



Europese  
Commissie

# Verzorging van dieren

met het oog op meer verantwoorde wetenschap

RICHTLIJN 2010/63/EU  
BETREFFENDE DE BESCHERMING VAN DIEREN DIE VOOR  
WETENSCHAPPELIJKE DOELEINDEN WORDEN GEBRUIKT



**ERNSTBEOORDELINGSKADER**

## **Inhoud**

Werkdocument inzake een ernstbeoordelingskader..... 1-19

Voorbeelden ter illustratie van de indeling naar ernst, ..... 21-89  
dagelijkse beoordeling en beoordeling van de werkelijke ernst

**Nationale bevoegde instanties voor de uitvoering van Richtlijn 2010/63/EU  
betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke  
doeleinden worden gebruikt.**

**Werkdocument inzake een ernstbeoordelingskader**

Brussel, 11-12 juli 2012

Om de uitvoering van Richtlijn 2010/63/EU betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt te vereenvoudigen, stelde de Commissie een werkgroep van deskundigen samen die de ernst van procedures moest gaan beoordelen. Alle lidstaten en voornaamste belanghebbende organisaties werden uitgenodigd om deskundigen voor te dragen die ingeschakeld zouden worden bij de werkzaamheden.

De werkgroep van deskundigen kwam tweemaal bijeen: in december 2011 lag het accent op genetisch gemodificeerde dieren, en in mei 2012 werd van gedachten gewisseld over een algemeen kader voor het beoordelen van de werkelijke ernst die door dieren in procedures wordt ondervonden.

Dit document is het resultaat van de twee werkgroepbijeenkomsten, discussies met de lidstaten en juridische input van de Commissie inzake de interpretatie van een ernstbeoordelingskader, de onderdelen ervan, deelnemers en instrumenten en methoden. Het document is goedgekeurd door de nationale bevoegde instanties voor de tenuitvoerlegging van Richtlijn 2010/63/EU tijdens hun bijeenkomst van 11-12 juli 2012.

**Disclaimer:**

**Dit document fungeert als leidraad voor de lidstaten en anderen op wie deze richtlijn van toepassing is om te komen tot een gemeenschappelijke interpretatie van de bepalingen in de richtlijn. Alle opmerkingen moeten worden beschouwd in de context van Richtlijn 2010/63/EU betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt.**

**Slechts het Hof van Justitie van de Europese Unie is bevoegd om EU-recht op wettelijk bindende wijze uit te leggen.**

## Inhoudsopgave

De betreffende artikelen van Richtlijn 2010/63/EU .....	3
Algemene achtergrond .....	3
Algemene overwegingen voor een ernstbeoordeling.....	4
Overwegingen voorafgaand aan het onderzoek.....	5
Ernstindicatoren .....	6
Hoofdcategorieën .....	6
Factoren die in aanmerking moeten worden genomen bij de beoordeling van de werkelijke ernst.....	7
Bewerkstelligen van consistentie bij de beoordeling van en indeling naar werkelijke ernst.....	9
Opstellen van een procedurespecifiek beoordelingsverslag.....	10
Consistentie bij de beoordeling van de werkelijke ernst.....	10
Wie moet input leveren voor de beoordeling van de werkelijke ernst?.....	11
Monitoringinstrumenten, media en andere overwegingen.....	12
<b>Bijlage I</b> Verklarende woordenlijst van klinische observaties .....	14
<b>Bijlage II</b> Achtergrondliteratuur, richtlijnen en online hulpbronnen betreffende de beoordeling van het welzijn van dieren die wetenschappelijke procedures ondergaan.....	17

## De betreffende artikelen van Richtlijn 2010/63/EU

- **Artikel 4, lid 3** “De lidstaten dragen er zorg voor dat het fokken, de huisvesting en de verzorging alsook de in procedures gebruikte methoden worden verfijnd teneinde elke vorm van pijn, lijden, angst en blijvende schade die de dieren kunnen ondervinden, te voorkomen of tot het minimum te beperken.”
- **Artikel 15, lid 1** “De lidstaten dragen er zorg voor dat alle procedures per geval worden ingedeeld als “terminaal”, “licht”, “matig”, of “ernstig” op basis van de indelingscriteria van bijlage VIII.”
- **Artikel 16, lid 1, onder d)** “de handeling is in overeenstemming met diergeneeskundig advies waarbij rekening wordt gehouden met de volledige levensloop van het dier.”
- **Artikel 54, lid 2** “De lidstaten verzamelen jaarlijks statistische gegevens over het gebruik van dieren in procedures en maken deze openbaar, met inbegrip van gegevens over de werkelijke ernst van de procedures en over de herkomst van de in procedures gebruikte niet-menselijke primaten en de soorten waartoe deze behoren....”

## Algemene achtergrond

Richtlijn 2010/63/EU betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt vereist dat de ernst van elke procedure in een project vooraf wordt beoordeeld (artikel 15) en dat de ernst van procedures wordt ingedeeld als “terminaal”, “licht”, “matig” of “ernstig”. Bijlage VIII geeft tekst en uitleg over de factoren waarmee rekening moet worden gehouden bij de ernstbeoordeling vooraf en geeft een aantal voorbeelden in elke ernstcategorie.

Artikel 54 inzake rapportage vereist dat statistische gegevens over de werkelijke ernst van de pijn, lijden, angst of blijvende schade die door het dier werd ondervonden wordt gerapporteerd (in tegenstelling tot de ernstbeoordeling vooraf, of de voorspelling, ten tijde van de projectevaluatie). Daarnaast zal de werkelijke ernst van eventuele eerdere procedures een belangrijk aspect zijn om te bepalen of een dier in nieuwe procedures kan worden hergebruikt (artikel 16).

Deze parameters bieden mogelijkheden om de kwaliteit van wetenschap en welzijn te vergroten door projectvoorstellen vooraf te analyseren en meer inzicht te verkrijgen in het effect van wetenschappelijke procedures op het welzijn van dieren door tevens te kijken naar het werkelijke lijden dat door het dier wordt ondervonden.

### **Voornaamste voordelen van het vooraf beoordelen, monitoren, beoordelen en vastleggen van de werkelijke ernst**

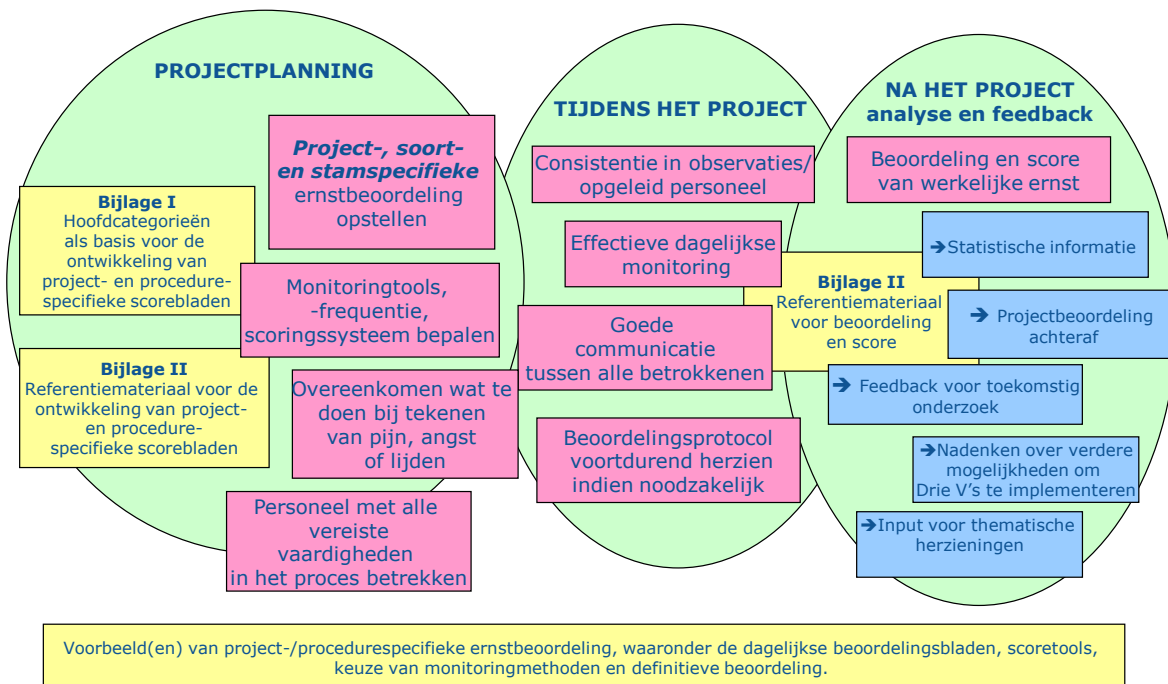
- Met name de mogelijkheid om Verfijning toe te passen en lijden te verminderen, hoewel overleg vooraf doorgaans tevens een mogelijkheid biedt om te bepalen of het gebruik van dieren al dan niet noodzakelijk is (Vervanging) en of de opzet van het onderzoek geschikt is om diergebruik tot een minimum te beperken (Vermindering);
- Beter dierenwelzijn, bijv. als lijden eerder wordt herkend en verzacht;

- Meer transparantie, aangezien statistieken de feitelijke welzijnskosten voor dieren beter zouden moeten weerspiegelen;
- Betere communicatie tussen degenen die verantwoordelijk zijn voor het gebruiken, verzorgen en monitoren van dieren;
- Input voor projectbeoordeling achteraf wanneer deze wordt uitgevoerd (artikel 39);
- Hoogwaardigere wetenschappelijke gegevens dankzij beter welzijn;
- Meer kennis over het beoordelen van ernst en klinische symptomen, hetgeen meer consistentie in de beoordelingen zal bevorderen – op voorwaarde dat benaderingen en resultaten worden verspreid, bijv. via wetenschappelijke tijdschriften, discussiegroepen en bijeenkomsten;
- Input voor trainingen voor onderzoekers, dierwetenschappers en artsen voor proefdieren, als resultaten als voorbeeld worden gebruikt;
- Empirisch onderbouwde informatie die kan worden gebruikt bij schadebatenbeoordelingen vooraf voor vergelijkbare projecten in de toekomst.

### Algemene overwegingen voor een ernstbeoordeling

Het bepalen van de ernst van een procedure moet een **doorlopend proces** zijn dat begint met de initiële onderzoeksopzet en via de onderzoeksspecifieke, dagelijkse monitoring van dieren tijdens het project uitmondt in de beoordeling van de “werkelijke” ernst na afloop van het onderzoek, hetgeen mogelijkheden biedt om verdere verfijningen in kaart te brengen voor toekomstige onderzoeken.

## ERNSTBEOORDELING – EEN DOORLOPEND PROCES



Door deze benadering is de kans groter dat de drie V's gedurende het hele proces in aanmerking genomen en ten uitvoer gelegd worden, dat de communicatie tussen alle betrokkenen wordt verbeterd en dat de consistentie wordt bevorderd.

**Effectieve ernstbeoordeling vereist:**

- een 'teambenadering', met input van mensen met uiteenlopende expertise, ervaring en prioriteiten, bijv. onderzoekers, dierwetenschappers, verzorgend personeel en de dienstdoende dierenarts;
- Goede planning;
- Permanente educatie en opleiding van alle betrokken medewerkers;
- Systemen voor de dagelijkse ernstbeoordeling die afgestemd zijn op de diersoort, de stam en het project, waaronder onderbouwde en overzichtelijke observaties van dieren op gezette tijden (bijv. verhoogde frequentie tijdens en na procedures);
- Goed onderbouwde, doeltreffende protocollen om gedrag en klinische symptomen te beoordelen;
- Analyse van de observaties om een onderbouwd oordeel te vellen over de aard en de mate van het lijden;
- Bewustzijn van de ernst van elke procedure en welke maatregelen moeten worden genomen als deze ernst wordt bereikt of overschreden;
- Een consistente benadering om te komen tot een totaaloordeel van feitelijk lijden (licht, matig, ernstig) voor statistische rapportage;
- Nadenken over hoe doeltreffend de drie V's ten uitvoer zijn gelegd, en of verbeteringen zouden kunnen worden aangebracht voor toekomstige onderzoeken.

<b>Overwegingen voorafgaand aan het onderzoek</b>
---

Het proces om de ernst tijdens wetenschappelijke procedures tot een minimum te beperken begint in de **onderzoeksopzetfase**, wanneer wordt nagegaan of het al dan niet noodzakelijk en gerechtvaardigd is om levende dieren te gebruiken om de wetenschappelijke doelen te verwezenlijken.

