken? Wat zou het lijden erger kunnen maken?	Hoe wordt lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
Preoperatieve voorbereiding van het dier	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Individuele huisvesting voorafgaand aan operatie</li> <li>• Onthouding van voedsel in de nacht voorafgaand aan operatie</li> </ul>		N.v.t.
Chirurgische implantatie van telemetrietoestel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mogelijke pijn en ongerief</li> <li>• Potentiële effecten van anesthesie en operatie (hypothermie, uitdroging, angst tijdens herstel)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Passende perioperatieve zorg: passende verdoving en analgesie, etc.</li> <li>• Niet-farmacologische beheersing van pijn en angst: aseptische techniek, verwarming,</li> <li>• Goed opgeleid personeel</li> <li>• Geoptimaliseerde chirurgische procedure</li> </ul>	Beslissing om het dier tijdens de ingreep op humane wijze te doden als onaanvaardbare complicaties optreden en aanhouden
Herstelperiode (3 weken), inclusief training	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mogelijke pijn, infectie, ongerief</li> <li>• Postoperatieve complicaties</li> <li>• Individuele huisvesting gedurende postoperatieve periode (24 u.) en training (2 u. per dag)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adequate postoperatieve zorg (analgesie, antibiotica) waar nodig</li> <li>• Dagelijks observatie en wondverzorging</li> </ul>	Elk dier met klinische symptomen van infectie wordt onderzocht, behandeld en tijdelijk uitgesloten van het onderzoek
Toediening van teststof (i.v., s.c., i.p., p.o.) voorafgaand aan registratie van parameters	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mogelijk voorbijgaand ongerief na toediening van de teststof</li> <li>• Potentiële stof-gerelateerde onverwachte neveneffecten</li> <li>• Dieren worden korte perioden individueel gehuisvest (bepaald door de farmacokinetiek van het geneesmiddel).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bloeddruk, ECG en lichaamstemperatuur worden doorlopend gemonitord in het vrij bewegende dier, gehuisvest in een kooi met telemetrie-ontvanger.</li> <li>• Tussen onderzoeken worden dieren groepsgewijs gehuisvest en dagelijks geobserveerd.</li> <li>• Lichaamsgewicht wordt wekelijks geregistreerd.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• In geval van langdurige neveneffecten na behandeling met teststof: mogelijk behandelen en een langere uitwasperiode in acht nemen, en klinische controle vóór nieuwe dosering en beslissing over mogelijke euthanasie.</li> <li>• Einde batterijduur: dier wordt ofwel voorgesteld voor hergebruik als bloeddonor, of in geval van toestemming van bevoegde instanties, geëxplanteerd en afhankelijk van onderzoek door de dierenarts voorgesteld voor adoptie of voorgesteld voor hergebruik als bloeddonor.</li> </ul>

*Initiële beoordeling vooraf.* Deze procedure is ingedeeld als **MATIG** aangezien hij algehele verdoving en een chirurgische ingreep vereist.

Van de toediening van de stof zijn geen klinische effecten op het dier te verwachten. Het toedienen van de stof is echter **LICHT**, aangezien hierbij sprake is van een injectie volgens goed diergeneeskundig vakmanschap.

Zou de ernst van het ongerief **LICHT** kunnen zijn?

Nee: de procedure omvat algehele verdoving en een chirurgische ingreep; op grond hiervan is de indeling **MATIG**.

Bij hergebruik van eerder geïmplanteerde dieren die in een ander project zijn gebruikt, en die alleen worden onderworpen aan toediening en evaluatie door middel van telemetrie van teststoffen op therapeutische dosisniveaus, dient het ongerief vooraf, aangezien er geen sprake is van inbedwanghouding (vrij bewegend), te worden ingedeeld als LICHT.

Zou het ongerief **ERNSTIG** kunnen zijn?

Ja, als de teststof in de toegediende doses toxische effecten zou hebben (cardiovasculair of overig). In dat geval zou het teststroomschema niet kloppen, aangezien een telemetriemodel absoluut niet bedoeld is voor evaluatie van toxische doses, maar voor klinische/therapeutische doses van teststoffen. De onderzoeksopzet zou dan moeten worden herzien.

*Klinische observatie/scoresysteem.* De dieren worden in elke stap van de procedure zorgvuldig gemonitord. Er worden een specifiek anesthesieblad en een klinisch observatiesysteem ontwikkeld. Deze zijn aan het einde van dit voorbeeld opgenomen. Tijdens de uitvoering van technieken worden dagelijks alle klinische observaties geregistreerd. Tijdens de uitwasperioden worden de dieren geobserveerd en ten minste wekelijks gewogen.

*Resultaten en beoordeling van de werkelijke ernst van het ongerief.* Drie honden hebben de procedure ondergaan. Alle dieren zijn zonder complicaties van de ingreep hersteld, in geen van de dieren werden bij de geteste doses cardiovasculaire neveneffecten geobserveerd.

De drie dieren werden geacht **MATIG** ongerief te hebben ondervonden.

Aan het einde van de procedure werden de dieren opnieuw sociaal gehuisvest. Het niveau van ongerief was MATIG als gevolg van de chirurgische implantatie die de dieren ondergingen, maar de algemene staat van gezondheid is volledig hersteld. Er werd geen cumulatief ongerief geobserveerd als gevolg van toediening van het geëvalueerde nieuwe therapeutische agens. Op grond hiervan wordt geoordeeld dat de dieren na een passende uitwasperiode en positief diergeneeskundig advies mogen worden hergebruikt in toekomstige LICHTE, MATIGE of terminale procedures.

### Voorbeelden van klinische observatie/scoresystemen

Post-op follow-up sheet		Micro-chip:		Nummer hond:			Onderzoeker									
Procedure ID		Partij:		Naam hond:			Datum operatie									
		Aankomstdatum:		Lichaamsgewicht		kg		Partij no telemetrie toestel								
Datum	LG kg	Tijd u Temp °C	Postoperatieve zorg *)						Observaties en andere handelingen		Paraf					
			Voer inname	Water Inname	Urine prod.	Feces prod.	Wond aspect	Overig	Analgesie	Antibiotica		Wondverzorging	Overige medicatie			
D.-1		u t														
D.0		u t														
D.1		u t														
D.2		u t														
D.3		u t														
D.4		u t														
D.5		u t														
...																
D.17		u t														
D.18		u t														
D.19		u t														
D.20		u t														

\*) Dien pijnstilling en antibiotica toe op basis van procedure  
Bij constatering van afwijkingen contact opnemen met de dierenarts

<b>Studie follow-up sheet</b>					Micro-chip:		<b>Nummer hond:</b>		Onderzoeker		
					Partij:		<b>Naam hond:</b>		Datum operatie		
Procedure ID						Aankomstdatum:		Lichaamsge- wicht:	kg	Partij no. telemetrie toestel	
Datum	Tijd	Vasten	Isolatie	Toediening van teststof (dosis, route)	Voer- distributie	Start/eind telemetrische registratie		Bloedafname	Gedragsobservaties	Andere acties	
											Para af
Scoor gedrag als 0, +, ++, +++ Observeer speekselproductie, miosis, mydriasis, defecatie, mictie, houding van het dier, sedatie, bewegingsactiviteit, stijfheid, vocalisatie, etc. Beschrijf onverwachte afwijkingen en neem contact op met de dierenarts Noteer tevens tijdstip, hoeveelheid en hoeveelheid afgenomen bloedmonsters											

### Referenties

1. Morton DB, Hawkins P, Bevan R, et al. Refinements in telemetry procedures: seventh report of the BVA(AWF)/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Party on Refinement, Part A. *Lab Anim* 2003; 37: 261–299.
2. Hawkins P, Morton DB, Bevan R, et al. Husbandry refinements for rats, mice, dogs and non-human primates used in telemetry procedures: seventh report of the BVA(AWF)/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Party on Refinement, Part B. *Lab Anim* 2004; 38: 1–10.

## Evaluatie van de werkzaamheid van nieuwe antiaritmica – konijnmodel voor atriumfibrilleren met gebruik van geïmplanteerde minipomp voor toediening van stoffen

### Algemene context

Paroxismaal atriumfibrilleren (boezemfibrilleren, AF) is een aandoening waarbij periodiek een onregelmatig hartritme optreedt. Na enkele minuten, uren of dagen herstelt het normale sinusritme zich spontaan. Bij mensen met dit type AF kunnen zich dagelijks of slechts enkele keren per jaar aanvallen voordoen. Aanvang en einde van deze aanvallen zijn gewoonlijk onvoorspelbaar, wat zeer verontrustend kan zijn. Ongeveer 1 op de 4 mensen met paroxismaal atriumfibrilleren ontwikkelt uiteindelijk de permanente vorm van de aandoening.

De oorzaak van paroxismaal AF is niet altijd bekend. Hoewel AF kan optreden bij patiënten zonder duidelijke hartaandoening, is in ongeveer de helft van de gevallen van paroxismaal AF sprake van organische hartaandoeningen, zoals congestief hartfalen en MVD (afwijkingen van de mitrale hartklep). Bij persisterend of permanent AF gaat het om 80% van de gevallen. Mensen met paroxismaal AF lijken evenveel risico te lopen op de ontwikkeling van bloedstolsels als mensen met chronisch AF. De werking van bloedverdunners blijkt bij mensen met paroxismaal AF echter niet zo effectief als bij mensen met chronisch AF. AF is een veel voorkomende hartritmestoornis en een sterke risicofactor voor het optreden van een cardioembolische beroerte. Aangezien onderzoeken naar de ionische eigenschappen van boezemweefsel bij patiënten met AF veel veranderingen in ionstroming hebben aangetoond, is onderzoek naar ionkanaalblokkers nodig.<sup>1,2</sup>

De ontwikkeling van talrijke diermodellen van AF met klinisch relevante ziektemodellen heeft de afgelopen jaren veel vooruitgang gebracht. Er zijn modellen ontwikkeld in ratten, honden, geiten, schapen en meer recent in genetisch gemodificeerde muizen.<sup>3</sup> Het ongerief en invasiviteit van het model hangen af van de onderliggende oorzaken die worden onderzocht.

Met screening op basis van elektrofysiologische, ionische en moleculaire mechanismen in in-vitro-modellen kan de potentiële werkzaamheid van stoffen in kaart worden gebracht, waarna deze in in-vivo-modellen worden geëvalueerd. Het ideale diermodel voor het testen van geneesmiddelen is een eenvoudig, stabiel, betaalbaarder, klinisch relevant model, waarin op betrouwbare wijze aanhoudend AF kan worden opgewekt (voor het testen van geneesmiddel-geïnduceerde beëindiging) en vervolgens eenvoudige conversie naar sinusritme (voor onderzoek met meervoudige doses) mogelijk is. Het hier opgenomen voorbeeld betreft een chirurgisch model voor het opwekken van AF met een bewezen goede reproduceerbaarheid, in combinatie met gering klinisch ongerief voor het dier.

### *Voorbeeld van een procedure*

*Onderzoeksopzet.* In dit voorbeeld worden 10 grote volwassen mannelijke New Zealand White (NZW) konijnen (n = 5 per dosisgroep (controle met zoutoplossing en teststof)) gebruikt. Op basis van poweranalyse van eerdere gegevens (voorbereidende studies) bleek dit het minimale aantal dieren vereist voor de steekproef.

Om ervoor te zorgen dat de teststof als preventieve behandeling op een stabiel niveau aanwezig is, wordt er een subcutane minipomp geïmplanteerd waarmee de teststof 21 dagen lang wordt toegediend. Hierdoor is niet alleen onafgebroken diffusie van het geneesmiddel in het lichaam van het dier mogelijk (waarmee pieken in geneesmiddeltoediening worden voorkomen), maar kan tevens de verstoring van het dier voor toediening van geneesmiddelen (wat kan leiden tot tijdelijke extra veranderingen in hartfrequentie en spontaan AF) tot een minimum worden beperkt.

Tijdens dezelfde algehele verdoving worden bipolaire elektroden geïmplanteerd op het linker atrium en aangesloten op een elektrische stimulator. De elektrische stimulator wordt op zijn plaats gehouden door een jas. Dieren worden voor de operatie gewend aan de jas.

In een postoperatieve periode van 7 dagen kunnen de dieren volledig herstellen van de ingreep. Daarna worden de geïmplanteerde elektrodes gedurende 14 opeenvolgende dagen dagelijks gestimuleerd. Hierdoor is een stapsgewijze stimulus mogelijk, die ervoor zorgt dat de hartslag geleidelijk toeneemt en paroxysmaal AF ontstaat. Hiervoor is incidentele hantering en immobilisatie van het dier nodig voor de aanpassing van stimulatieparameters.

14 dagen later worden de dieren onder algehele verdoving gebracht. Zodra de hemodynamische parameters stabiel zijn, wordt AF opgewekt door een vaste periode van elektrische stimulatie en worden hemodynamische parameters en biologische markers gemeten, waarna het dier gedood wordt met overdosis verdovend middel.

### *Inventarisatie van specifieke verfijningen en humane eindpunten.*

Wat gebeurt er tijdens dit onderzoek met de dieren?	Wat zullen de dieren ondervinden? Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken? Wat zou het lijden erger kunnen maken?	Hoe wordt lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Individuele huisvesting (volwassen mannelijke dieren en operatieve uitrusting)</li> <li>• Gewenning van de dieren aan de jas en verzwaarde rugzak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kan enige angst veroorzaken</li> <li>• Minimale stress door dragen jas en rugzak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bieden van verrijkmateriaal</li> <li>• Kalme, empathische hantering</li> </ul>	<p>Dieren die niet acclimatiseren, worden niet in het onderzoek opgenomen</p>



<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chirurgische implantatie van s.c. minipomp met nieuw therapeutisch agens en aanbrengen van bipolaire elektroden op hartwand via thoracotomie.</li> <li>• Toediening van therapeutisch agens via minipomp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Complicaties tijdens ingreep en verdoving: hypothermie, hartritmestoornissen, ademhalingsstilstand</li> <li>• Pijn en hinder als gevolg van operatie</li> <li>• Van de therapeutische stof worden geen significante negatieve effecten verwacht (op basis van voorgaande gegevens).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Passende perioperatieve zorg: aseptische techniek, passend anesthesieprotocol, beademing, verwarmingselement, antiaritmica gedurende de ingreep, i.v. perfusie van zoutoplossing</li> <li>• Niet-farmacologische beheersing van pijn en angst: goed opgeleide chirurg, geoptimaliseerde chirurgische procedure om variabiliteit te beperken.</li> <li>• Analgesie wordt routinematig toegepast en voortgezet op indicatie.</li> <li>• Gebruik van zeer ervaren personeel.</li> </ul>	<p>Beslissing om het dier tijdens de ingreep op humane wijze te doden als onaantoonbare complicaties aanhouden, bijvoorbeeld ongecontroleerde ritmestoornissen, ventrikelfibrilleren</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herstelperiode (7 dagen) en daarna gedurende 14 opeenvolgende dagen doorlopende stimulatie van de geïmplanteerde elektrodes</li> </ul>	<p>Complicaties gedurende postoperatief herstel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pijn en ongerief, hypothermie of hyperthermie, ademnood, hartritmestoornissen, wondinfectie</li> <li>• Aanwezigheid van minipomp en diffusie van het geneesmiddel kan mogelijk ongerief veroorzaken als gevolg van de locatie van de minipomp en/of diffusie van geneesmiddel</li> <li>• Hartfrequentie wordt stapsgewijs opgevoerd. AF kan plotseling optreden als het dier gestrest is.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adequate postoperatieve zorg (verwarming, voedsel, etc.)</li> <li>• Passende huisvesting en jas voorkomen dat het dier zichzelf verwondt of de elektroden/wondlocatie verstoort (bijv. grote, hoge kooi).</li> <li>• Dagelijkse massage om adhesie van de minipomp te voorkomen.</li> <li>• Maximale dosisniveaus te bepalen aan de hand van eerdere procedures.</li> <li>• Passende perioperatieve zorg: <ul style="list-style-type: none"> <li>o Analgesie en/of ontstekingsremmers geschikt voor de soort gedurende ten minste 2 dagen na operatie, afhankelijk van lichaamstemperatuur en klinische symptomen</li> <li>o Lokale antibiotica/antiseptica op huidwonden.</li> </ul> </li> <li>• Postoperatieve monitoring met dagelijks klinisch scoresysteem (lichaamstemperatuur, lichaamsgewicht, voedselinname, wondverzorging, etc.)</li> <li>• Dieren worden gewend aan gewicht van rugzak.</li> <li>• Dagelijkse klinische follow-up van dieren</li> <li>• Huisvesting en hantering onder niet-stressvolle omstandigheden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dieren worden op humane wijze gedood als ze binnen 48 uur meer dan 20% van hun aanvankelijke lichaamsgewicht verliezen.</li> <li>• Beslissing om te doden als onaantoonbare complicaties aanhouden in de postoperatieve periode (klinische symptomen van lijden; niet binnen 48 u. na operatie terugkeren naar normale toestand)</li> <li>• Dieren met klinische symptomen van infectie worden onderzocht en behandeld</li> </ul>
<p>Terminale anesthesie (met opgewekte AF) 14 dagen later</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AF kan spontaan optreden,</li> <li>• Manifesteert zich als plotseling dood, zeer zeldzaam, zonder opgemerkte klinische symptomen</li> </ul>	<p>Passende verdoving en analgesie</p>	<p>Dieren worden op humane wijze gedood middels een overdosis van een verdovend middel als fibrillatie spontaan optreedt vóór aanvang van de opgewekte fibrillatie (teststof duidelijk niet effectief), anders na afloop van 3-urige meting tijdens terminale procedure</p>

*Initiële beoordeling vooraf.* Doel van het onderzoek is beoordeling van de werkzaamheid van nieuwe therapeutische middelen ter voorkoming/minimalisering van het optreden van AF na elektrische stimulatie van het linker atrium.

De s.c.-implantatie van een minipomp is een zeer snelle procedure. Het kost een ervaren persoon slechts enkele minuten. De thoraxoperatie is een invasieve procedure. Het dier moet onder algehele verdoving worden gebracht en de operatie kan zeker enige pijn en ongerief veroorzaken. De hartstimulatie op zichzelf lijkt geen pijn te

veroorzaken, geen zichtbaar ongerief: de dieren lijken niet te reageren op verhoogde hartfrequentie als dit op een langzame, progressieve manier wordt gedaan. Bijgevolg moet de ernst van het ongerief vooraf worden ingedeeld als **MATIG**.

Zou het ongerief **LICHT** kunnen zijn?