- Wanneer het gebruik van levende dieren noodzakelijk en gerechtvaardigd is, is het van belang een passend model te kiezen en te zorgen voor een degelijke onderzoeksopzet;
- Alle aspecten van het onderzoek die pijn, lijden, angst of blijvende schade kunnen veroorzaken moeten in kaart worden gebracht, en nagegaan moet worden hoe de effecten tot een minimum kunnen worden beperkt, bijvoorbeeld door indien nodig literatuur, collega's, dierwetenschappers, de dierenarts en de instantie voor dierenwelzijn te raadplegen;
- De aanbevolen indeling naar ernst van procedures moet worden gebaseerd op de hoogste ernst die wordt verwacht voor elk proefdier;
- Een passend, onderzoeksspecifiek plan voor de observatie van de dieren moet worden ontwikkeld. Gestandaardiseerde terminologie die begrijpelijk is voor alle bij het

onderzoek betrokken partijen zal de consistentie van de rapportage en interpretatie ten goede komen;

- Het is van belang dat er voldoende opgeleide en deskundige medewerkers voorhanden zijn om het onderzoek uit te voeren en toe te zien op het welzijn van de dieren.

## **Ernstindicatoren**

De ernst van procedures kan aan de ‘kooizijde’ (of tank, hok) worden beoordeeld door gedragingen en klinische symptomen te observeren. De terminologie die wordt gebruikt om deze gedragingen/symptomen mee aan te duiden moet begrijpelijk zijn voor iedereen die betrokken is bij het gebruiken, monitoren en verzorgen van de dieren. Voor elk ernstbeoordelingssysteem is een grondig inzicht in de normale gezondheids- en welzijnstoestand van de geobserveerde diersoort (of stam in voorkomend geval) van cruciaal belang.

Het doel moet zijn om:

- de best mogelijke levenskwaliteit voor het dier te bewerkstelligen;
- ervoor te zorgen dat eventueel lijden als gevolg van de wetenschappelijke procedure wordt herkend en
- tot een minimum wordt beperkt, zonder

de wetenschappelijke doelstellingen uit het oog te verliezen.

Elk beoordelingssysteem moet een abnormale gezondheids- en welzijnstoestand doeltreffend opsporen, waardoor de waarnemer een duidelijke en consistente beoordeling van elk dier kan vastleggen en overdragen.

Een eenvoudige, hiërarchische benadering kan worden gebruikt om een ernstbeoordelingsprotocol vast te stellen dat naar behoren afgestemd is op de soort, stam, afzonderlijke dieren en procedure. Bij het opstellen van een protocol voor de beoordeling aan de kooizijde moeten eventuele nadelige gevolgen van onder meer huisvesten, houden, verzorgen en hanteren in kaart worden gebracht die zich gedurende de levensduur van het dier kunnen voordoen, evenals nadelige gevolgen van de wetenschappelijke procedures en de consequenties ervan. De inventarisatie van al deze nadelige gevolgen moet indicatoren opleveren die kunnen worden gebruikt om het welzijn van het dier aan de kooizijde doeltreffend te beoordelen. Deze indicatoren moeten afgestemd zijn op de soort, stam en experimentele procedures die worden toegepast. Ook moeten ze eenvoudig te begrijpen, in kaart te brengen en vast te leggen zijn. Het is echter eveneens van belang onverwachte negatieve gevolgen vast te leggen, bijvoorbeeld in de vorm van losse aantekeningen.

### ***Hoofdcategorieën***

Hieronder volgt een opsomming van overkoepelende hoofdcategorieën die van toepassing zijn op alle diersoorten. Deze lijst dient als uitgangspunt voor het opstellen van een omvattende lijst van specifieke indicatoren voor elke procedure of elk dierverzorgingsprogramma. Doel is om een onderzoeksspecifieke lijst met voldoende indicatoren op te stellen teneinde het risico dat tekenen die wijzen op lijden over het hoofd



worden gezien, tot een minimum te beperken zonder een complex systeem te ontwerpen dat nodeloos bureaucratisch en tijdrovend is.

De hoofdcategorieën zijn:

- Voorkomen
- Lichaamsfuncties
- Omgeving
- Gedrag
- Procedurespecifieke indicatoren
- Vrije observaties (andere relevante observaties)

Indicatoren binnen elk van deze categorieën kunnen worden aangepast aan elke diersoort. Ze moeten worden gebruikt om een lijst van observeerbare kenmerken samen te stellen die kan worden beoordeeld door een naar behoren opgeleid persoon, teneinde een oordeel te vellen over de algemene gezondheids- en welzijnstoestand van het dier.

Deze indicatoren moeten worden besproken en geselecteerd in samenspraak met de voor het toezicht op het welzijn van de dieren verantwoordelijke persoon/personen, en indien nodig met de instantie voor dierenwelzijn. Vervolgens moeten ze worden gebruikt om onderzoeksspecifieke registratiesystemen aan de koozijde te ontwikkelen voor dagelijkse observatie, monitoring en beoordeling.

Bijlage I illustreert hoe deze hoofdcategorieën verder kunnen worden onderverdeeld en gebruikt om geschikte observatiecriteria te ontwikkelen, gebruikmakend van een gemeenschappelijke beschrijvende terminologie.

Bijlage II bevat informatie over richtlijnen en online hulpbronnen die van pas kunnen komen bij het ontwikkelen van passende welzijnsbeoordelingen voor dieren die wetenschappelijke procedures ondergaan.

### ***Factoren die in aanmerking moeten worden genomen bij de beoordeling van de werkelijke ernst***

Opgemerkt dient te worden dat al naargelang de specifieke situatie, een aantal elementen de ernst positief of negatief kunnen beïnvloeden, en verschillen tussen diersoorten moeten in ogenschouw worden genomen.

De werkelijke ernst moet per geval worden beoordeeld, gebruikmakend van de tijdens dagelijkse monitoring verrichte observaties van de dieren. Aanvullende parameters die vereist zijn voor onderzoeksdoeleinden kunnen indien van toepassing en voorhanden eveneens worden gebruikt. Niet-observeerbare indicatoren (zoals lichaamstemperatuur, biochemische parameters of biotelemetriegegevens zoals hartritme) zijn mogelijk ook noodzakelijk voor het onderzoek en moeten in aanmerking worden genomen bij de beoordeling van de ernst als ze aanvullende, relevante informatie kunnen opleveren.

De voor het afzonderlijke dier te rapporteren werkelijke ernst moet het hoogste ernstniveau zijn dat gedurende de procedure wordt ervaren, en mag niet gebaseerd zijn op de ernst aan het einde van de procedure. Evenmin moet de evaluatie worden beschouwd als een optelsom,

bijv. een aantal lichte procedures = matige ernst. De werkelijke ernst moet gebaseerd zijn op de algehele beoordeling van hoe het dier de procedure van begin tot eind ervaart.

De lijst hieronder illustreert het soort elementen dat in overweging moet worden genomen bij het beoordelen van de werkelijke ernst.

#### Procedure, techniek

- Operatief/niet-operatief;
- Frequentie en duur van in bedwang houden;
- Onthouden van analgesie/anesthesie wanneer een of beide anders noodzakelijk zou zijn;
- Nieuw model of nieuwe procedure;
- Omgevingselementen (waaronder huisvesting en beperking van voedsel-/waterinname);
- Stress/angst;
- Herhaalde procedures en intervallen daartussen (ook kijken naar noodzaak om frequentie en combinatie van interventies “onder de drempelwaarde”);
- Hergebruik of aanhoudend gebruik.

#### Soort, stam, ontwikkelingsfase, eerdere ervaring

- **Dit moet een voornaam aandachtspunt zijn – het is zaak de biologie en het gedrag van de diersoort en stam (en soms het afzonderlijke dier) te begrijpen om de ernst doeltreffend te kunnen voorspellen en beoordelen;**
- **Diersoort en stam;**
- Herkomst van het dier, bijv. speciaal gefokt, verwilderd of wild;
- Gebruik (incl. eerdere huisvestingsomstandigheden) en transport;
- Genotype, fenotype, geslacht, leeftijd, immuunsysteem;
- Natuurlijk gedrag en biologie (bijv. het relatieve belang van verschillende zintuigen, zoals gezichtsvermogen voor primaten en reuk voor knaagdieren, en hoe deze kunnen worden aangetast in een laboratoriumomgeving);
- Individuele/collectieve huisvesting – rechtvaardiging om sociale dieren afzonderlijk te huisvesten, of om ze op korte of lange termijn te scheiden van bestaande groepen;
- Dagritme, bijv. effect van het overdag doorvoeren van wetenschappelijke procedures of houderijpraktijken op nachtdieren;
- Scheiding van de moeder bij alle diersoorten, waaronder knaagdieren;
- Cognitieve vermogens, bewustzijn, geheugen, perceptie van gevolgen van procedures.

#### Frequentie, intensiteit

- Er is geen direct verband tussen frequentie en ernst, d.w.z. toegenomen frequentie hoeft niet per se te leiden tot grotere ernst. Dit komt omdat het effect op ernst van zich herhalende procedures of technieken afhangt van een aantal factoren, zoals de intensiteit van elke interventie, de duur ervan, de diersoort en de ervaring van het dier;

- Wanneer interventies zich herhalen, kan gewenning optreden, hetgeen de ernst kan verminderen, bijv. bij een niet-menselijke primate die lichte procedures ondergaat. Daarentegen kan herhaling de ernst ook vergroten, bijv. door anticipatie van een stressvolle procedure, of het ontstaan van hyperalgesie als sprake is van operatieve ingreep;
- Verbeterpotentieel via training, of ‘beloningen’ na procedures;
- Het hoogste ernstniveau moet worden geregistreerd in plaats van de ernst op ‘herstelniveau’.

#### Duur van effect

- Duur is *gekoppeld* aan intensiteit (*en dus aan ernst*);
- Of het mogelijk is menselijke of wetenschappelijke eindpunten te gebruiken.

#### Doeltreffendheid van verfijningen

- Passende analgesie, anesthesie en postoperatieve zorg;
- Verrijking – zowel verrijking van de omgeving als groepshuisvesting van sociale dieren;
- Huisvesting, dierhouderij en verzorging – of het mogelijk is deze te verfijnen al naargelang beste praktijken, of in hoeverre de procedure beperkingen vereist, zoals opsluiting in kleinere leefruimten (bijv. metabolismekooien), gaas of blootstelling aan omgevingsomstandigheden die stress zouden kunnen veroorzaken;
- Het dier trainen om mee te werken, of gewenning aan procedures vergemakkelijken;
- Doeltreffendheid van beoordelingsprotocollen aan de kooizijde.

#### Cumulatieve ernst

- Bij een procedure die gepaard gaat met een aantal stappen/interventies moet rekening worden gehouden met de volledige levensloop van elk dier, waarbij beperkingen aan het vermogen om huisvesting te verfijnen, of de noodzaak van veelvuldig vangen en in bedwang houden etc. van invloed kunnen zijn op de ernst;
- Eerdere procedures, in het geval van hergebruik;
- Bij hergebruik moet rekening worden gehouden met de volledige levensloop, waaronder aspecten zoals herkomst (bijv. vroeg spenen) en transport.

### **Bewerkstelligen van consistentie bij de beoordeling van en indeling naar werkelijke ernst**

In de onderzoeksopzetfase is input door ter zake deskundige wetenschappers, dierwetenschappers, dierenartsen en verzorgend personeel doorgaans nodig om ervoor te zorgen dat passende gegevens voorhanden zijn waarop een onderbouwde beslissing over de werkelijke ernst aan het einde van de procedure kan worden gebaseerd. De uiteindelijke indeling naar werkelijke ernst berust op een analyse aan de kooizijde van vastgelegde observaties van gedrag, klinische symptomen en andere relevante parameters.

Elementen die bijdragen aan de consistentie zijn onder meer:

- Opneming van meerdere specialismen, ervaring en prioriteiten – een ‘teambenadering’;
- Voorlichting over het gebruik van het dagelijkse beoordelingsprotocol (waaronder de gemeenschappelijke terminologie die wordt gebruikt om observaties te beschrijven);
- Expertise inzake gezondheid, welzijn en gedrag van dieren;
- Regelmatige analyse van uitkomsten;
- Communicatie tussen alle verantwoordelijken voor het uitvoeren van het onderzoek en het monitoren van de dieren (top-down, bottom-up, tussen en binnen instellingen);
- Toezicht (op lokaal (bijv. de instantie voor dierenwelzijn), regionaal, nationaal en EU-niveau).