Nee, de thoraxoperatie veroorzaakt pijn en ongerief, dit wordt echter tot een minimum beperkt door pijnverlichting en chirurgische technieken die als beste zijn beproefd.

Deze procedure vraagt een zware chirurgische ingreep, en alleen al de implantatie van de minipomp is een procedure die onder algehele verdoving moet worden uitgevoerd.

Zou het ongerief **ERNSTIG** kunnen zijn?

Als om welke reden dan ook geen adequate analgesie of postoperatieve analgesie zou worden gegeven, zou deze procedure ernstige pijn kunnen veroorzaken.

Als hartstimulatie niet geleidelijk zou gebeuren, zou dit spontaan AF kunnen opwekken, wat zou kunnen leiden tot spontaan overlijden van het dier. Op grond hiervan zou de indeling **ERNSTIG** moeten zijn. Dit is zeldzaam en zou met passende progressieve stimulatie slechts zeer zeldzaam moeten voorkomen.

*Klinische observatie/scoresysteem.* De dieren worden in elke stap van de procedure zeer zorgvuldig gemonitord met behulp van een specifieke anesthesieregistratie en een klinisch observatiesysteem. In de postoperatieve periode worden waar nodig analgesie en lokale ondersteunende therapie gegeven en geregistreerd op het individuele klinische observatieblad. Bladen worden dagelijks ingevuld, waarbij lichaamsgewicht, lichaamstemperatuur, klinische symptomen, standaard postoperatieve behandelingen en alle andere behandelingen worden genoteerd. Stimulaties en reacties daarop worden eveneens geregistreerd. Een voorbeeld van een observatieblad is aan het einde van dit voorbeeld opgenomen.

*Resultaten en beoordeling van het werkelijk ondervonden ongerief.* Tien dieren hebben de procedure ondergaan. Alle dieren hebben zich van de operatie hersteld zonder complicaties. Eén dier in de controlegroep met zoutoplossing werd kort na de eerste elektrische stimulatie dood aangetroffen. Alle overige dieren ondergingen terminale anesthesie, gedurende welke de werkzaamheid van het therapeutische middel ten opzichte van het medium werd geëvalueerd. Ongeriefbeoordeling voor de vijf met zoutoplossing behandelde dieren:

- 1 van de 5 konijnen werd op D11 dood aangetroffen (eerste elektrische stimulatie): **ERNSTIG**
- 4 van de 5 doorliepen de terminale anesthesieprocedure: **MATIG**
- 5 dieren werden met de teststof behandeld. Alle 5 doorliepen de terminale anesthesieprocedure: **MATIG**

*Voorbeeld van een postoperatief follow-up blad*

Post-op follow-up sheet			Tatoe:	Nummer konijn:		Onderzoeker		
			Partij:			Datum implantatie stimulator		
			Aankomstdatum:	Lichaamsgewicht	kg			
Datum	LG kg	Tijd u Temp °C	Postoperatieve zorg				Observaties en andere handelingen	Paraaf
			Analgesie	Antibiotica	Wondverzorging	Overige medicatie		
J.-1		u t						
J.0		u t						
J.1		u t						
J.2		u t						
J.3		u t						
...								
J.13		u t						
J.14		u t						

\*) Dien pijnstilling en antibiotica toe op basis van procedure  
Bij constatering van afwijkingen contact opnemen met de dierenarts

## Referenties

1. Benson MD, Ju Li Q, Kieckhafer K, et al. SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *PNAS* 2007; 104: 1805–1810.
2. Burashnikov A and Antzelevitch C. Role of late channel current block in the management of atrial fibrillation. *Cardiovasc Drugs Ther* 2013; 27: 79–89.
3. Nattel S, Shiroshita-Takeshita A and Brunde BJ. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis* 2005; 48: 9–28.

## Bepaling van de ecotoxiciteit van een teststof – bioconcentratie-doorstroomtest met vissen

### *Algemene context*

Doel van de bioconcentratietest is de bepaling van het bioaccumulatie-potentieel van een chemische stof in visweefsel, op basis van (o.a.) de octanol-water-partiticoëfficiënt van de teststof. Dit is wettelijk verplicht voor alle chemische stoffen waarbij blootstelling van het aquatisch milieu mogelijk is. Een onderzoek kan worden uitgevoerd met blootstelling via het water; dit levert een bioconcentratiefactor op (BCF, verhouding van de concentratie van de stof in de vis ten opzichte van de concentratie van die stof in het water). Het onderzoek kan ook worden uitgevoerd met blootstelling via voeding (bijv. wanneer de stof zeer slecht oplosbaar is in water); dit levert de biomagnificatiefactor op (BMF, de verhouding van de concentratie van een stof in de vis ten opzichte van de concentratie in het voedsel).

De BCF of BMF wordt gebruikt bij de beoordeling van de persistentie, bioaccumulatie en toxiciteit (PMT) criteria en de zeer persistente en zeer bioaccumulatieve (zPzB) criteria, en wordt gebruikt voor de milieurisicobeoordeling voor de aquatische voedselketen (d.w.z. water – vissen – toppredatoren, zoals vogels en zoogdieren). Als een stof bioaccumulerend is, hoopt deze zich op in levende organismen zodra hij in het milieu terecht komt, hetgeen kan leiden tot negatieve gevolgen hoger in de voedselketen. Een stof die voldoet aan alle criteria voor PBT en/of zPzB wordt aangemerkt als PBT/zPzB-stof. Stoffen die worden aangemerkt als PBT of zPzB worden geacht in aanmerking te komen voor vervanging, wat betekent dat ze indien mogelijk moeten worden vervangen door stoffen die niet PBT/zPzB zijn.

Een PBT/zPzB-beoordeling is verplicht voor alle stoffen (d.w.z. industriële chemicaliën, landbouwchemicaliën, biociden en geneesmiddelen voor menselijk en diergeneeskundig gebruik). Hoewel er enkele QSAR's beschikbaar zijn, zijn deze niet altijd geschikt, afhankelijk van de moleculaire structuur of fysisch-chemische eigenschappen van de chemische stof. Verder geven QSAR's alleen een schatting van de BCF voor de onveranderde chemische stof, terwijl in een onderzoek met vissen rekening kan worden gehouden met afbraakproducten en eliminatietijd na overbrenging naar niet-verontreinigd water.

Vissoorten die in de test gebruikt kunnen worden, zijn karper (*Cyprinus carpio*), zebravis (*Danio rerio*), dikkop-elritts (*Pimephales promelas*), blauwkeelzonnebaars (*Lepomis macrochirus*) of regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*).

### *Voorbeeld van een procedure*

*Onderzoeksopzet.* Het onderzoek is gebaseerd op de OESO-richtlijnen inzake het testen van chemische stoffen, Richtlijn 305: Bioaccumulatie in vissen: blootstelling via water en voer, oktober 2012.<sup>1</sup> De procedure is ontworpen om te voldoen aan de testmethodes voorgeschreven in Verordening (EC) nr. 440/2008 van de Commissie van 30 mei 2008, deel C: Methoden ter bepaling van ecotoxiciteit, Publicatie nr. L142, C.13 'Bioconcentratie: doorstroomtest met vissen'.<sup>2</sup> De vissen worden blootgesteld gedurende een opnamefase van 28 dagen, gevolgd door een depuratiefase van 56 dagen. De duur van beide fases kan worden aangepast op basis van het verloop van opname en/of depuratie. In de opnamefase wordt een groep vissen blootgesteld aan de teststof in één of meer gekozen concentraties. De aantallen vissen per testconcentratie worden zodanig gekozen dat bij iedere bemonstering ten minste vier vissen per monster beschikbaar zijn. Vervolgens worden ze voor de depuratiefase overgebracht naar een medium dat de teststof niet bevat. De vissen worden gehouden in bakken met doorlopende wateraanvoer, waaraan gedurende de opnamefase de teststof wordt toegevoegd. Er wordt een verversingssnelheid van ten minste vijf bakvolumes per dag gehanteerd. Er worden niet-toxische concentraties

van teststoffen gebruikt. Radioactieve labelling van de teststof kan worden gebruikt voor analytische doeleinden. Watermonsters worden genomen vóór en gedurende de opname- en depuratiefase. De vissen worden op achtereenvolgende tijdstippen in de opnamefase (bijv. 1, 3, 7, 14, 21 en 28 dagen) en de depuratiefase (30, 35, 42, 56 en 84 dagen) geselecteerd voor afname van weefselmonsters na doding. En na 0 of 28 dagen blootstelling voor vetextractie. Weging gebeurt vóór de test en postmortaal; bemonstering van de vissen gebeurt tijdens de test en postmortaal. Per monster en per testconcentratie zijn vier of meer vissen nodig. Er werden in totaal 130 regenboogforellen gebruikt, die werden blootgesteld aan twee verschillende concentraties van een teststof: 32 vissen worden gebruikt voor de controlegroep (1 replicaat) en 49 vissen voor elke testconcentratie (2 replicaten).

*Inventarisatie van specifieke verfijningen en humane eindpunten.*

Wat gebeurt er tijdens dit onderzoek met de dieren?	Wat zullen de dieren ondervinden? Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken? Wat zou het lijden erger kunnen maken?	Hoe wordt lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
De vissen die voor de test worden gebruikt, worden gevangen, gewogen en gemeten	Lichte agitatie (als gevolg van vangst/hantering)	Goed vakmanschap, passende uitrusting/techniek	Toepassing van humane eindpunten, bijv. bloedingen/sugillatie, huidlaesies, kieuwafwijkingen, abnormale zwemhouding gedurende 2 dagen of meer, stuiptrekkingen
Vissen worden gehouden in testoplossingen in een doorstroomsysteem met volledig opgeloste concentraties van de teststof	Geen of lichte klinische symptomen	N.v.t.	Toepassing van humane eindpunten, bijv. bloedingen/sugillatie, huidlaesies, kieuwafwijkingen, abnormale zwemhouding gedurende 2 dagen of meer, stuiptrekkingen
Euthanasie door een overdosis verdovingsmiddel of kopslag: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Geselecteerde vissen worden op het moment van bemonstering gevangen met een net, afgespoeld, drooggedept en direct gedood middels een kopslag gevolgd door doorsnijden van de nekkolom;</li> <li>• Resterende vissen worden aan het einde van de blootstelling in een euthanasieoplossing ondergedompeld, bijv. tricaine-methaansulfonaat (TMS, MS-222), 2-phenoxyethanol</li> </ul>	Lichte agitatie als gevolg van vangst/hantering direct gevolgd door respectievelijk kopslag of doding met verdovingsmiddel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Goed vakmanschap, passende uitrusting/techniek</li> <li>• Goede monitoring/controle van euthanasieprocedure (kwaliteit, concentratie, effecten)</li> </ul>	N.v.t.

*Initiële beoordeling vooraf.* De dieren zullen naar verwachting slechts LICHT ongerief ondervinden op basis van blootstelling aan niet-toxische concentraties van de teststof en de toepassing van goed vakmanschap bij hantering en doding. Bijgevolg moet het ongerief vooraf worden ingedeeld als **LICHT**.

Zou het ongerief **MATIG** kunnen zijn?

Normaal gesproken niet, aangezien in de bioaccumulatiefase alleen sprake is van lichte of geen negatieve gevolgen, en daarmee slechts LICHT ongerief te verwachten is op basis van het gebruik van niet-toxische dosisconcentraties, en hantering en euthanasiemethoden volgens goed vakmanschap. Als tegen de verwachtingen in klinische symptomen worden waargenomen die wijzen op matig ongerief, wordt een geïnformeerde beslissing genomen over het vervolg van het experiment, bijv. doding van het dier op basis van humane eindpunten, geïntensiverde monitoring of noodzakelijke verandering van de ongeriefbeoordeling vooraf voor vergelijkbare experimenten en melding bij Vergunningverlener.

*Klinische observatie-/scoresysteem.* De dieren worden dagelijks gemonitord op mortaliteit/viabiliteit en negatieve gevolgen. Aan de hand van klinische scoresystemen en observatieprocedures moeten de onderzoeker, de dierenarts en biotechnici criteria bepalen voor monitoring en tijdige doding (humane eindpunten).<sup>3-5</sup> Tijdelijk gebruik van licht om observaties te verbeteren is mogelijk, maar dient te worden beperkt. De vissen worden na 2–4 u. geobserveerd op negatieve gevolgen en mortaliteit, en aan het einde van de dag op mortaliteit en mogelijk meer negatieve gevolgen in verband met mogelijke toepassing van humane eindpunten. Elke volgende ochtend worden de vissen gecontroleerd op mortaliteit. Op de observatiemomenten en aan het einde van de dag wordt gecontroleerd op mortaliteit en (meer) negatieve gevolgen. Een voorbeeld van het neurologisch/klinisch scoresysteem dat wordt gebruikt om de klinische toestand van de dieren gedurende de procedure te monitoren, is aan het einde van dit voorbeeld opgenomen. Behalve in geval van typische symptomen of afwijkingen (bijv. typisch zwemgedrag of beschadigde vin/staart) in één individu of bij een zeer klein aantal vissen, is follow-up of heridentificatie van een individuele vis niet of nauwelijks mogelijk. Als identificatie van een individuele aangedane vis en daarop volgende observaties mogelijk zijn, kan dit bijdragen aan de monitoring van de klinische toestand, als mogelijke basis voor de toepassing van humane eindpunten. In andere gevallen moet het aantal vissen met typische klinische symptomen worden gebruikt om de toestand van de groep vissen in de bak te beoordelen.

*Resultaten en beoordeling van het werkelijk ondervonden ongerief.* Gedurende de 84 dagen vertoonden 124 vissen geen klinische symptomen en werden deze geacht een LICHT ongerief te hebben ondervonden. In testconcentratie 2 werd in één vis op drie opeenvolgende dagen verkleuring geobserveerd, gevolgd door volledig herstel. Waarschijnlijk betrof het elke dag dezelfde vis. De ernst van het ongerief werd als LICHT beoordeeld. In de controlegroep, testconcentratie 1 en 2, werd één vis dood aangetroffen zonder klinische symptomen vooraf. Het ongerief werd als LICHT beoordeeld. Zowel in de controlegroep als in testconcentratie 1 zwom één vis rondjes. Na overleg met de aangewezen dierenarts werden deze vissen in het onderzoek gehouden en zorgvuldig gemonitord. Klinische symptomen bij deze vissen verdwenen na twee dagen. Het ongerief werd voor beide vissen als MATIG beoordeeld. Tot slot werd in testconcentratie 1 één vis geobserveerd met ontbrekende staart; deze werd op humane wijze gedood. Ongerief: ERNSTIG.

Beoordeling: LICHT voor 127 vissen, MATIG voor 2 vissen en ERNSTIG voor 1 vis.

**Acties:** Aangezien klinische symptomen de vooraf bepaalde ongeriefcategorie overschreden, werd na diergeneeskundig advies nauwkeuriger monitoring toegepast en de Vergunningverlener geïnformeerd.

### *Voorbeeld klinische observatie-/scoresysteem*

Er kan een klinisch scoresysteem worden gebruikt voor dagelijkse observatie van mortaliteit en negatieve gevolgen. Een klinisch scoresysteem kan verschillende symptomen bevatten ten aanzien van zwemgedrag, pigmentatie, voorkomen, reactief gedrag of stuiptrekkingen. Aan- of afwezigheid wordt dagelijks of waar nodig frequenter gedocumenteerd. Elke vorm van abnormaal en onverwacht gedrag moet worden gemeld aan de onderzoeker en/of aangewezen dierenarts of voldoende gekwalificeerde deskundige op het gebied van vissen. Als ernstige negatieve gevolgen worden geobserveerd, moet worden besloten tot frequentere monitoring en/of toepassing van humane eindpunten. Het ontbreken van identificatie en groepsdichtheid kunnen follow-up van observaties bij individuele dieren bemoeilijken of niet-realistisch maken.

Een voorbeeld van een klinisch scoresysteem is hieronder opgenomen.

Dag van observatie	Doelconcentratie		
	Controle	Testconcentratie 1	Testconcentratie 2
0	geen afwijkingen	geen afwijkingen	geen afwijkingen
1	1 vis is dood	geen afwijkingen	geen afwijkingen
etc.			
7	geen afwijkingen	geen afwijkingen	1 vis is dood
etc.			
14	geen afwijkingen	1 vis zwemt rondjes	1 vis vertoont verkleuring
etc.			
16	geen afwijkingen	1 vis is dood	1 vis vertoont verkleuring
etc.			
37	1 vis zwemt rondjes	geen afwijkingen	geen afwijkingen
etc.			
72	geen afwijkingen	1 vis zonder staart (gedood)	geen afwijkingen
etc.			

Het ongerief wordt bepaald aan de hand van een combinatie van deze observaties (samen met een procedure voor evaluatie). In geval van combinaties van in de tabel beschreven observaties wordt de hoogste vermelde score gebruikt voor beoordeling. Als een observatie langer dan één dag op rij aanwezig is, kunnen de scores worden aangepast (+1, +2 of +3) in overleg met de onderzoeker, biotechnici en/of aangewezen dierenarts of deskundige op het gebied van vissen. Zorgvuldige monitoring draagt bij aan de beoordeling van het werkelijke ongerief als LICHT, MATIG of ERNSTIG, met name in gevallen van plotselinge dood met of zonder voorafgaande klinische symptomen, of het nemen van geïnformeerde beslissingen over tijdige toepassing van humane eindpunten.

Voorgestelde ongeriefbeoordeling en acties op basis van klinische observaties:

Beschrijving	Score <sup>a</sup>	Actie	Beoordeling van het ongerief <sup>b</sup>
Normaal zwemmen, gedrag, uiterlijk	1	N.v.t.	LICHT
Zwemgedrag			
Op de bodem zwemmen	1	Controleer op overeenkomsten controles	LICHT
Aan de oppervlakte zwemmen	1	Controleer op overeenkomsten controles	LICHT
Aan de oppervlakte naar lucht happen	2	N.v.t.	LICHT
Verticaal zwemmen	3	Gecumuleerd ongerief	MATIG
Zwemmen op de zij of rug	3	N.v.t.	MATIG
Rondjes zwemmen (normale tot ruggelingsse zwemhouding)	3	N.v.t.	MATIG
Pigmentatie			
Donkerdere kleur	2	N.v.t.	LICHT
Voorkomen			
Staartcontractie	3	N.v.t.	MATIG
Bloedingen/sugillatie	4-5	(Overweging) HEP <sup>c</sup>	ERNSTIG
Zichtbare schade aan huid en/of vinnen	4-5	(Overweeg) HEP	ERNSTIG
Reactief gedrag			
Traag in vergelijking met controlegroep	2	N.v.t.	LICHT
Immobiel	2	N.v.t.	LICHT
Hyperactief zwemmen na tikken tegen bak	2	N.v.t.	LICHT
Hyperactief zwemmen	3	N.v.t.	MATIG
Overige			
Plotselinge dood zonder tekenen vooraf	2	N.v.t.	LICHT
Plotselinge dood met tekenen vooraf	2-5	N.v.t.	LICHT, MATIG of ERNSTIG
Onomkeerbaar ongerief als stuiptrekkingen	4-5	(Overweeg) HEP	ERNSTIG

a. Als een observatie ook op de tweede of derde dag op rij gemeld wordt, wordt er +1 aan de score toegevoegd, 4 dagen op rij +2 en 5 dagen op rij +3. Dit kan de ongeriefbeoordeling en toepassing van HEP vergemakkelijken.

b. Bij een combinatie van observaties wordt de hoogste vermelde ongeriefscore gebruikt voor de ongeriefbepaling.

c. HEP = humaan eindpunt.