De volgende zaken zijn van belang om consistentie te waarborgen bij de beoordeling van werkelijke ernst:

### ***Opstellen van een procedurespecifiek beoordelingsverslag***

- Op de diersoort, stam en studie afgestemde beoordelingsverslagen moeten voor aanvang van het project worden ontwikkeld en overeengekomen;
- Bij het opstellen van onderzoeksspecifieke beoordelingsverslagen moet alle beschikbare, relevante informatie worden gebruikt, zoals eerdere ervaringen, resultaten van in-vitro- of in-silicostudies, literatuuronderzoek, bevindingen van pilotstudies en bij mensen of andere dieren geobserveerde klinische symptomen;
- Informatie over de te observeren parameters en de uit te voeren monitoring moet beschikbaar zijn aan de koozijde;
- De van tevoren uitgevoerde indeling naar ernst zal deels bepalen welke mate van betrokkenheid nodig is op operationeel niveau, of een teambenadering vereist is gedurende de monitoring en wie betrokken moet worden bij de feitelijke observaties en registratie. Degenen die het onderzoeksspecifieke beoordelingsprotocol hebben ontwikkeld moeten de uiteindelijke indeling naar werkelijke ernst uitvoeren en/of bevestigen;
- Al naargelang de complexiteit van het onderzoek kunnen aparte beoordelingsverslagen voor aparte componenten van pas komen, bijv. standaardbladen voor chirurgie/perioperatieve zorg in combinatie met een specifieke beoordeling van het onderzoeksprotocol;
- In sommige gevallen moeten de onderzoeksspecifieke beoordelingsverslagen ook informatie bevatten over populatiebeheer, bijv. data over de voortplanting en groei van genetisch gemanipuleerde dieren.

### ***Consistentie bij de beoordeling van de werkelijke ernst***

De werkelijke ernst wordt beoordeeld aan het einde van de procedure en daartoe moet worden ingeschat hoe ernstig het lijden is dat het dier werkelijk ondervindt, op basis van dagelijkse beoordelingen en rekening houdend met de uitgevoerde procedures.

- Een veel gehanteerde benadering is om “lichte”, “matige” en “ernstige” niveaus vast te stellen voor elk van de indicatoren die worden gebruikt bij de dagelijkse beoordelingen, en vervolgens per geval de ernst van deze indicatoren te beoordelen.
- **Evenals bij de dagelijkse monitoring is het cruciaal dat de feitelijke beoordelingscriteria afgestemd zijn op de procedure, diersoort en stam;** bijv. 10 % verlies van lichaamsgewicht zal heel verschillende uitwerkingen hebben op de gezondheid en het welzijn van een jonge rat in de groei, een volwassen muis met een snel groeiende tumor, of een volwassen hond.
- Het tijdsinterval waarbinnen enkele van deze indicatoren zich voordoen is ook een cruciale factor, met name ten aanzien van gewichtsverlies en voedsel-/waterconsumptie.

Een beoordeling vindt plaats aan de hand van de dagelijkse beoordelingsverslagen, rekening houdend met de procedure die wordt verricht op het dier, hoe lang nadelige effecten aanhielden en of het dier al dan niet is hergebruikt. Hoewel dit onvermijdelijk een bepaalde mate van subjectiviteit met zich meebrengt, moet een passende training van de waarnemer erop gericht zijn dergelijke subjectiviteit te verminderen.

#### Werkelijke ernst beoordelen als dieren dood worden aangetroffen

- Als een dier dood wordt aangetroffen, d.w.z. niet geëuthanaseerd, kan dit ofwel het gevolg zijn van de experimentele procedure of andere, ongerelateerde oorzaken<sup>1</sup>;
- De werkelijke ernst 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 de werkelijke ernst de bekende ervaring voorafgaand aan de dood weerspiegelen. Factoren zoals frequentie van monitoring, gebruik van analgesie, etc. moeten naar behoren in aanmerking worden genomen;
- “(blijvende) schade” kan alleen worden ondervonden door een levend dier.

Voorbeelden ter illustratie van de indeling naar ernst, dagelijkse beoordeling en een definitieve beoordeling van de werkelijke ernst moeten worden ontwikkeld en beschikbaar gesteld aan de wetenschappelijke wereld.

#### **Wie moet input leveren voor de beoordeling van de werkelijke ernst?**

- Observatie en registratie van effecten zijn vaak processen die losstaan van de indeling naar werkelijke ernst;

<sup>1</sup> Ten behoeve van statistische rapportage moet werkelijke ernst voornamelijk gekoppeld zijn aan de ernst van de experimentele procedures en niet aan ongerelateerde incidenten zoals uitbraken van ziekten of overstroming van kooien. Dit soort incidenten hangt samen met gezondheidsproblemen of met houderij- en verzorgingspraktijken, niet met schade als gevolg van procedures; deze incidenten moeten echter vastgelegd en nader onderzocht worden om herhaling te voorkomen.

- Het is zaak heldere verantwoordelijkheden toe te kennen om ervoor te zorgen dat de dagelijkse monitoring van de dieren doeltreffend is, met passende ondersteuning en toezicht;
- Een verificatieproces moet voorhanden zijn om consistentie te bevorderen, bijv. door het vergelijken van door verschillende mensen toegekende beoordelingsscores;
- Taken die samenhangen met het observeren en monitoren van dieren en het beoordelen van de werkelijke ernst moeten flexibel en aanpasbaar zijn op basis van de complexiteit en ernst van het betreffende onderzoek – hoewel de wettelijke aansprakelijkheid om ervoor te zorgen dat lijden wordt opgespoord en tot een minimum wordt beperkt, blijft berusten bij de persoon die is genoemd in de projectvergunning;
- Instanties voor dierenwelzijn moeten op inrichtingsniveau eveneens een rol spelen om te zorgen voor consistentie;
- De nationale comités en bevoegde instanties kunnen ook bijdragen aan het bevorderen van de consistentie.

### **Monitoringinstrumenten, media en andere overwegingen**

- In de projectplanningsfase moet rekening worden gehouden met het gebruik van ‘scorebladen’;
- Scorebladen moeten zo eenvoudig mogelijk zijn, maar zo gedetailleerd als noodzakelijk, en afgestemd op het type onderzoek;
- Eerder opgestelde beoordelingsverslagen kunnen worden gebruikt als deze geschikt zijn voor het onderzoek, de diersoort en de stam;
- Elektronische registratie kan consistentie en eenvoudige toegang tot alle relevante informatie bevorderen;
- Het gebruik van gestandaardiseerde taal en terminologie wordt aanbevolen;
- De geregistreerde gegevens moeten zo objectief mogelijk zijn;
- De voor- en nadelen van (i) cijfermatige scores en (ii) binaire observatiesystemen (waarbij indicatoren worden gemarkeerd als ‘aanwezig’ of ‘afwezig’) moeten per geval worden overwogen;
- Alle soorten observatiebestanden moeten een faciliteit bevatten om losse tekst en vooraf bepaalde indicatoren toe te voegen, zodat onverwachte observaties kunnen worden vastgelegd;
- Doeltreffende training voor alle relevante werknemers is van essentieel belang en moet in het bijzonder gericht zijn op het beoordelen van ernst en welzijn, alsmede op monitoringmethoden;
- Er moet een communicatieplan worden opgesteld voor alle relevante werknemers; dit moet voorzien in een mechanisme om onverwachte uitkomsten snel te communiceren aan alle betrokken personen en, indien van toepassing, aan de bevoegde instantie;

- Monitoring moet evenredig zijn aan beoogde effecten – procedures die mogelijk ‘ernstig’ lijden veroorzaken zullen doorgaans frequentere en meer gedetailleerde monitoring vereisen;
- Er moeten duidelijke criteria worden opgesteld voor interventie, bijvoorbeeld als specifieke parameters worden geobserveerd of als een vooraf vastgesteld niveau van lijden wordt benaderd. Alle betreffende werknemers moeten weten wat deze criteria zijn, weten wat te doen en met wie ze contact moeten opnemen mochten deze criteria zich voordoen.

**Als de ernstbeoordeling doeltreffend wordt uitgevoerd, zullen de dieren en al het personeel dat betrokken is bij hun verzorging en gebruik profiteren van beter dierenwelzijn, wetenschappelijke validiteit en transparantie.**

**Goede interne en externe communicatie over de ernstbeoordelingsprocedure en over de toepassing van de drie V's zal nog bredere voordelen met zich meebrengen.**

## Bijlage I

### Verklarende woordenlijst van klinische observaties

Het succes van een ernstbeoordelingssysteem hangt af van de selectie van welzijnsindicatoren die:

- eenvoudig, betrouwbaar en herkenbaar zijn;
- een goed beeld geven van het welzijn van de dieren;
- relevant zijn voor het wetenschappelijk onderzoek, de diersoort en de stam (indien van toepassing);
- praktisch uitvoerbaar zijn en het dier niet al te zeer verstoren; en
- op consistente wijze kunnen worden gemeten, geïnterpreteerd en geanalyseerd.

Een gemeenschappelijke registratie van klinische observaties is dan ook wenselijk, aangezien dit zal bijdragen tot de ontwikkeling van consistente ernstcategorieën. Dit zou onderlinge vergelijkingen van klinische studieresultaten vereenvoudigen, en degenen die betrokken zijn bij de ernstbeoordeling houvast bieden.

De observaties worden ingedeeld in de onderstaande zes hoofdcategorieën:

#### Voorkomen/lichaamsfuncties/omgeving/gedragingen/procedurespecifieke indicatoren/vrije observaties

Hoofdcategorieën	Aandachtsgebieden bij het observeren van dieren	Indicatoren waar specifiek op gelet moet worden
Voorkomen	Lichamelijke conditie	Gewichtsverlies/-toename
		Zwaarlijvig
		Dun
		Body Condition Score, indien voorhanden
	Vacht en huid	Pilo-erectie
		Onverzorgd
Vettige vacht		



		Haarverlies
		Uitdroging – staande huidplooi
		Huidaandoeningen – zwelling; schurfft; zweer; laesie/wond
		Ontlastings- of urinevlekken
	<b>Uitscheiding</b>	Oog; neus; urogenitaal; porfyrievlekken bij sommige diersoorten, bijv. ratten
	<b>Ogen</b>	Verzonken of ‘dof’
		Gesloten/half gesloten
		Schade/letsel aan oog (bijv. ulceratie van hoornvlies)
	<b>Mond</b>	Speekselproductie
		Beetanomalie/overbeet
	<b>Overige</b>	‘Pijngesicht’ – bijv. half gesloten ogen en gezwollen neus bij muizen
		Samentrekken van de buik
		Gezwollen lichaamsdeel, bijv. uitgerekte maag
<b>Lichaamsfuncties</b>	<b>Ademhaling</b>	Versnelde ademhaling (tachypneu)
		Zware ademhaling (hyperpneu)
		Zeer zware ademhaling (dyspneu)
		Piepen of ander geluid bij het ademen
	<b>Voedsel/-waterconsumptie</b>	Toegenomen/afgenomen
	<b>Lichaamstemperatuur</b>	Toegenomen/afgenomen; gemeten lichaamstemperatuur is voorhanden (bijv. via microchip of telemetrieapparaat, contact- of niet-contactthermometer; kleur van extremiteiten bij knaagdieren)
<b>Zintuigen</b>	Aangetast gezichtsvermogen, gehoor of evenwicht	
<b>Omgeving</b>	<b>Leefruimte, waaronder strooisel, nestmateriaal, verrijgingsvoorwerpen</b>	Aanwezigheid en consistentie van uitwerpselen
		Nat ligstro, bijv. door polyurie
		Aanwezigheid van braaksel of bloed
		Of het dier verrijgingsvoorwerpen gebruikt, bijv. nestmateriaal, kauwblokken

<b>Gedrag</b>	<b>Sociale interactie</b>	Verandering van normale temperament – gespannen/agressieve interacties met andere dieren; angst (bijv. duidelijke vluchtreacties, verstoppert)
		Geïsoleerd of teruggetrokken van andere dieren in sociale groep
	<b>Onwenselijk gedrag</b>	Herhaald/stereotiep gedrag
		Barberen (knaagdieren), trichotillomanie
		Toegenomen agressie jegens mensen of andere dieren
	<b>Houding en mobiliteit</b>	Abnormale houding
		Abnormale gang; lamheid; gebrek aan beweging/lusteloosheid/weigering om te bewegen indien hiertoe gestimuleerd
		Ongecoördineerde bewegingen
		Opgebolde maagstreek; scheve kop
	<b>Overige</b>	Tremoren
Epileptische aanvallen/stuiprekkingen		
Vocalisatie; spontaan of opgeroepen. <i>NB: sommige diersoorten, bijv. knaagdieren, vocaliseren doorgaans in het ultrasone bereik, dus moet met name op hoorbare vocalisaties worden gelet. Vocalisaties bij konijnen zijn doorgaans onhoorbaar, tenzij het dier angstig is).</i>		
<b>Procedurespecifieke indicatoren</b>	Deze worden bepaald op basis van het afzonderlijke project, de potentiële nadelige gevolgen hiervan en de hiervoor verwachte symptomen	In een EAE-model kan dit omvatten: verlies van staarttonus, zwakke achterpoten, zwakke voorpoten, verlamming, verlies van blaasfunctie
<b>Vrije observaties</b>	Een ernstbeoordelingssysteem moet altijd voorzien in de mogelijkheid om eventuele observaties van onverwachte negatieve welzijnseffecten te noteren.	

## Bijlage II

### Achtergrondliteratuur, richtlijnen en online hulpbronnen betreffende de beoordeling van het welzijn van dieren die wetenschappelijke procedures ondergaan

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006) *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits*, te downloaden via <http://www.tinyurl.com/65ez5vh>

Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals (AHWLA) training resource. Zie <http://www.ahwla.org.uk/index.html>

Canadian Council on Animal Care (CCAC) *Welfare assessment*. Zie <http://www.ccac.ca/> en klik op de microsite Three Rs, en zoek vervolgens op 'welfare assessment' (Engels of Frans)

*Categorising the severity of scientific procedures on animals – Summary and reports from three round-table discussions*, uitgegeven door Jane A. Smith en Maggy Jennings namens de Boyd Group en de RSPCA, juli 2004

Gepubliceerd door RSPCA Research Animals Department

FELASA Working Group on the Reporting of Clinical Signs in Laboratory Animals (2012) – (in druk)

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2008) *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009) *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press. Zie [http://dels.nas.edu/animal\\_pain/](http://dels.nas.edu/animal_pain/)

Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, et al. (2006) Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* **40**: 323-340

Joint Working Group on Refinement (2011) A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals. *Laboratory Animals* **45**: 1-13

Leach MC et al. (2008) Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. *Animal Welfare* **17**: 161-170

National Centre for the Three Rs (NC3Rs) *Welfare assessment*. Zie <http://www.nc3rs.org.uk/welfareassessment>

National Health and Medical Research Council (2008) *Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes: The Assessment and Alleviation of Pain and*

*Distress in Research Animals*. Canberra: Australian Government. Zie <http://www.nhmrc.gov.au> en vul als zoekterm “pain and distress” in.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: OECD

Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, et al. Assessing the welfare of genetically altered mice. Volledige versie op <http://www.nc3rs.org.uk/gamice>. Samenvatting in *Laboratory Animals* **40**: 111-114

Workman P et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* **102**: 1555-1577, te downloaden via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/?tool=pubmed>

## 1.2 Aanbevolen tijdschriften

<i>Applied Animal Behaviour Science</i>	<a href="http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html">http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html</a>
<i>Animal Technology and Welfare</i>	<a href="http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm">http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm</a>
<i>Animal Welfare</i>	<a href="http://www.ufaw.org.uk/animal.php">http://www.ufaw.org.uk/animal.php</a>
<i>Contemporary Topics in Laboratory Animal Science</i> en <i>Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	<a href="http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct">http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct</a>
<i>Lab Animal</i> en <i>Lab Animal Europe</i>	<a href="http://www.labanimal.com/laban/index.html">http://www.labanimal.com/laban/index.html</a> <a href="http://www.labanimaleurope.eu/">http://www.labanimaleurope.eu/</a>
<i>Laboratory Animals</i>	<a href="http://la.rsmjournals.com/">http://la.rsmjournals.com/</a>

## 1.3 Voorgestelde zoekwoorden voor literatuurstudies

De volgende trefwoorden zijn nuttig bij het zoeken naar informatie over beoordeling van de ernst van procedures

aantasten	schade-batenbeoordeling	positieve indicatoren	ernstschaal
dierenwelzijn	humane eindpunten	positief welzijn	ziektegedrag
dierenleed	behoefte	kwalitatieve gedragsbeoordeling	stress
beoordeling	objectieve beoordeling	levenskwaliteit	lijden

hinder	pijn	verfijning	welzijnsbeoordeling
angst	pijnbeoordeling	scorebladen	welzijnsindicator
schadebeoordeling	pijnmeting	scoresysteem	welzijnsuitkomsten

### Naslagwerken betreffende indeling naar werkelijke ernst

CCAC (1998) *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research, Teaching and Testing*. Canadian Council on Animal Care, beschikbaar op: <http://www.ccac.ca/en/standards/guidelines> (Engels) en [http://www.ccac.ca/fr/normes/lignes\\_directrices](http://www.ccac.ca/fr/normes/lignes_directrices) (Frans)

FELASA Working Group on Pain and Distress (1994) Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory Animals* **28**: 97-112

Jones HRP, Oates J and Trussell BA (1999) An applied approach to the assessment of severity. In: Hendriksen CFM. & Morton DB (eds), *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. Proceedings of the International Conference, 22-25 November 1998, Zeist, The Netherlands. Royal Society for Medicine Press Ltd., London pp 40-47

LASA /APC (2008) *Final Report of a LASA/APC Working Group to Examine the Feasibility of Reporting Data on the Severity of Scientific Procedures on Animals*. Beschikbaar op: <http://www.lasa.co.uk/publications.html>

Morton, DB and Hau J (2011) Chapter 18: Welfare assessment and humane endpoints. In *Handbook of Laboratory Animal Science, 3<sup>rd</sup> Edition, Volume 1 Essential Principles and Practices*. Hau J and Schapiro, SJ (eds), CRC Press LLC, USA, pp 535-572

Prescott MJ, Morton DB, Anderson D, Buckwell A, Heath S, Hubrecht R, Jennings M, Robb D, Ruane B, Swallow J and Thompson P (2004) Refining dog husbandry and care, Eighth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **38 Suppl 1**: S1:1-S1:94

Wolfensohn S and Lloyd M (2003) *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 3<sup>rd</sup> Edition*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (4e editie in voorbereiding)

(Alle URL's voor het laatst bijgewerkt op 24 mei 2012.)



## Voorbeelden ter illustratie van de indeling naar ernst, dagelijkse beoordeling en beoordeling van de werkelijke ernst

Brussel, 11 januari 2013

Het *Werkdocument inzake een ernstbeoordelingskader*, dat is opgesteld door de werkgroep van deskundigen binnen de Europese Commissie en goedgekeurd door de nationale bevoegde instanties voor de tenuitvoerlegging van Richtlijn 2010/63/EU betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt tijdens hun bijeenkomst van juli 2012, bevatte een aanbeveling om voorbeelden te ontwikkelen ter illustratie van de "indeling naar ernst, dagelijkse beoordeling en een definitieve beoordeling van de werkelijke ernst", en deze voorbeelden beschikbaar te stellen van de wetenschappelijke wereld.

Naar aanleiding hiervan heeft de werkgroep van deskundigen een reeks voorbeelden ontwikkeld om te laten zien hoe het in het *werkdocument* beschreven proces zou kunnen worden toegepast op verschillende procedures. De voorbeelden zijn bedoeld om bevoegde instanties, gebruikers, dierwetenschappers, dierenartsen en alle andere relevante medewerkers te helpen ervoor te zorgen dat tijdens procedures pijn, lijden en angst waar mogelijk doeltreffend voorspeld, herkend, verzacht, en consistent beoordeeld worden. Dit document is tijdens hun bijeenkomst van 23-24 januari 2013 goedgekeurd door de nationale bevoegde instanties voor de tenuitvoerlegging van Richtlijn 2010/63/EU.

Het is van cruciaal belang dat een aantal belangrijke factoren in ogenschouw worden genomen bij het gebruik van deze voorbeelden:

- Verondersteld wordt dat gedurende de hele procedure **goede praktijken worden toegepast** wat betreft het huisvesten, houden en verzorgen; verfijningsprocedures; opleiding en training; beoordelingsbevoegdheid; het vinden en toepassen van actuele informatie over vervanging, vermindering en verfijning; en het experimentele ontwerp.

- Het type scorebladen in de voorbeelden dient als **aanvulling op – en niet als vervanging voor – het oordeel van opgeleide, deskundige en empathische medewerkers**. Doel is om een systematischere en objectievere observatie, registratie en beoordeling van lijden mogelijk te maken, maar niet om een vakkundig oordeel in de wind te slaan.
- Elk voorbeeld heeft betrekking op een **denkbeeldige, maar realistische situatie**. Het zou niet passend zijn om alle in de praktijk beschikbare details op te nemen, maar elk voorbeeld bevat voldoende details om **duidelijk te maken hoe het proces werd toegepast**.
- Zoals vermeld in het *werkdocument* is het cruciaal om **na te denken over de ernstbeoordeling en deze af te stemmen** op de diersoort, stam en procedure die in de gebruikende instelling wordt gehanteerd. Om die reden raadt de groep van deskundigen **het ten zeerste af** om de tabellen en scorebladen in de voorbeelden klakkeloos over te nemen, **zelfs voor soortgelijke procedures**. De doeltreffendheid van alle ernstbeoordelingsprotocollen moet regelmatig tegen het licht worden gehouden en waar nodig worden herzien.
- De **voorbeelden moeten ook worden herzien** in het licht van voortschrijdende inzichten over indicatoren van pijn, lijden en angst en naarmate benaderingen voor het beoordelen en indelen van ernst veranderen. Elk voorbeeld is voorzien van een datum; raadpleeg de website van de Europese Commissie [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/interpretation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/interpretation_en.htm) voor updates.
- **Wij ontvangen graag feedback** over de bruikbaarheid van de voorbeelden, evenals suggesties voor toe te voegen procedures; u kunt uw opmerkingen sturen naar [env-laboratory-animals@ec.europa.eu](mailto:env-laboratory-animals@ec.europa.eu)



## Inhoudsopgave:

Model 1 – Onderzoeken naar kanker .....	24
<i>Model 1(a) Instandhouding van menselijke tumorcellijnen bij naakte muizen met een zwak immuunsysteem</i> .....	25
<i>Model 1(b) Werkzaamheid van nieuwe farmaceutische agentia voor het tegengaan van tumorgroei</i> .....	30
Model 2 – Experimentele auto-immune encefalitis (EAE) bij muizen .....	37
Model 3 – Artritis .....	46
Model 4 – Beroerte .....	57
Model 5 – Productie van polyklonale antilichamen bij konijnen .....	70
Model 6 – Productie en instandhouding van genetisch gemodificeerde dieren .....	77
<i>Model - GeneA<sup>tm1a(Funding)Lab</sup></i> .....	79
<i>Model - g(GeneB)<sup>Labcode</sup></i> .....	85
<i>Model - GeneC<sup>tm1a(Funding)Lab</sup></i> .....	87

## **Voorbeelden ter illustratie van de ernstbeoordeling**

### **Model 1 – Onderzoeken naar kanker (1a en 1b)**

Laatst bijgewerkt:05/02/2013

#### **1. Diermodellen in onderzoeken naar kanker (1a en 1b)**

##### **Algemene context: In-vivo-evaluatie van nieuwe kankerbestrijdingsmiddelen**

Kanker is een voornamelijk doodsoorzaak in de ontwikkelde wereld en de vergrijzing zal onvermijdelijk leiden tot een toename van de ziektelast. In 2010 bedroeg de kans dat iemand in de EU voor zijn of haar zeventigste levensjaar overlijdt aan een vorm van kanker ca. 15%. Het is dan ook zaak nieuwe, doeltreffendere geneesmiddelen voor de behandeling van kanker te ontwikkelen. De voordelen hiervan zijn onder meer dat de kankersterfte wordt verminderd en de levenskwaliteit wordt verbeterd voor mensen die in de toekomst kanker ontwikkelen.

Diermodellen worden momenteel gebruikt voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen tegen kanker, in aanvulling op computermodellen en in-vitromethoden zoals celkweektests. Zodra de selectiviteit en activiteit van samenstellingen in vitro is bevestigd, worden uitsluitend samenstellingen met gunstige eigenschappen op dieren getest. Onderzoeken naar verdraagzaamheid worden uitgevoerd met kleine groepen dieren om de maximaal te verdragen dosis (MTD, maximum tolerated dose) en de geschiktheid van de dosering vast te stellen alvorens bredere werkzaamheidsstudies uit te voeren.