## Referenties

1. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 305: bioaccumulation in fish: aqueous and dietary exposure. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 3: degradation and accumulation*. Paris: OECD Publishing, 2012.
2. European Commission. Commission Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008, Part C: Methods for the determination of ecotoxicity: ‘Bioconcentration: Flowthrough Fish Test’. *Off J Eur Union* 2008; L142: C.13.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*. OECD series on testing and assessment number 23. Paris: OECD Publishing, 2000.
4. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. Paris: OECD Publishing, 2000.
5. Humane Endpoints in Laboratory Animal Experimentation. What are humane endpoints? [www.humane-endpoints.info/en](http://www.humane-endpoints.info/en) (2017, accessed 14 May 2017).

# Bepaling van acute orale toxiciteit met een teststof in ratten

## *Algemene context*

De testrichtlijnen van de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO) zijn een reeks methoden voor de beoordeling van de gevaren van chemische stoffen en preparaten zoals pesticiden. Deze methoden bevatten tests voor fysische en chemische eigenschappen, effecten op de menselijke gezondheid en in het wild levende dieren, en accumulatie en degradatie in het milieu. De testrichtlijnen van de OESO worden wereldwijd erkend als de standaardreferentie voor het testen van chemische stoffen en worden periodiek herzien in het licht van wetenschappelijke vooruitgang en veranderingen in beoordelingspraktijken. Data over acute orale toxiciteit wordt gebruikt voor indeling in gevarenklassen en etiketteringsvereisten, voor risicobeoordeling voor de menselijke gezondheid en het milieu, en voor het inschatten van de toxiciteit van mengsels. De doelstelling van een onderzoek naar **acute** orale toxiciteit is het bepalen van de (bijna) letale toxiciteit van de teststof na toediening van een eenmalige dosis. Er is gekozen voor de orale route, aangezien dit een mogelijke blootstellingsroute voor mensen is.

De conventionele test voor acute orale toxiciteit (voorheen OESO-testrichtlijn 401, de klassieke 'LD<sub>50</sub>'-test),<sup>1</sup> waarvoor meer dan 20 dieren nodig zijn, is de meest bekritiseerde test in termen van dierenwelzijn. Naar aanleiding hiervan is deze test afgeschaft en zijn er drie alternatieve tests voor acute toxiciteit ontwikkeld (OESO-testrichtlijnen 420, 423 en 425),<sup>2-4</sup> respectievelijk de vaste-dosis-procedure (420), de acute-toxiciteitsklasse-procedure (423), en de op-en-neer-procedure (UDP, 425). Bij alle tests van deze richtlijnen wordt de teststof in geleidelijk stijgende doses toegediend aan groepen dieren, die worden geobserveerd op effecten en overlijden (of humane eindpunten). Het resultaat wordt uitgedrukt als een berekende LD<sub>50</sub> (de dosis waarbij 50% van de dieren overlijdt) of geschatte LD<sub>50</sub>-range. De vaste-dosis-procedure vereist niet de dood als eindpunt en maakt gebruik van gemiddeld 5–7 dieren, waarvan er één sterft. Bij de acute-toxiciteitsklasse-procedure en de op-en-neer-procedure worden gemiddeld 6–9 dieren gebruikt, waarvan er 0–3 sterven.<sup>5</sup>

## *Voorbeeld van een procedure.*

De methode ter bepaling van de acute toxiciteitsklasse is een stapsgewijze procedure waarbij per stap drie dieren van het gevoeligste geslacht (indien onbekend, dan vrouwelijk) worden gebruikt. Vóór uitvoering van het onderzoek dient alle beschikbare informatie over de teststof in aanmerking te worden genomen (bijv. identiteit en chemische structuur, fysisch-chemische eigenschappen, andere in-vivo- of in-vitro-onderzoeken, toxicologische gegevens over stoffen met een verwante structuur, beoogde toepassing(en) van de stof).

Er moet een passend vehicle aan de teststof worden toegevoegd en concentraties moeten worden aangepast om constante doseervolumes mogelijk te maken. De dieren moeten voorafgaand aan toediening gevast worden om interferentie van de teststof met voedsel in de maag te voorkomen; de richtlijn vereist onthouding van voedsel in de nacht ervoor. Doseervolumes worden gekozen in overeenstemming met goed vakmanschap en media op basis van interne/externe databases van ontvangers.

Als startdosis wordt één van de vier vaste dosisniveaus gekozen (5, 50, 300 en 2000 mg/kg). Het is mogelijk om nog een vijfde doseerniveau van 5000 mg/kg te gebruiken, maar alleen als dit op grond van specifieke regelgeving gerechtvaardigd is. Het niveau van de startdosis moet gelijk zijn aan het niveau dat het **meest waarschijnlijk** tot mortaliteit bij een aantal van de gedoseerde dieren zal leiden. Wanneer beschikbare informatie suggereert dat mortaliteit onwaarschijnlijk is bij het hoogste startdosisniveau (2000 mg/kg lichaamsgewicht), moet een zogenaamde 'limiettest' worden uitgevoerd (6 ratten, 3 ratten per stap). Als er geen informatie beschikbaar is over een stof die moet worden getest, wordt om dierenwelzijnsredenen het gebruik van de startdosis **300 mg/kg** lichaamsgewicht aangeraden. Afhankelijk van de mortaliteit en/of de stervende toestand van de dieren, worden verdere groepen dieren gedoseerd met een hogere of lagere vaste dosis, afhankelijk van de aanwezigheid van mortaliteit, totdat de onderzoeksdoelstelling is bereikt; d.w.z. indeling van de teststof op basis van de bepaling van de dosis/doses die mortaliteit veroorzaakt/veroorzaken, behalve wanneer er bij de hoogste vaste dosis geen effecten zijn.

Het tijdsinterval tussen behandelgroepen wordt gebaseerd op ontwikkeling, duur en ernst van de toxische symptomen. Behandeling van de volgende groep wordt uitgesteld tot geen verdere mortaliteit te verwachten is in eerder gedoseerde groep(en). Gemiddeld zijn er 2–4 stappen nodig om een oordeel te kunnen vellen over de indeling van de teststof in één van een reeks toxiciteitscategorieën gedefinieerd door vaste LD<sub>50</sub> cut-off waarden.

Voor dit onderzoek zullen in totaal zes ratten worden gebruikt. Volgens de stapsgewijze procedure worden in stap één drie ratten via orale gavage gedoseerd met een startdosis van 300 mg/kg. Dieren ontvangen één dosis en worden vervolgens 14 dagen geobserveerd. Observaties omvatten klinische symptomen, metingen van het lichaamsgewicht en macroscopische afwijkingen bij necropsie aan het einde van de observatieperiode, of eerder indien dood aangetroffen of op humane wijze gedood.

*Inventarisatie van specifieke verfijningen en humane eindpunten.*

Wat gebeurt er tijdens dit onderzoek met de dieren?	Wat zullen de dieren ondervinden? Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken? Wat zou het lijden erger kunnen maken?	Hoe wordt lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
Onthouden van voedsel in de nacht voorafgaand aan toediening en tot 3-4 u. na toediening van de teststof. Er is toegang tot water.	Geen pijn, lijden of blijvende schade aangezien voedsel eenmalig per rat wordt onthouden en LG niet geacht wordt lager te worden dan 80% van het gemiddelde van hetzelfde geslacht/stam/leeftijd. Aangezien het onthouden van voedsel plaatsvindt gedurende de actieve fase en tot 24 u. kan duren, wordt deze onthouding beschouwd als licht ongerief, doordat deze op basis van gedrag en fysiologie enige angst kan veroorzaken.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Niet langer vasten dan vanuit fysiologisch oogpunt raadzaam (rat 6 u.) en wetenschappelijk noodzakelijk om het maag-darmkanaal te legen of opname van de stof in het maag-darmkanaal te bevorderen, verdient de voorkeur boven het 's nachts onthouden van voedsel volgens de richtlijn. Dit dient echter vooraf door de bevoegde instanties te worden goedgekeurd.</li> <li>De volgende (tweede) groep krijgt direct voedsel en wordt niet gevast/gestart als in de voorafgaande (eerste) groep sprake is van (geprolongeerde/vermoede) mortaliteit.</li> </ul>	N.v.t.
Toediening van een eenmalige dosis van de teststof via orale gavage	Tijdelijk ongerief na gavage wordt beschouwd als licht ongerief. Goede toedieningstechnieken/vaardigheden zijn essentieel, maar een gavage-accident kan in zeldzame gevallen voorkomen.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Goed opgeleid personeel.</li> <li>Gavageslang zo gekozen om zo min mogelijk ongerief te veroorzaken (juiste maat, flexibel kunststof indien de inertie van de teststof dit toelaat, relatief grote binnendiameter).</li> <li>Toedieningsvolumes volgens goed vakmanschap gebaseerd op gewicht/soort: bijv. maximaal doseringsvolume van 10 ml/kg LG. Indien (op grond van de concentratie in de samenstelling) hogere volumes noodzakelijk zijn, maximaal drie toedieningen van één dosis binnen 24 u.</li> </ul>	Humane eindpunten in geval van gavage-accident, bijv. gescheurde slokdarm (zeldzaam).
Onmiddellijk of vertraagd toxisch effect van stof na dosering en gedurende een 14-daagse observatieperiode met groepshuisvesting.	Afhankelijk van de teststof. In de standaard observatieperiode van 14 dagen na dosering kunnen lokale of systemische lichte, matige of ernstige klinische symptomen of mortaliteit optreden.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Monitoring van mortaliteit/viabiliteit (ten minste 2x / dag)</li> <li>Monitoring van klinische symptomen (ten minste 3x / doseringsdag en daarna eenmaal per dag) en lichaamsgewicht (ten minste wekelijks).</li> <li>Interval tussen opeenvolgende groepen ten minste 24 u.</li> <li>Volgende (tweede) groep met het volgende doseerniveau wordt niet gevast/gestart indien in de eerdere (eerste) groep sprake is van (geprolongeerde/vermoede) mortaliteit.</li> <li>Wees alert op vertraagde mortaliteit/toxiciteit.</li> <li>Observatiefrequentie/periode kan op basis van (verwachte) klinische symptomen worden uitgebreid om risico op letaliteit tot een minimum te beperken door gebruik van humane eindpunten.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Humane eindpunten bepaald door totale klinische score.</li> <li>Dieren die ernstige klinische symptomen vertonen of in stervende toestand verkeren, worden gedood (dit doet geen afbreuk aan het onderzoeksresultaat, aangezien deze dieren gelijk worden gesteld aan dieren die tijdens het onderzoek sterven).</li> </ul>



*Initiële beoordeling vooraf.* Toxiciteit van de stof kan resulteren in de ongeriefklasse ERNSTIG, aangezien het startdosisniveau zeer waarschijnlijk mortaliteit in één of meer dieren zal veroorzaken. Frequentie observaties na dosering op dag 1 (direct na dosering, 2 en 4 u. later) en controles in de ochtenden en avonden zijn noodzakelijk om effectieve vroege eindpunten toe te passen om het ongerief te minimaliseren.

In het algemeen moet het ongerief daarom worden ingedeeld als **ERNSTIG**.

Zou het ongerief **MATIG** kunnen zijn?

Ja, als informatie over de teststof suggereert dat mortaliteit bij het hoogste startdosisniveau (2000 mg/kg LG) onwaarschijnlijk is en mortaliteit of relevante (uitgestelde) klinische symptomen van mortaliteit bij 6 ratten afwezig blijven (3 dieren per stap), kan het ongerief als **MATIG** of zelfs **LICHT** worden aangemerkt.

*Klinische observatie.* Volgens de richtlijn (OESO TR 423), moeten individuele ratten in de eerste 30 min. ten minste eenmaal worden geobserveerd, daarna in de eerste 24 u. periodiek, met in de eerste 4 u. bijzondere aandacht, en daarna 14 dagen lang dagelijks.<sup>3</sup> De duur van de observatie moet worden bepaald aan de hand van toxische reacties, aanvangstijdstip en lengte van herstelperiode, en kan worden verlengd indien noodzakelijk geacht. Het lichaamsgewicht wordt gemeten vóór dosering en daarna ten minste wekelijks. Veranderingen in lichaamsgewicht dienen te worden geregistreerd en gebruikt voor vaststelling van het welzijn en/of vroege humane eindpunten. Relevante macroscopische afwijkingen tijdens necropsie kunnen nuttig zijn om de juistheid van gekozen humane eindpunten te bevestigen. Indien tekenen van toxiciteit aanhouden, kunnen aanvullende observaties nodig zijn. Bij observaties dient op het volgende te worden gelet: veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, evenals ademhalingsstelsel, bloedsomloop, perifeer en centraal zenuwstelsel, en somatisch-motorische activiteit en gedragspatroon. Er dient aandacht te worden besteed aan observaties van tremors, stuiptrekkingen, speekselproductie, diarree, lusteloosheid, slaap en coma. De principes en criteria samengevat in de leidraad humane eindpunten van de OESO moeten in aanmerking worden genomen.<sup>6</sup> Dieren die stervend worden aangetroffen en dieren die hevige pijn hebben of blijvende tekenen van ernstig leed vertonen, moeten op humane wijze worden gedood.

Een klinisch scoresysteem of -programma (FELASA Working Group Report, 2015) kan bijdragen aan monitoring van dierenwelzijn, vaststelling van humane eindpunten en rapportage in overeenstemming met de OESO-richtlijnen.<sup>6,7</sup> Een voorbeeld van een klinisch scoresysteem dat wordt gebruikt om de klinische toestand van de dieren gedurende de procedure te monitoren, is aan het einde van dit voorbeeld opgenomen.

*Resultaten en beoordeling van het werkelijke ongerief.* Alle in stap 1 met een startdosis van 300 mg/kg behandelde ratten vertoonden klinische symptomen. Klinische symptomen omvatten lusteloosheid, gebogen houding, ongecoördineerde bewegingen, pilo-erectie, ptosis, gereutel en/of speekselproductie op Dag 1 en 2, terwijl één rat eveneens een gebogen houding vertoonde op Dag 6 en 7. Er werden geen ratten dood aangetroffen en er hoefden geen ratten op humane wijze te worden gedood, waarmee volgens de richtlijnen een tweede stap nodig was. In stap 2, waarin 3 ratten werden gedoseerd met 2000 mg/kg, werd één vrouwelijke rat op Dag 2 dood aangetroffen. Dit dier vertoonde een licht gewichtsverlies en klinische symptomen als lusteloosheid, gebogen houding, pilo-erectie, ptosis en speekselproductie tussen Dag 1 en 2. Bij necropsie van dit dier en andere dieren aan het einde van het onderzoek werden geen macroscopische afwijkingen gevonden. Er werd geen mortaliteit bij andere ratten waargenomen. De gewichtstoename van overlevende ratten was vergelijkbaar met onbehandelde dieren van dezelfde stam en leeftijd. Voor dit doel kunnen historische gegevens over onbehandelde of met hetzelfde medium behandelde dieren van dezelfde stam worden gebruikt. **Beoordeling:** **ERNSTIG** voor de dode rat, **MATIG** voor de andere ratten.

### *Scoringsysteem en voorbeelden van scorebladen*

Ongeriefbeoordeling vindt plaats aan de hand van een combinatie van klinische observaties (veranderingen in lichaamsgewicht, huid, vacht, ogen en slijmvliezen, aanwezigheid van secreties en excreties en ademhalingsstelsel, bloedsomloop, perifeer en centraal zenuwstelsel, en somatisch-motorische activiteit en gedragspatroon) met behulp van een klinisch scoresysteem gebruikt in de toxicologie, en bevindingen bij necropsie. Van geobserveerde symptomen worden tijdstip van aanvang, ernst van het ongerief en duur geregistreerd. Symptomen worden beoordeeld op ernst, waarbij de hoogste beoordeling op 3 of 4 is gesteld. De toegekende scores zijn licht (score 1), matig (score 2), ernstig (score 3) en zeer ernstig (score 4). Voor bepaalde symptomen wordt alleen aangegeven of ze aanwezig (score 1) of afwezig (score 0) zijn.

Een voorbeeld van een klinisch scoresysteem is hieronder opgenomen. Een uitgebreide maar niet complete lijst van gangbare klinische symptomen is aan de linkerkzijde opgenomen (met vermelding van scorebereik per klinisch symptoom tussen haken, bijv. 0–3 variërend van afwezig tot maximaal aanwezig). Dit voorbeeld heeft betrekking op een individuele rat gedoseerd met 300 mg/kg LG in de eerste stap met drie ratten.

Klinische symptomen	D1–0 u	D1–2 u	D1–4 u	D2	D3	D4	D5	D6	D7 etc. tot 15
Lichaamsgewicht (g)	150	-	-	145	150	152	155	158	
Huid en vacht: vlekken (0–1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Huid en vacht: bleek (0–3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Onwillekeurige klonische bewegingen (0–3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Onwillekeurige tonische bewegingen (0–3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremors (0–3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Speekselproductie (0–3)	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Traanvorming (0–1)	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Diarree (0–1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vocalisaties (0–1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stereotiep gedrag: barberen (0–1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stereotiep gedrag: repetitief rondjes draaien (0–1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bizar gedrag: zelfverminking (0–1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Centraal zenuwstelsel: lusteloosheid (0–3)	0	2	2	0	0	0	0	0	0
Centraal zenuwstelsel: stuiptrekkingen (0–3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Houding: gebogen houding (0–1)	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Houding: op achterpoten staan (0–1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Houding: rustpositie op buik-zij (0–1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Abnormale gang: ongecoördineerde bewegingen (0–3)	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Pilo-erectie (0–1)	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Ptoxis (gesloten oogleden) (0–3)	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Afwijkingen in ademhaling: zware ademhaling (0–3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Afwijkingen in de ademhaling: gereutel (0–3)	0	1	1	0	0	0	0	0	0

Nog een voorbeeld van hetzelfde onderzoek, nu een individuele rat gedoseerd met 2000 mg/kg LG in de tweede stap met drie andere ratten. Deze rat sterft op Dag 2 na geplande observatie. Alleen afwijkingen op het klinische scoresysteem over de observatieperiode worden getoond.