De ernst van de gevolgen voor de dieren hangt af van de modellen en het doel van het onderzoek. Het in stand houden van tumorcellijnen zal waarschijnlijk geen significant effect hebben op het dierenwelzijn, mits gedurende de hele procedure goede praktijken in acht worden genomen, waaronder passend toezicht op het dier en in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Daarentegen zullen onderzoeken om nieuwe behandelingen in het kader van metastasemodellen te beoordelen waarschijnlijk significantere gevolgen voor het welzijn van proefdieren hebben door de ontwikkeling van meerdere tumoren en de waarschijnlijke bijwerkingen van cytotoxische geneesmiddelen.

Er is een aantal richtsnoeren gepubliceerd voor het welzijn en gebruik van dieren bij onderzoek naar kanker, bijvoorbeeld in de *British Journal of Cancer* (Workman et al. 2010). Deze bieden een gedetailleerd overzicht van de diverse diertumormodellen die voorhanden zijn, hoe deze van invloed zijn op de dieren en hoe lijden tot een minimum kan worden beperkt.

Hieronder volgen twee voorbeelden ter illustratie van oncologische diermodellen met verschillende indelingen naar ernst.

## **Referentie**

Workman et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* (2010) 102(11), 1555 – 1577; gratis te downloaden op <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/pdf/6605642a.pdf>

### **1 (a) – Instandhouding van menselijke tumorcellijnen bij naakte muizen met een zwak immuunsysteem**

**Er zijn menselijke tumorcellijnen die zich in vitro niet betrouwbaar repliceren, zodat het soms noodzakelijk is om menselijke cellijnen te karakteriseren en in stand te houden in een xenogeen in-vivomodel.**

## **Onderzoeksopzet**

30 naakte BALB/C-mannetjesmuizen krijgen een subcutane injectie op de linkerflank met  $10^3$  HCT 116 suspensie van bloedlichaampjes in 0,1 ml zoutoplossing. Dieren worden groepsgewijs gehuisvest in afzonderlijk geventileerde kooien (IVC's) met strooisel en nestmateriaal. Het welzijn van de dieren wordt dagelijks beoordeeld en de dieren worden om de 4 dagen gewogen. Individuele dieren worden om de twee dagen gepalpeerd om tumoren vast te stellen, en eventueel waarneembare tumoren worden daarnaast om de dag gemeten met behulp van kalibers. Dieren worden op dag 15 geëuthanaseerd om de tumoren te 'oogsten'.

### Initiële beoordeling vooraf en 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 het lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
<b>Instandhouding van muizen met een zwak immuunsysteem</b>	Dieren zijn vatbaar voor infecties	Huisvesting in IVC's en specifieke houderijpraktijken om risico van besmetting tot een minimum te beperken Dieren worden groepsgewijs gehuisvest en milieuverrijking om stress tegen te gaan Houderij en verzorging zullen worden herzien als er tekenen van angst, agressie of abnormaal gedrag worden waargenomen	Dieren die tekenen van slechte gezondheid vertonen zullen worden gedood.
<b>Subcutane injectie van tumorcellen</b>	Tijdelijke hinder na injectie	Injectie slechts eenmalig uitgevoerd Passende hoeveelheid wordt ingespoten (maximaal 0,2ml) Dieren worden onmiddellijk na de injectie nauwlettend in de gaten gehouden	Dieren worden op humane wijze gedood als na de injectie meer dan lichte angst of hinder wordt waargenomen, zonder dat snel herstel optreedt (komt zeer zelden voor)
<b>Groei van tumor</b>	Kan hinder veroorzaken of normaal gedrag of voortbeweging nadelig beïnvloeden Tumor kan geïnfecteerd raken of	Tumorgroei zal om de twee dagen worden gemeten Monitoring omvat zorgvuldige observatie van lichaamshouding,	Het dier zal worden gedood als de tumor verzevert, of normaal gedrag, lichaamshouding of voortbeweging in de weg staat, of

	verzweren (maar mag niet uitzaaien)	gang evenals omvang en toestand van de tumor	een diameter van meer dan 1,2cm heeft (Workman et al. 2010)
--	-------------------------------------	--	---

## Analyse

De verwachting is dat dieren enkel **LICHTE** hinder ondervinden, en ze zullen worden gedood als zich ernstigere gezondheids- of welzijnsproblemen voordoen.

**Bijgevolg moet de ernst vooraf worden ingedeeld als LICHT.**

Een voorbeeld van een ingevuld observatieblad is aan het einde van dit model opgenomen

## Klinische observaties

Een scoreblad werd opgesteld dat zich richtte op tumorgrootte, lichaamsgewicht, houding en gang, omdat weinig andere klinische symptomen werden verwacht. Er werd ruimte gelaten voor het als vrije tekst registreren van onverwachte klinische symptomen. De invoer van NAD (no abnormality detected – geen afwijkingen geconstateerd) bevestigt dat dieren zijn gecontroleerd en dat geen afwijkingen zijn vastgesteld. Een voorbeeld is hieronder te vinden.

## Resultaten

- Bij geen van de dieren werd significant gewichtsverlies geconstateerd.
- Bij 5 dieren werd geen tumorontwikkeling vastgesteld.
- Bij 25 dieren ontwikkelden zich tumoren op de flank. Deze tumoren stonden het normale gedrag niet in de weg en hadden een afmeting van maximaal 1 cm op dag 14, toen dieren overeenkomstig het onderzoeksprotocol werden geëuthanaseerd om de tumoren te 'oogsten'.
- In één kooi deden zich agressief gedrag en vechten voor; één dier had beetwonden op de staart en rug en werd afgezonderd in een individuele kooi; wonden werden dagelijks lokaal gedesinfecteerd tot ze genazen en het dier werd tot aan het einde van de procedure gehouden.

### Beoordeling van werkelijke ernst

- 29 dieren voltooiden het onderzoek met enkel licht lijden dat verband hield met de injectie en groei van tumoren. De werkelijke ernst voor deze dieren werd aangemerkt als **LICHT**; 1 dier had beetwonden die goed werden verzorgd. Bij dit dier was sprake van enig aanvullend lijden dat werd veroorzaakt door agressie, maar dit hield geen verband met de procedure. Met deze incidenten werd doeltreffend omgegaan en het lijden werd tot een minimum beperkt. Hoewel het door het dier ervaren lijden matig was, werd de feitelijke, aan de procedure gerelateerde ernst aangemerkt als **LICHT**, aangezien dit incident geen verband hield met de procedure.

### Voorbeeld van observatieblad (ingevuld voor denkbeeldig geval)

Tumorgroei bij naakte muizen – Procedure- & observatieblad				
Kooi 1 – Muisnummers 1-5				
Datum	Procedure	Tumorgrootte (cm)	Gewicht (g)	Klinische observaties – <b>houding en gang zorgvuldig controleren</b>
28/02	Subcutane injectie		1 – 21 2 – 22 3 – 21 4 – 22 5 – 22	Geen tekenen van welzijnsproblemen na injecties
01/03				Geen abnormaliteit geconstateerd (NAD)
02/03	Palpatie			NAD
03/03				NAD

04/03	Palpatie		1 – 21 2 – 22 3 – 21 4 – 22 5 – 22	NAD
05/03				NAD
06/03	Palpatie			NAD
07/03				Enig agressief gedrag; geen zichtbare wonden
08/03	Tumormeting	1 – 0,1 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – geen tumor 5 – 0,2	1 – 21 2 – 22 3 – 21 4 – 22 5 – 22	Muis 1 had beetwonden op staart en rug – lokale behandeling; overgeplaatst naar individuele huisvesting. Nest geleverd voor afzonderlijk gehuisvest dier maar verwijderd uit kooi met resterende vier muizen indien dit agressie opwekte
09/03				Wonden ontsmet voor muis 1, genezen goed; geen tekenen van agressie tussen resterende dieren
10/03	Tumormeting	1 – 0,2 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – geen tumor 5 – 0,2		Wonden ontsmet voor muis 1
11/03				Wonden ontsmet voor muis 1

12/03	Tumormeting	1- 0,4 2 – 0,3 3 – 0,3 4 – geen tumor 5 – 0,5	1 – 22 2 – 22 3 – 21 4 – 21 5 – 23	Wonden genezen voor muis 1, ontsmetting gestaakt
13/03				NAD
14/03	Euthanaseren  en oogsten van tumoren			

### **1 (b) Werkzaamheid van nieuwe farmaceutische agentia voor het tegengaan van tumorgroei – Meerstapsbenadering**

Het onderzoek is bedoeld om na te gaan in hoeverre nieuwe agentia werkzaam zijn bij het remmen of tot stilstand brengen van de groei van tumorcellen. De tumor moet eenduidig vastgesteld zijn alvorens de behandeling van start kan gaan (doorgaans volstaat een diameter van 0,5 cm) – vanwege de duur van het onderzoek kunnen sommige tumoren een diameter van maximaal 1,2 cm bereiken, doorgaans in de carrier-controlegroep. Cytotoxische geneesmiddelen veroorzaken waarschijnlijk enkele negatieve welzijnseffecten.

30 naakte BALB/C-mannetjesmuizen krijgen langzaam groeiende tumorcellen ingespoten (0,1 ml). Dierenwelzijn wordt dagelijks beoordeeld en dieren worden gedurende 3 opeenvolgende weken eenmaal per week gewogen. Tumorgroei wordt op dag 7 en dag 14 gemeten met behulp van kalibers; op dag 20 worden tumoren opnieuw gemeten, dieren worden gerandomiseerd en behandeling gestart in de vorm van tweemaal daagse intraperitoneale injecties gedurende 7 dagen.



**Initiële beoordeling vooraf en 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 het lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
<b>Instandhouding van muizen met een zwak immuunsysteem</b>	Dieren zijn vatbaar voor infecties	Huisvesting in IVC's en specifieke houderijpraktijken om risico van besmetting tot een minimum te beperken Dieren worden groepsgewijs gehuisvest en milieuverrijking om stress tegen te gaan Houderij en verzorging zullen worden herzien als er tekenen van angst, agressie of abnormaal gedrag worden waargenomen	Elk dier dat tekenen van intercurrente ziekte vertoont zal worden gedood
<b>Subcutane injectie van tumorcellen</b>	Tijdelijke hinder na injectie	Injectie slechts eenmalig uitgevoerd Passende hoeveelheid wordt ingespoten (maximaal 0,2ml) Dieren worden onmiddellijk na de injectie nauwlettend in de gaten gehouden	Dieren worden op humane wijze gedood als na de injectie meer dan lichte angst of hinder wordt waargenomen, zonder dat snel herstel optreedt (komt zeer zelden voor)

<p><b>Groei van tumor</b></p>	<p>Kan hinder veroorzaken of normaal gedrag of voortbeweging nadelig beïnvloeden Tumor kan ontsteken of verzweren (maar mag niet uitzaaien)</p>	<p>Dagelijkse observatie van dieren, regelmatig monitoring van algehele gezondheid en tumorgroei Monitoring omvat zorgvuldige observatie van lichaamshouding, gang evenals omvang en toestand van de tumor Farmaceutische interventies beginnen wanneer tumor een diameter van 0,5 cm bereikt (gemeten met behulp van kalibers)</p>	<p>Het dier zal worden gedood als de tumor verzweert, of normaal gedrag, lichaamshouding of voortbeweging in de weg staat, of een diameter van meer dan 1,2cm heeft (Workman et al. 2010)</p>
<p><b>Intraperitoneale injectie van nieuw farmaceutisch agens</b></p>	<p>Tijdelijke hinder na injectie Cytotoxische geneesmiddelen kunnen diarree, gewichtsverlies, anorexie of lusteloosheid veroorzaken</p>	<p>Dieren worden onmiddellijk na de injectie nauwlettend in de gaten gehouden Maximaal volume van 10ml/kg per dag gedurende 7 dagen Minimale dosisniveaus zullen worden gebruikt (bepaald op grond van dose-ranging onderzoeken) Een klinisch scoresysteem zal worden gebruikt om welzijn te beoordelen</p>	<p>Dieren zullen worden gedood als gewichtsverlies meer bedraagt dan 20% van oorspronkelijke lichaamsgewicht. Dieren die gedurende meer dan 48 uur niet eten of diarree hebben zullen worden gedood Een bovengrens voor een klinische score zal worden ingesteld als een humaan eindpunt</p>

### Analyse

Gelet op de tumorgrootte, de toegenomen kans op verzwering, de frequentie van injecties en de bijwerkingen van de toegediende geneesmiddelen, moet in dit geval de **ernst vooraf worden ingedeeld als MATIG**.

### **Kan de ernstlimiet LICHT zijn?**

Zeer onwaarschijnlijk, tenzij de wetenschappelijke doelstellingen konden worden verwezenlijkt met eerdere eindpunten, bijvoorbeeld het verminderen van de maximale tumorgrootte. Dit zou tevens gelijkstaan aan het inspuiten van geneesmiddelen in een dosis waarvan bekend is dat deze geen significante klinische bijwerkingen veroorzaakt. Onder deze omstandigheden zou de ernst als **LICHT** moeten worden aangemerkt.

### **Klinische observaties**

Een voorbeeld van een observatieblad en een model-scoreblad zijn opgenomen aan het einde van dit model

### **Resultaten**

Van de 30 BALB/C-mannetjesmuizen werden er 25 gebruikt om de werkzaamheid te beoordelen; 10 dieren kregen geneesmiddel B in dosis H, 10 geneesmiddel B in dosis X en 5 geneesmiddel C in dosis Y toegediend;

### **Beoordeling van werkelijke ernst**

- 3 dieren ontwikkelden geen tumoren en werden geëuthanaseerd als onbruikbaar voor het experiment – **LICHT**
- 2 dieren ontwikkelden voordat de behandeling van start ging zweren op de tumorinjectieplaats en werden geëuthanaseerd – **MATIG**
- 10 dieren die geneesmiddel B in dosis H kregen hadden tumoren die vrij klein bleven, zonder significant verlies van lichaamsgewicht en geen klinische symptomen – **LICHT**
- 7 dieren die geneesmiddel B in dosis X kregen vertoonden een afnemende tumorgrootte, met 15% dalend lichaamsgewicht en diarree, maar ze werden tot het einde van het experiment gehouden – **MATIG**
- 3 dieren die geneesmiddel B in dosis X kregen vertoonden een afnemende tumorgrootte, een met 15% dalend lichaamsgewicht, diarree, anorexie en waren bijzonder lusteloos; ze werden op dag 25 op humane wijze gedood – **ERNSTIG**
- 5 dieren die geneesmiddel C in dosis Y toegediend kregen hadden een almaar groeiende tumor, toegenomen lichaamsgewicht, geen klinische symptomen afgezien van tumorgroei. Deze dieren werden geëuthanaseerd toen de tumorgrootte meer bedroeg dan 1,2 cm – **MATIG**

### Voorbeeld van een scoreblad

Dier nr.				
Datum	01/06	02/06	03/06	04/06
<b>Voorkomen:</b>				
Lichaamsgewicht				
Vacht				
<b>Lichaamsfunctie</b>				
Dyspnoe en/of tachypnoe				
Voedselinname				
<b>Milieu</b>				
Diarree				
Bloed in diarree				
<b>Gedrag</b>				
Hantering				
Agressie				
Abnormale gang				
Abnormale houding				
Weigering om te bewegen				
<b>Procedurespecifieke indicatoren</b>				
Tumorgrootte				
Verzwering van tumor				
Tumor staat beweging in de weg				

<b>Totaalscore</b>				
Eventuele andere opmerkingen				

### Voorbeelden van klinische scores

Voorkomen:	Score
<b>Lichaamsgewicht</b>	
5-10% gewichtsverlies	1
11-15 % gewichtsverlies	2
16-20% gewichtsverlies	3
20% + gewichtsverlies	HEP
<b>Vacht</b>	
Vacht enigszins onverzorgd	1
Lichte pilo-erectie	2
Zware pilo-erectie	3
<b>Lichaamsfunctie</b>	
Tachypnoe (snelle ademhaling)	1
Dyspnoe (moeizame ademhaling)	3
<b>Milieu</b>	
Diarree	1
Bloed in diarree	HEP
<b>Gedrag</b>	
Gespannen en nerveus bij hantering	1
Merkbaar angstig bij hantering, bijv. trillen, vocaliseren, agressief	3

<b>Acties</b>	
<b>Score 1</b>	Monitoringfrequentie herzien
<b>2</b>	Aanvullende zorg overwegen, bijv. extra vloeistoffen
<b>4</b>	Dierenarts raadplegen
<b>6</b>	Humaan eindpunt vaststellen

<b>Voortbeweging</b>	
Enigszins abnormale gang/houding	1
Zeer abnormale gang/houding	2
Wezenlijke mobiliteitsproblemen / weigering om te bewegen	3
Immobiliteit >24u	HEP
<b>Procedurespecifieke indicatoren</b>	
Tumorgrootte >1,2cm	HEP
Tumorverzwering	HEP
Tumor staat beweging in de weg	HEP

## Voorbeelden ter illustratie van de ernstbeoordeling Model 2–Experimentele auto-immune encefalitis (EAE) bij muizen

Laatst bijgewerkt: 05/02/2013

### Algemene context

Experimentele auto-immune encefalomyelitis (EAE) wordt gebruikt om diverse aspecten van Multiple Sclerose (MS) bij knaagdieren en primaten te modelleren. MS is een complexe neurologische aandoening die meerdere vormen kan aannemen en zich voordoet bij jonge volwassenen. Tot de symptomen behoren ontsteking, demyelinatie en axonaal verlies. Diermodellen worden gebruikt om de fysiopathologie van deze aandoening te onderzoeken, en om potentieel beschermende of genezende behandelwijzen te beoordelen, waaronder immunomodulatie, immuunbescherming, axonale regeneratie en myelineherstel. Doordat MS meerdere vormen en meerdere fasen kent, moeten passende modellen worden gebruikt om specifieke vragen met betrekking tot verschillende stadia van de ziekte te beantwoorden.

EAE gaat gepaard met aantasting van de myeline door het immuunsysteem, hetgeen ontsteking in het centrale zenuwstelsel en opening van de bloed-hersen-barrière veroorzaakt. Dit kan een ernstig neurologisch syndroom in het diermodel teweegbrengen, hetgeen zou moeten worden gevolgd door een gedeeltelijk herstel tijdens de eerste chronische 'relapsing-remitting' fase. Deze fase gaat gepaard met ontsteking en omkeerbare demyelinatie. Na 9-10 weken gaat het dier de progressieve fase in, die gepaard gaat met chronische demyelinatie en axonaal verlies. Tijdens deze fase kunnen verschillende behandelwijzen worden geëvalueerd. Humane en wetenschappelijke eindpunten moeten zorgvuldig worden gekozen, rekening houdend met de doelstellingen van het onderzoek.

### Referenties

Emerson MR *et al.* (2009) Enhancing the ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of Multiple Sclerosis through refinement of the experimental design. *Comparative Medicine* **59**: 112-128

Miller SD *et al.* (2010) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the mouse. *Current Protocols in Immunology*. **88**: 15.1.1 – 15.1.20

Weissert R (ed) (2012) *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis – Models, Disease Biology and Experimental Therapy*. Gepubliceerd door In Tech, DOI: 10.5772/1190, <http://www.intechopen.com>

Wolfensohn S *et al.* (in prep) Reducing suffering in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

## Onderzoeksopzet

In dit voorbeeld wordt EAE geïnduceerd in vier mannelijke en vier vrouwelijk Biozzi ABH-muizen (een veelgebruikte stam waarvan wordt aangenomen dat deze een hoge translatiewaarde heeft) om een potentiële behandeling voor MS te beoordelen. Tijdens de initiële projectplanningsfase kijkt de gebruiker naar elke mogelijke bijwerking voor de dieren en brengt in samenspraak met de dierwetenschappers, verzorgend personeel en de dienstdoende dierenarts mogelijke oorzaken van lijden in kaart. De bestudeerde verfijningen worden in het project toegepast. De muizen worden groepsgewijs gehuisvest in viertallen met uitsluitend hetzelfde geslacht. Speciale aandacht zal worden besteed aan de lokale omgeving, aangezien dieren met EAE significante motorische problemen hebben. Kooien worden voorzien van degelijke vloeren, houtstrooisel, adequate schuilplaatsen en nestmateriaal, en kauwblokken. Dieren zullen worden behandeld met een inflammatoire adjuvans om EAE te induceren en gemonitord tijdens herstel en de chronische 'relapsing-remitting' fase (9 à 10 weken). Zodra de progressieve vorm zich heeft ontwikkeld, zullen de therapeutische samenstellingen gedurende een drie weken durend onderzoek worden getest op de muizen.

### Initiële beoordeling vooraf en 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 het lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
Meerdere injecties van inflammatoire adjuvans	Hinder of pijn vanwege eerste injectie  Mogelijke reactie op injectieplaats, hetgeen irritatie of hinder veroorzaakt	Geringe doses zullen worden ingespoten op meerdere subcutane locaties (niet voetzolen of staartwortel)  De adjuvans en carrier worden zodanig geformuleerd dat ze zo min mogelijk irritatie opwekken  Na injectie zal worden toegezien op het welzijn van de dieren	Dieren zullen op humane wijze worden gedood als na injectie matige pijn of angst worden waargenomen die niet van voorbijgaande aard is



inductie van EAE – initieel ernstig neurologisch syndroom gevolgd door herstelfase	Verlamming, die nood of angst kan veroorzaken: verlies van staarttonus, zwakke achterste ledematen, hypomotiliteit, verlamde ledematen, urinaire dysfunctie (incontinentie of retentie)	Urinefunctie zal worden gemonitord door dagelijks de blaas te controleren. De blaas zal handmatig worden geleegd wanneer dit noodzakelijk is in geval van retentie (nauwlettend toezien op tekenen van pijn of angst na het legen van de blaas) Als dieren incontinent zijn, wordt de kooi regelmatig gecontroleerd op vochtig strooisel en nestmateriaal, dat indien nodig zal worden vervangen door vers materiaal Adequate schuilplaatsen en nestmateriaal zullen ter beschikking worden gesteld	HEP voor de volgende criteria: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bilaterale verlamming van voorste ledematen gedurende &gt;24u</li> <li>• Bilaterale verlamming van achterste ledematen gedurende maximaal 5 dagen</li> <li>• Eventuele zelfverminking</li> <li>• Aanhoudende urineretentie/onvermogen om blaas te legen</li> <li>• Paresis (verlies van beweging; lichte verlamming)</li> <li>• Gewichtsverlies van 35%*</li> <li>• Stoppen met eten of drinken gedurende &gt;24u nadat de ziekte zich manifesteert</li> <li>• Niet herstellen van EAE 3 weken nadat klinische ziekte zich manifesteert</li> <li>• Klinische symptomen van intercurrente ziekte, bijv. gebocheldheid</li> </ul>
	Significant gewichtsverlies (bijv. tot 35%)	De dieren hebben voortdurend toegang tot water en voedsel in bakken op de vloer van de kooi Lichaamsgewicht en gezondheidstoestand worden dagelijks gemonitord en (indien nodig) vaker van een score voorzien zodra sprake is van gewichtsverlies Geweekt voer en vochtblokken	

		worden aangeboden, met indien nodig subcutane suppletie	
Klinisch verloop ('remitting-relapsing')	Chronische neurologische problemen	Alle stressfactoren worden gereduceerd, waaronder geluidsniveaus Omgevingstemperatuur wordt indien nodig verhoogd, met behulp van warmtekussens, extra strooisel en nestmateriaal	
Toediening van nieuw therapeutisch agens (tijdens progressieve vorm)	Hinder vanwege injectie Bijwerkingen of gebrek aan werkzaamheid van agens	Dieren zullen nauwlettend in de gaten worden gehouden na inspuiting van agens	Dieren worden op humane wijze gedood als een van de bovenstaande indicatoren wordt waargenomen, of wanneer het nieuwe therapeutische agens ernstige bijwerkingen veroorzaakt

\* Gewichtsverlies van 35% is een extreem eindpunt dat een gedegen wetenschappelijke rechtvaardiging vereist. In dit geval is gewichtsverlies onvermijdelijk en de dieren kunnen weer op gewicht komen met de juiste ondersteuning, bijv. extra warmte en aanvullende voeding, waaronder indien nodig handmatig voeren. Voor dit specifieke onderzoek werd het eindpunt van 35% ingesteld om EAE bij minder andere voor het eerst gebruikte dieren te hoeven induceren; dit aantal zou aanzienlijk hoger zijn met een 'conventioneler' eindpunt (bijv. 20%).