Klinische symptomen	D1–0 u	D1–2 u	D1–4 u	D2	D3	D4	D5	D6	D7 etc. tot 15
Centraal zenuwstelsel: lusteloosheid (0–3)	0	1	1	1	-	-	-	-	-
Houding: gebogen houding (0–1)	1	1	1	1	-	-	-	-	-
Pilo-erectie (0–1)	0	1	1	1	-	-	-	-	-
Ptoxis (gesloten oogleden) (0–3)	0	2	1	1	-	-	-	-	-
Speekselproductie (0–3)	0	0	0	1	-	-	-	-	-

## Referenties

1. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 401: acute oral toxicity. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 1987.
2. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 423: acute oral toxicity – fixed dose procedure. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2001.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 423: acute oral toxicity – acute toxic class method. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2002.
4. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 425: acute oral toxicity – up-and-down procedure. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2008.
5. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Guidance document on acute oral toxicity testing*. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2000.
6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: OECD Publishing, 2000.
7. Fentener van Vlissingen JM, Borrens M, Girod A, et al. The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. *Lab Anim* 2015; 49: 267–283.

## Farmacokinetisch onderzoek na eenmalige toediening van een teststof bij de hond

### *Algemene context*

De doelstelling van het onderzoek is het bestuderen van de farmacokinetika van een teststof na eenmalige toediening. Het verschil tussen systemische blootstelling na orale (capsule/tablet/gavage/voeding), intraveneuze, dermale of subcutane (bio-equivalente) toediening wordt beoordeeld. Voor stoffen die bestemd zijn voor menselijke inname via de orale route, wordt de orale route vergeleken met de intraveneuze route, de referentieroute waarbij de biologische beschikbaarheid 100% is. De op de teststof toepasselijke testrichtlijnen hebben betrekking op elke menselijke blootstelling, toekomstig gebruik of wetgeving.<sup>1-10</sup> De teststof kan een geneesmiddel zijn voor menselijk of diergeneeskundig gebruik, voedingrediënt of een (landbouw)chemicalie.

### *Voorbeeld van een procedure*

*Onderzoeksopzet.* Een gebruikelijke onderzoeksopzet is om voor twee perioden dezelfde dieren te gebruiken. In dit voorbeeld werden drie honden gebruikt. In de eerste periode worden na intraveneuze toediening de plasmaniveaus van de teststof gemeten. Vervolgens worden voor dezelfde teststof, na een passende geschatte uitwasperiode, in de tweede periode de plasmaniveaus van de teststof na orale toediening in dezelfde dieren gemeten. Er kunnen nog een derde of meer perioden met passende uitwasperiodes worden gebruikt om verschillende orale samenstellingen van de teststof te vergelijken (bijv. verschillende oplossingen, tabletten, capsules). Voor bio-equivalentieonderzoeken waarin een teststof wordt vergeleken met een bekende stof, kan een gerandomiseerde blokopzet worden gebruikt om de volgorde van blootstelling aan verschillende routes te randomiseren, zodat mogelijke tijdseffecten van eerdere toediening worden vermeden. Voor biobeschikbaarheidsonderzoeken, waarin wordt onderzocht of de biobeschikbaarheid van een onbekende teststof voldoende is om te worden gebruikt voor verdere onderzoeken, zal dit wellicht niet altijd nodig zijn. Er kan urine en/of ontlasting worden verzameld van dieren die voor het opvangen daarvan in metabole kooien worden gehouden. Na het onderzoek kan hergebruik van het dier nog wetenschappelijk verantwoord zijn, in welk geval het kan worden toegevoegd aan de ‘dieren in voorraad’. Geschiktheid voor mogelijk hergebruik zal worden gebaseerd op leeftijd, beoordeling van het welzijn (levensloop en procedurespecifiek), herstel van algemene gezondheid en welzijn in overeenstemming met diergeneeskundig advies en indeling van verdere procedures. Het onderzoek bestond in totaal uit 4 periodes, een eerste periode van intraveneuze toediening, gevolgd door drie periodes van toediening via verschillende capsules, steeds met een uitwasperiode van 1 week tussen toedieningsperiodes. Observaties omvatten klinische symptomen en meting van het lichaamsgewicht vóór elke toedieningsperiode.

*Inventarisatie van specifieke verfijningen en humane eindpunten.*

Wat gebeurt er tijdens dit onderzoek met de dieren?	Wat zullen de dieren ondervinden? Hoeveel lijden zou het kunnen veroorzaken? Wat zou het lijden erger kunnen maken?	Hoe wordt lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
<ul style="list-style-type: none"> <li>• In het orale doseringsonderzoek wordt tot 20–24 u. voorafgaand aan toediening voedsel onthouden ('een nacht vasten') om absorptie door het maag-darmstelsel te bevorderen, braken van voedsel te voorkomen en/of voor eventuele bloedafname voor klinisch-biochemische bepalingen.</li> <li>• Of: voeding kan om dezelfde redenen van opname in het maag-darmstelsel in delen voor of na toediening worden aangeboden</li> </ul>	<p>In het algemeen niet beschouwd als een procedure die ongerief veroorzaakt bij volwassen honden die routinematig eenmaal per dag worden gevoerd (als de dieren normaal tweemaal daags zouden worden gevoerd, zou dit als een procedure worden beschouwd). Als het vasten langer duurt dan 24 u. door vasten na toediening of bij jonge dieren, kan dit ongerief veroorzaken. Afhankelijk van de duur van de voedselonthouding en het effect van de teststof, zoals braken of lokale effecten op het maag-darmstelsel: variërend van geen gevolgen tot een hongergevoel, misselijkheid, indigestie, pijn, braken, voedselaspiratie, diarree als gevolg van effecten op het maag-darmstelsel.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bij voorkeur niet langer dan vanuit fysiologisch oogpunt raadzaam (hond 12 u.) en wetenschappelijk noodzakelijk om het maag-darmkanaal te legen om opname van stoffen in het maag-darmkanaal te bevorderen, maar tevens om braakreflex of mogelijke lokale effecten van de teststof te voorkomen.</li> <li>• Wisselend in tijd-gerelateerde werkprocedures.</li> </ul>	N.v.t.
<p>Waterrestrictie (gewoonlijk niet nodig maar op indicatie van beperkte duur, zoals 2 u. voor en 2 u. na toediening, exacte hoeveelheid water kan worden toegediend middels orale gavage na toediening van teststof)</p>	<p>Geen ongerief of uitdroging te verwachten, voorbijgaand LICHT ongerief als water wordt toegediend via orale gavage.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Waterrestrictie niet langer dan vanuit fysiologisch oogpunt raadzaam en wetenschappelijk noodzakelijk om opname van stoffen in het maag-darmkanaal te bevorderen/harmoniseren.</li> <li>• Passende uitrusting/techniek, bijv. juiste formaat eenmalige flexibele katheter voor orale toediening van water.</li> </ul>	N.v.t.
<p>Toediening van een <i>eenmalige</i> dosis via de orale (capsule/tablet/gavage), subcutane, intramusculaire, intraveneuze (via oppervlakkige aderen), dermale, sublinguale, rectale, vaginale, intratracheale of intranasale route. In sommige opzetten wordt naast onderzoek van de teststof en/of referentieproducten (bio-equivalentie) ook metaboliëtonderzoek uitgevoerd, waarbij het dier <i>herhaalde</i> doses krijgt toegediend, met inachtneming van passende uitwasperioden.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Voorbijgaand LICHT ongerief afhankelijk van toedieningsroute, inbedwanghouding, mogelijke verdoving (bij intratracheale of intranasale route) en lokale/systemische effecten van teststof en medium.</li> <li>• Hoewel er niet-toxische doses worden gebruikt, kunnen onverwachte gevolgen maximaal MATIGE gevolgen veroorzaken.</li> <li>• LICHT tot MATIG ongerief door herhaalde toediening of gebruik van verdoving tijdens intratracheale toediening.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beperking van toedieningsvolumes.<sup>11</sup></li> <li>• Passende mediumkeuze (optimale stoffblootstelling, biologische inertie, geen/beperkte biologische effecten en toxiciteit).</li> <li>• Passende doseeruitrusting, bijv. juiste formaat flexibele katheter voor eenmalig gebruik in plaats van stalen gavagenaald</li> <li>• Passende verdoving. Vermengen met smakelijk voer als dit de opname niet belemmert.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humane eindpunten bepaald door totale klinische score.</li> <li>• Dieren die ernstige klinische symptomen vertonen of in stervende toestand verkeren, worden gedood).</li> </ul>