### Analyse

De **ernst moet vooraf worden beoordeeld als ERNSTIG** aangezien de procedure het welzijn en de gezondheidstoestand van de dieren naar verwachting ernstig zal aantasten.

### Zou de ernst MATIG kunnen zijn?

Hoewel de ernstbeoordeling vooraf van dit model altijd ERNSTIG moet zijn om de hierboven genoemde redenen, kan de ernstbeoordeling achteraf in de categorie MATIG vallen naargelang van de duur van het onderzoek en het in een vroege fase vaststellen van een HEP, zoals hier vermeld.

### Klinische observaties

Tijdens het onderzoek werden de muizen door de dierwetenschappers en verzorgend personeel gemonitord aan de hand van een klinisch scoresysteem dat in overleg met de gebruikers, dierwetenschappers, verzorgend personeel en dierenarts was afgestemd op het protocol. Dit systeem bevatte parameters die betrekking hadden op gewicht, vacht, staarttonus, controle over de blaas, oprichting, gang, paresis en gevorderde tekenen (rustpositie op de zij; bijna volledige verlamming; snelle, langzame of diepe ademhaling). Aangezien het project gepaard ging met ernstige procedures, werden dieren zeer nauwlettend in de gaten gehouden en werd de ernst regelmatig beoordeeld door de gebruiker, in overleg met de Animal Welfare Body, dierwetenschappers en de dienstdoende dierenarts. Hieronder is een voorbeeld ter illustratie van een scoreblad weergegeven.

### Voorbeeld van een scoreblad

**Tabel. Klinisch scoreblad gebruikt voor EAE-muizen**

<b>Datum:</b>					
<b>Voorkomen:</b>					
Lichaamsgewicht					
Vacht					
<b>Lichaamsfunctie</b>					
Controle over de					

blaas					
Staarttonus					
Ademhaling					
<b>Milieu</b>					
Nest					
<b>Gedrag</b>					
Sociaal gedrag					
Gang					
<b>Procedurespecifieke indicatoren</b>					
Rustpositie op de zij					
Tijd om overeind te komen					
Paresis					
Verlamming					
<b>Overige observaties</b>					
(Vrije tekst)					

**Opmerkingen:** Elke indicator werd beoordeeld aan de hand van het systeem in de onderstaande tabel, waarbij (bijvoorbeeld) ‘1’ zou worden ingevuld in de tabel naast ‘staarttonus’ als werd waargenomen dat het dier zijn staart minder vaak optilt, en ‘2’ naast ‘nestconditie’ als het nest ongeordend was.

**Tabel. Beoordelingssysteem voor indicatoren op klinisch EAE-scoreblad**

<b>Score:</b>	<b>1 = Licht</b>	<b>2 = Matig</b>	<b>3 = Ernstig</b>
<b>Gewichtsverlies</b>	Tot 10%	10 à 20%	20 à 35 %
<b>Vacht</b>	Enigszins onverzorgd	Gebrek aan verzorging	Merkbare /langdurige pilo-erectie
<b>Controle over de blaas – incontinentie</b>	Aanwijzingen voor enig controleverlies, bijv. kleine hoeveelheid urine in nest	Heviger ‘lekken’ van urine	Incontinentie
<b>Controle over de blaas – retentie</b>	De blaas kan worden gepalpeerd maar leegt zich bij hantering	Iets meer inspanning nodig om blaas te legen	Niet in staat te urineren zonder hulp; tekenen van hinder/angst tijdens of na handmatig legen
<b>Staarttonus</b>	Verminderde oprichting of krullen van staart	Minder tonus in distale gedeelte van staart	Verlies van tonus in gehele staart
<b>Ademhaling: snelle, langzame of diepe ademhaling</b>	Licht	Matig	Merkbaar
<b>Nest</b>	Enigszins ongeordend	Poging om nest te maken maar ongeordend	Geen nest
<b>Sociaal gedrag</b>	Geen verandering verwacht bij matig lijden; score begint bij 2	Verminderde interactie met andere dieren	Aanzienlijk verminderde interactie; passief
<b>Gang</b>	Lomp	Slepen van één achterpoot	Slepen van twee achterpoten
<b>Rustpositie op de zij</b>	Geen verandering verwacht bij licht of matig lijden; score begint bij 3	Geen verandering verwacht bij licht of matig lijden; score begint bij 3	Aanwezig

<b>Tijd om overeind te komen</b>	Dier komt langzaam overeind wanneer op de rug gelegd	Aanzienlijke moeite om overeind te komen	Onvermogen om binnen 5 seconden na op de rug te zijn gelegd overeind te komen
<b>Paresis</b>	Langzame abductie van voorste ledematen wanneer op de rug gelegd	Verminderd abductiebereik van voorste ledematen wanneer op de rug gelegd	Geen abductie van voorste ledematen
<b>Bijna volledige of volledige verlamming</b>	Geen verandering verwacht bij licht of matig lijden; score begint bij 3	Geen verandering verwacht bij licht of matig lijden; score begint bij 3	Aanwezig

### Beoordeling van werkelijke ernst

Aan het einde van de procedure werd het scoreblad voor elk dier geanalyseerd om te zien hoe hoog de indicatoren hadden gescoord en hoe dit mettertijd was veranderd.

- Twee muizen verloren 8% van hun lichaamsgewicht na inductie van EAE, hadden een enigszins onverzorgde vacht en een trage abductie van de voorste ledematen, maar scoorden '2' voor alle andere indicatoren gedurende de eerste vijf dagen van het project. Hun scores keerden vervolgens terug naar '1' of '0' voor elke indicator gedurende de 'relapsing/remitting' fase en tijdens de geneesmiddelenproef. Ernst = **MATIG**
- Drie muizen verloren 22 à 32% van hun lichaamsgewicht en scoorden een combinatie van '3', '2' en '1' gedurende de hele 'relapsing/remitting' fase en tijdens de geneesmiddelenproef. Ernst = **ERNSTIG**
- Eén muis verloor 37% van zijn lichaamsgewicht tijdens de post-inductiefase en werd op humane wijze gedood. Ernst = **ERNSTIG**
- Twee muizen verloren respectievelijk 15 en 18% van hun lichaamsgewicht, en scoorden een combinatie van '2' en '3' voor alle andere indicatoren gedurende de eerste 4 dagen van het onderzoek. Ze scoorden vervolgens een combinatie van '1' en '2' gedurende de hele 'relapsing/remitting' fase en tijdens de geneesmiddelenproef. Ernst = **ERNSTIG**

Verlamming werd niet waargenomen en het bleek te moeilijk om ademhaling aan koozijde te beoordelen, dus beide parameters werden uit de registratiebladen verwijderd. Meer tijd in de schuilplaats werd in de vrije tekstkaders veelvuldig genoteerd als een vroegtijdige indicator van lijden, dus dit werd toegevoegd aan de registratiebladen voor toekomstige projecten.

6 dieren werden aangemerkt als **ERNSTIG**, 2 dieren werden aangemerkt als **MATIG**

### **Mogelijkheden voor verdere toepassing van 3V's**

Na hun beoordeling van de werkelijke ernst overlegden de gebruikers met collega's en zochten in de literatuur naar verdere verfijningen. De volgende aanvullende verfijningen werden in kaart gebracht:

- Het vooraf voeren van dieren met energierijke voedingssupplementen, zoals gelei en gecondenseerde melk, alvorens de adjuvans toe te dienen
- Een lagere dosis van de adjuvans gebruiken
- Een alternatief onderzoeksprotocol gebruiken om de duur van het project te reduceren

Deze mogelijkheden werden aan het protocol voor toekomstige onderzoeken toegevoegd; het doel hiervan was om werkelijke ernstniveaus te vergelijken om te zien of de verfijningen effect hadden gesorteerd.

## Voorbeelden ter illustratie van de ernstbeoordeling

### Model 3 – Artritis

Laatst bijgewerkt: 05/02/2013

#### Algemene context

Diermodellen van artritis worden gebruikt om de pathogenese van de ziekte te onderzoeken en om potentiële geneesmiddelen tegen artritis voor klinisch gebruik te beoordelen. Belangrijke criteria voor het selecteren van een model zijn dan ook morfologische overeenkomsten met de menselijke ziekte, en in hoeverre het model in staat is de werkzaamheid van therapeutische samenstellingen bij mensen te voorspellen.

Veelgebruikte diermodellen van reumatoïde artritis zijn: adjuvante behandeling van artritis bij ratten, type II collageen artritis bij ratten, type II collageen artritis bij muizen, en door antilichamen geïnduceerde artritis bij diverse diersoorten (Bendele, 2001). Injectie aan de basis van de staart wordt veel toegepast aangezien dit een goede immunogene reactie oplevert, hoewel ook andere injectieplaatsen worden gerapporteerd in de literatuur. Er zijn ook aanzienlijke verschillen per stam als het gaat om gevoeligheid, ernst en latentietijd tot het ontstaan van artritis. De gevoeligheid van genetisch gemodificeerde lijnen voor de ontwikkeling van artritis kan bijvoorbeeld worden gewijzigd (vergroot of onderdrukt) naargelang van de effecten van de genetische modificaties. Bij diermodellen van artritis die veelvuldig zijn gebruikt en dus deugdelijk zijn bevonden, zal het ontstaan van de ziekte voorspelbaar zijn, en evaluatiemethoden zullen waarschijnlijk goed gedefinieerd en gekenschetst zijn. In dergelijke modellen kunnen meerdere evaluaties, waaronder een analyse van de gang en het gebruik van Von Frey-filamenten, worden gebruikt in plaats van enkelvoudige observatieparameters.

De beschikbare stammen, protocollen en verfijningen moeten regelmatig worden herzien, zodat per geval de meest geschikte worden geselecteerd voor de wetenschappelijke vraagstelling (Joe et al, 1999).

Het in dit voorbeeld gepresenteerde model is type II collageen artritis bij ratten, dat ernstig lijden kan veroorzaken. Het gebruik ervan dient dan ook wetenschappelijk te worden gerechtvaardigd. Ratten zijn geïmmuniseerd tegen heteroloog type II collageen, hetgeen letsel veroorzaakt dat vergelijkbaar is met reumatoïde artritis bij mensen (Bendele, 2001). De hieruit voortvloeiende polyartritis wordt gekenmerkt door snelle afbraak



van kraakbeen gekoppeld aan afzetting van immuuncomplex op gewrichtsoppervlakken, botresorptie en periosteale proliferatie, evenals matige tot ernstige synovitis en periarticulaire ontsteking.

## Referenties

Bendele, A.M. Animal models of rheumatoid arthritis, *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(4):377-385

Jasemian Y et al. (2011) Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography. *Br. J. Med. & Med. Res.* **1(4)**: 469-477

Joe, B., Griffiths, M.M., Remmers, E.F., Wilder, R.L. Animal models of rheumatoid arthritis, *Current Rheumatology Reports* 1999 ; 1 139-149

## Onderzoeksopzet

In dit voorbeeld wordt artritis geïnduceerd bij 18 mannelijke en 18 vrouwelijke Lewis-ratten door herhaalde injectie van FIA (Freund's Incomplete Adjuvant) en collageen. De injectieplaats zal de staartbasis zijn. Dagelijkse behandeling zal 10 dagen later (D10) van start gaan, wanneer artritis een feit is, en zal vervolgens dagelijks gedurende nog eens 14 dagen worden voortgezet (tot D24). Doel van de studie zal zijn om potentiële therapeutische agentia te testen. Eerder gepubliceerde gegevens over gerelateerde samenstellingen werden herzien om na te gaan of het toedienen van pijnverdooving de wetenschappelijke doelstellingen in de weg zou staan, en de conclusie was dat dit voor experimentele ambiguïteit zou zorgen. Pijnverdooving zal dan ook niet worden toegediend tijdens de ontwikkeling van artritis of aan controlegroepen, en speciale aandacht zal worden besteed aan niet-farmacologische methoden van pijnverlichting (bijv. verfijning van houderijpraktijken) om het lijden te verzachten.

Alle dieren worden dagelijks geobserveerd en gewogen, en de score wordt genoteerd op een klinisch scoreblad; ook worden ze op D0 (voor de eerste injectie) en op D10 (voor de start van de behandeling), D13, D16, D20 en D24 getest. Tests omvatten indirecte maatstaven voor aantasting van lichaamsfunctie zoals gewrichtsdiameter (gemeten met behulp van kalibers) en klinische scores op basis van een scoresysteem voor artritis. Humane eindpunten zullen worden vastgesteld op basis van klinische scores (zie onder).