<p>Herhaalde bloedafname (bijv. halsader) na toediening eenmalige dosis voor toxicokinetiek (orale toediening: bijv. vóór toediening, 8 × in eerste 24 u, daarna 5 tijdstippen tot dag 5; IV-toediening: bijv. vóór toediening, 10–12 × in eerste 24 u., daarna 2 tijdstippen tot dag 3, of tot 4–5 tijdstippen tot dag 4–5)</p>	<p>(Opnieuw) inbrengen van een naald veroorzaakt geen of LICHT ongerief, afhankelijk van gewenning aan procedure of mogelijke lokale ontstekingsreactie van weefsel.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gebruik van positieve bekrachtigingstraining voorafgaand aan uitvoering van afnameprocedures.</li> <li>• Goed vakmanschap, passende uitrusting/techniek</li> <li>• Juiste afnamevolumes, die normaal gesproken in deze soort/opzet geen beperkingen opleveren (frequente kleine volumes waardoor fysiologische verstoringen onwaarschijnlijk zijn).<sup>11</sup> Voor perioden waarin frequente afname plaatsvindt, kan het gebruik van verblijfskatheters de voorkeur verdienen, om de veneuze toegang te verbeteren en lokale reacties te voorkomen.</li> </ul>	<p>N.v.t.</p>
<p>Individuele huisvesting in metabole kooi in verband met niet-invasieve urineafname door het opvangen van spontane urine in één of twee perioden van 24 u.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sociale isolatie. Metabole kooi kan het tactiele contact voor beperkte duur belemmeren, maar het olfactorische, visuele en auditieve contact blijft aanwezig. Onder drempelwaarde als periode kort is (metabole kooi ≤ 24 u.)</li> <li>• Indien langer dan 24 u. kan de beoordeling LICHT zijn.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bevordering van visueel, olfactief, auditief of beperkt tactiel (neus) contact met soortgenoten.</li> <li>• Frequent contact met de mens (niet alleen observaties/procedures, maar interactie/speeltijd) of observatie/behandeling (indien gebaseerd op diergeneeskundige redenen).</li> <li>• Verrijkmateriaal dat de resultaten niet beïnvloedt.</li> </ul>	<p>N.v.t.</p>

*Initiële analyse van de ernst van het ongerief vooraf.* Dier zal naar verwachting slechts LICHT ongerief ondervinden, op basis van beperkte voedselonthouding/waterrestrictie, beperkte individuele huisvesting, eenmalige dosering en herhaalde bloedafname. Van de teststof worden geen of slechts zeer beperkte effecten verwacht, aangezien de niveaus als farmacologisch worden beschouwd.

Bijgevolg moet de ernst van het ongerief vooraf worden ingedeeld als **LICHT**

Zou het ongerief **MATIG** kunnen zijn?

Eenmalige toediening van de teststof en frequente bloedafname bij de hond wordt als LICHT aangemerkt op basis van karakter/gedrag (sociale interactie met mensen) van de soort, methode voor inbedwanghouding, en toedienings- en afnametechniek/volumes volgens goed vakmanschap. MATIG ongerief lijkt vooraf onwaarschijnlijk, gezien het gebruik van niet-toxische maar farmacologische doses, maar zou kunnen worden veroorzaakt door onverwachte effecten van de teststof (of het medium) of mogelijke complicaties bij toediening en afname.

*Klinische observaties.* Diergeneeskundige onderzoeken worden uitgevoerd voor aanvang van het onderzoek (bij aankomst van de leverancier of op periodieke intervallen in voorraad) om een goede gezondheid en geschiktheid voor (her)gebruik van het dier voor de procedure te waarborgen. Lichaamsgewicht wordt gemeten voorafgaand aan elke doseringsperiode. Indien noodzakelijk geacht, kunnen gedurende het onderzoek diergeneeskundige onderzoeken worden uitgevoerd. Gedurende de onderzoeksperiode worden de dieren ten minste tweemaal per dag gemonitord op mortaliteit/viabiliteit, en tijdens toediening en in de follow-upperiode minimaal eenmaal per dag op klinische symptomen.<sup>12</sup>

Ongeriefbeoordeling vindt plaats aan de hand van een combinatie van algemene klinische observaties (lichaamsgewicht, voorkomen, gedrag, kooi-omgeving) op basis van een klinisch scoringsysteem gebruikt in de toxicologie. Van geobserveerde symptomen worden tijdstip van aanvang, ernst van het ongerief en duur geregistreerd. Symptomen worden beoordeeld op ernst, waarbij de hoogste beoordeling op 3 of 4 is gesteld. Beoordelingen die kunnen worden gegeven zijn 'licht' (1), 'matig' (2), 'ernstig' (3) en 'zeer ernstig' (4). Voor bepaalde symptomen wordt alleen aangegeven of ze aanwezig (score 1) of afwezig (score 0) zijn.



### Voorbeeld van klinische scores in dier 3:

Periode:	1				2				3				4			
Datum:	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
Lichaamsgewicht (kg)	10,7	-	-	-	10,5	-	-	-	10,6	-	-	-	10,6	-	-	-
Loopsheid (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-

### Voorbeeld van klinische scores in dier 3:

Periode:	1				2				3				4			
Datum:	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
Lichaamsgewicht (kg)	10,3	-	-	-	10,0	-	-	-	10,0	-	-	-	9,9	-	-	-
Lusteloosheid (0-3)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-
Speekselproductie (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	-
Braken (van voedsel) (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-
Braken van slijm (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Tachypneu (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-
Tremor (0-3)	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	-
Spiertrekkingen (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-
Gebogen houding (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-
Abnormale houding (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-
Rustpositie op buikzij (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-
Abnormale gang (0-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	-
Slijm in de ontlasting (0-1)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Rode deeltjes in de ontlasting (0-1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Hyperthermie (0-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-

### Beoordeling van het werkelijk ondervonden ongerief in de drie voorbeelden

Cumulatief over de vier toedieningsperiodes werden bij de beoordeling van het werkelijke ongerief twee dieren aangemerkt als **LICHT**; één dier werd over alle vier de toedieningsperiodes aangemerkt als **MATIG**.

### Acties

Aangezien klinische symptomen zich gewoonlijk direct na (IV) en/of op de eerste dag na toediening (PO) voordoen, kan zorgvuldiger monitoring bij onverwachte matige tot ernstige negatieve effecten essentieel zijn, indien nodig ondersteund door diergeneeskundig advies, melding aan de vergunningverlener vóór voortzetting, en eventuele interventies, zoals het op humane wijze doden als humane eindpunten zijn bereikt.<sup>13</sup> Als in het eerste dier ernstige negatieve gevolgen worden geconstateerd, wordt een gespreide start (een tijdsinterval tussen eerste en tweede dier, of tussen elk dier, waarbij rekening wordt gehouden met de verwachte duur van mogelijke klinische symptomen) en heroverweging van de dosering als een goede werkwijze beschouwd. Ook moet rekening worden gehouden met alle mogelijke verschillen tussen geslachten, voorafgaand aan het onderzoek of, indien onbekend, in de onderzoeksopzet (bijv. starten met één dier per geslacht, daarna volgende dieren van beide geslachten).

Na de laatste toediening en observatieperiode worden de honden, in geval van lichte tot matige effecten, uit het onderzoek ontslagen en in voorraad gemonitord tot er geen verdere afwijkingen worden geobserveerd. In geval van gepland hergebruik, moet worden aangetoond dat de algehele gezondheid en het welzijn van het dier

volledig zijn hersteld, voordat gebruik voor een eventueel verder onderzoek wordt overwogen. Deze beoordeling moet in overeenstemming zijn met diergeneeskundig advies en bij voorkeur worden ondersteund door periodieke klinische en laboratoriumonderzoeken. Waar dit op basis van deze bevindingen en bioanalysegegevens (vastgestelde eliminatiehalfwaardetijd) in het onderzoek nodig is, moet tussen twee onderzoeken een passende uitwasperiode worden aangehouden.

## Referenties

1. European Medicines Agency. *Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species*. Report no. EMEA/CVMP/133/99, September 2000. London: European Medicines Agency.
2. European Community (EC). *Annex of the EEC Directive 75/318/EEC, Part 3, section II.G, as amended with a view to the granting of a marketing authorisation for a medicinal product, 3BS11a: "pharmacokinetics and metabolic studies in the safety evaluation of new medicinal products in animals"*.
3. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS). *Health effects test guidelines: metabolism and pharmacokinetics*. Paragraph 870.7485, August 1998. Washington, DC: EPA.
4. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS). *Health effects test guidelines: dermal penetration*. Paragraph 870.7600, August 1998. Washington, DC: EPA.
5. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS). *Residue chemistry test guidelines: nature of the residue – plants, livestock*. Paragraph 860.1300, August 1996. Washington, DC: EPA.
6. ICH Secretariat. *Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies*. ICH S3A, October 1994. Geneva: ICH Secretariat.
7. ICH Secretariat. *Pharmacokinetics: guidance for repeated dose tissue distribution studies*. ICH S3B, October 1994. Geneva: ICH Secretariat.
8. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 417: toxicokinetics. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2010.
9. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 427: percutaneous absorption: in vivo method. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects*. Paris: OECD Publishing, 2004.
10. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 503: metabolism in livestock. In: *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 5: other test guidelines*. Paris: OECD Publishing, 2007.
11. Diehl HK, Hull R, Morton D, et al. *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes*. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 15–23.
12. Fentener van Vlissingen JM, Borrens M, Girod A, et al. The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. *Lab Anim* 2015; 49: 267–283.
13. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: OECD Publishing, 2000.