Evaluatie van nieuwe therapeutische/farmaceutische agentia in een ratmodel van artritis (type II collageen)

ERNSTIGE ernst

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>Maximaal drie subcutane injecties van rundercollageen type II in Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) aan de staartbasis</b>	Stress a.g.v. beperking bewegingsvrijheid Voorbijgaande pijn, matige zwelling op injectieplaats en hinder gedurende een of twee dagen  Huidzweren mogelijk maar uiterst onwaarschijnlijk met FIA	Empathische attitudes en deskundig handelen gedurende de procedures Gestandaardiseerde dosis en formulering gekozen om zwelling en pijn tot een minimum te beperken	Als het huidzweren aanhoudt of de huidzweren geïnfecteerd raken, zullen dieren op humane wijze worden gedood
<b>Ontwikkeling van artritis (D0-D10)</b>	Hinder, pijn, lichamelijke beperking en angst; dier kan tekenen van gezondheidsstoornis vertonen, waaronder dof voorkomen, gebrek aan eetlust, weigering om te bewegen, gewichtsverlies, gezwollen gewrichten, hoorbare vocalisatie bij hantering	Zorgvuldige klinische monitoring aan de hand van een algemeen klinisch scoreblad, met frequentere monitoring bij ontstaan van klinische symptomen (doorgaans vanaf D8-D10)  Extra zacht strooisel en nestmateriaal beschikbaar gesteld tijdens het onderzoek  Eenvoudige toegang tot water en voedsel (bijv. op vloer van de kooi) gedurende het hele onderzoek	Dieren worden op humane wijze gedood wanneer ze vooraf bepaalde klinische scores voor humane eindpunten halen (zie onderstaande tabel)

		Klinisch scoresysteem voor artritis zal worden gebruikt, dat mate van zwelling en het aantal gezwollen gewrichten in kaart brengt	
<b>Toediening van farmacologische agentia (test en controle, tweemaal daags) langs subcutane of intraperitoneale weg (van D10 tot D24)</b>	Tijdelijke hinder na injectie  Farmacologische agentia zullen naar verwachting geen bijwerkingen veroorzaken, uitgaande van eerdere diergegevens	Dagelijkse zorgvuldige klinische monitoring aan de hand van een algemeen klinisch scoreblad	Humane eindpunten zullen worden toegepast als er significante bijwerkingen zijn
<b>Evaluatie van effecten van farmacologische agentia op ernst van artritis (D0, D10, D13, D16, D20 en D24)</b>	Naargelang van de toegepaste methoden kan er extra pijn of hinder van voorbijgaande aard zijn bijv. gebruik van Von Frey haren, gebruik van kalibers, vereisten voor hantering	Zorgvuldige klinische monitoring  Monitoringfrequentie verminderen (tot het minimum dat consistent is met wetenschappelijke doelstellingen) totdat het dier zich herstelt	Zie tabel hieronder

### Opmerking

Een klinisch scoresysteem voor artritis moet worden besproken door de onderzoeker, dierenarts en dierwetenschappers en verzorgend personeel, en voorafgaand aan het onderzoek overeengekomen.

### Analyse

Aangezien het waarschijnlijk is dat de procedure een significante klinische invloed heeft op het dier, hetgeen een aantal weken kan voortduren, wordt een indeling vooraf naar ernst als **ERNSTIG** passend geacht.

### **Zou de ernst MATIG kunnen zijn?**

Of ernst kan worden gereduceerd tot matig hangt af van de doelstelling van het onderzoek. Met frequente, gedetailleerde monitoring van de dieren en wanneer de mogelijkheid bestaat om in een vroege fase vaststelbare eindpunten te implementeren (bijv. bij ontstaan van kreupelheid, of na een periode van lichte kreupelheid in een ledemaat, of gebruikmakend van in-vivobeeldvormingsmethodes om vroegtijdige veranderingen in gewrichtspathologie op te sporen), kan de procedure worden ingedeeld als MATIG. Dergelijke in een vroege fase vaststelbare eindpunten (bijv. het onderzoek beëindigen op dag 6 na de beeldvorming) zijn wellicht mogelijk bij projecten waarbij vroegtijdige inflammatoire veranderingen worden onderzocht. Profylactische behandeling (die van start gaat voordat artritis zich in volle omvang ontwikkelt) met nieuwe farmaceutische agentia die een sterke ontstekingsremmende werking hebben en de ontwikkeling van artritis remmen, kunnen ook leiden tot een reductie van de ernst tot **MATIG**. Het type onderzoek dat hier wordt geïllustreerd heeft echter tot doel behandelingen voor volledig ontwikkelde artritis te beoordelen. De indeling naar ernst blijft dus **ERNSTIG**.

### **Zou de ernst de bovengrens kunnen overschrijden?**

Volgens artikel 15, lid 2, van de Richtlijn *‘dragen de lidstaten er zorg voor dat een procedure niet wordt uitgevoerd indien deze leidt tot een ernstige mate van pijn, lijden of angst die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht’*. Dit onderzoek veroorzaakt mogelijk ernstig lijden gedurende een aantal weken, hetgeen moet worden beschouwd als langdurig. Mocht zich ernstige artritis ontwikkelen in alle vier de poten en het lijden van het dier kan niet worden verzacht, zou het onderzoek de bovengrens van ernst overschrijden en is aanzienlijke verfijning of inroeping van de ‘vrijwaringsclausule’ noodzakelijk (Richtlijn artikel 55) en moet de Commissie om goedkeuring worden verzocht.

In dit voorbeeld zijn er echter maatregelen genomen om lijden te beperken – rekening houdend met de wetenschappelijke doelstelling – waaronder het verfijnen van de samenstelling, de levering en keuze van de adjuvans, artritis zich alleen laten ontwikkelen in de achterpoten, een comfortabele omgeving tot stand brengen en eenvoudige toegang tot water en voedsel, een omvattend monitoringsysteem en humane eindpunten. Dit project zou de bovengrens dan ook niet overschrijden en kan worden goedgekeurd behoudens een anderszins positieve projectbeoordeling met inbegrip van een analyse van de schade en baten.

Hieronder volgt een voorbeeld van een klinisch scoreblad voor dagelijkse observatie van ratten met artritis.

<b>Date:</b>	<b>Dag 1</b>	<b>Dag 2</b>	<b>Dag 3</b>	<b>Dag 4</b>
<b>Voorkomen:</b>				
Lichaamsgewicht				
Gebrek aan verzorging				
Uitdroging				
<b>Lichaamsfuncties</b>				
Dyspnoe				
Tachypnoe				
<b>Gedrag</b>				
Weigering om te bewegen				
Lusteloosheid/apathie				
Immobiliteit				
Vocalisatie				
<b>Procedurespecifieke indicator</b>				

Artritische klauwscore (zie Tabel 2)				
<b>Overige observaties</b>				
(Vrije tekst)				
<b>Totaalscore</b>				

**Opmerking:** Elke indicator werd beoordeeld volgens het systeem in de tabellen 1 en 2 hieronder. '1' zou op het scoreblad worden ingevuld naast 'onverzorgd' (Tabel 1), en '5' naast 'procedurespecifieke indicator' als de twee achterpoten respectievelijk '3' en '2' scoorden (Tabel 2). De hieronder vermelde acties en eindpunten hebben tot doel ernstig lijden waar mogelijk te voorkomen, maar niet om dieren op humane wijze te doden voordat voldoende gegevens zijn verkregen, waardoor andere, voor het eerst gebruikte dieren zouden moeten worden gebruikt.

**Tabel 1. Scoresysteem voor in het klinisch scoreblad gebruikte indicatoren**

	Score
<b><u>Voorkomen:</u></b>	
Normaal < 5% gewichtsverlies	0
5-10% gewichtsverlies	1
11-15 % gewichtsverlies	2
16-20% gewichtsverlies	3
20% + gewichtsverlies	HEP
Gebrek aan verzorging	1
Geplooide huid/uitdroging	1
<b><u>Lichaamsfuncties</u></b>	
Dyspnoe	2
Tachypnoe	1
<b><u>Gedrag</u></b>	

**Tabel 2. Procedurespecifieke indicator – artritische klauwscore**

0	Normaal
1	Erytheem en zwelling van een enkel
2	Erytheem en zwelling van enkel en proximale helft van spronggewrichten
3	Erytheem en zwelling van enkel en alle spronggewrichten tot aan de middenvoetsgewrichten
4	Erytheem en zwelling van hele poot, waaronder vingers

**Dit scoresysteem voor artritis, dat als procedurespecifieke indicator wordt gebruikt,** is gebaseerd op stijgende niveaus van zwelling en periarticulair erytheem. De scores zijn gebaseerd op lichamelijk onderzoek en visuele inspectie en worden gebruikt om een artritische index te berekenen die gedefinieerd is als de som van de scores voor beide achterste ledematen.

Weigering om te bewegen	1
Lusteloosheid/apathie	2
Persistente immobiliteit < 24u	3
Immobiliteit >24u	HEP
Vocalisatie bij hantering	1
Vocalisatie, gespannen en nerveus bij hantering	2
Vocalisatie bij bewegen/spontaan	3
<b>Procedurespecifieke indicator</b>	
Artritische klauwscore (Tabel 2)	0-8

HEP: humaan eindpunt vastgesteld, ongeacht aanwezigheid of afwezigheid van andere klinische symptomen



### Voorbeelden van passende interventies naar aanleiding van klinische totaalscores

Te nemen maatregelen	Totaalscore
Monitoringfrequentie verhogen; extra vloeistoffen/verzorging overwegen	≥4
Voortschrijding doornemen met dierenarts	5-15
Humaan eindpunt	≥16

**Opmerking:** De totaalscores zijn ontleend aan de klinische scorebladen, ingevuld volgens de scoresystemen in de Tabellen 1 en 2. Zo zou een dier met een lichaamsgewichtverlies van 12%, aanwijzing voor verminderde verzorging en zwelling in beide achterenkels een totaalscore van 5 hebben.

#### Beoordeling achteraf:

36 ratten werden geïmmuniseerd met rundercollageen Type II in Freund's Incomplete Adjuvant (FIA). Alle dieren ontwikkelden artritis: artritische klauwscores bedroegen 6 op D10. Alle dieren vertoonden een gewichtsverlies van 5-10%. Gewrichtsdoorsnedemetingen wezen op een significante wijziging ten opzichte van basisgegevens. Dagelijkse klinische observaties omvatten gebrek aan verzorging, weigering om te bewegen, apathie, vocalisatie bij hantering (tijdens observatie en wisselen van kooi), verlaagde voedselopname en perioden van immobiliteit.

- 12 dieren werden gebruikt in de met een zoutoplossing behandelde groep. De hoogste artritische klauwscores lagen tussen 6 en 8 voor alle metingen (D13, D16, D20 en D24). Gewrichtsdoorsnedemetingen wezen daarnaast ook op significante toenames vs. baseline op elk tijdstip. Klinische scores liepen uiteen van 4 tot 8, met een lichaamsgewichtverlies tussen 5 en 15%, behalve bij één dier dat op D17 een gewichtsverlies van 21% bereikte en vervolgens op humane wijze werd gedood.

#### Beoordeling achteraf: ERNSTIG

- 12 dieren werden behandeld met GENEESMIDDEL A in een **lage** dosis. Voor alle dieren verschilde de artritische klauwscore tot D16 niet van de klauwscore van de met een zoutoplossing behandelde groep. Op D20 had één dier een klauwscore van 8, de scores van de andere dieren bedroegen 6 à 7.

Op D24 vertoonden vijf dieren een enigszins afgenomen artritische klauwscore (5 à 7). De klinische symptomen van deze vijf dieren vertoonden enige verbetering, lichaamsgewichten waren nog altijd 5 à 10% lager; ook hun mobiliteit in de kooi bleef verlaagd.

De andere zeven dieren vertoonden geen verminderde artritische en klinische symptomen ten opzichte van de met een zoutoplossing behandelde groep.

**Beoordeling achteraf: ERNSTIG**

- in de met een zoutoplossing behandelde groep werden 12 dieren gebruikt. De hoogste artritische klauwscores lagen tussen 6 en 8 voor alle metingen (D13, D16, D20 en D24). Gewrichtsdoorsnedemetingen wezen daarnaast ook op significante toenames vs. baseline op elk tijdstip. Klinische scores liepen uiteen van 4 tot 8, met een lichaamsgewichtverlies tussen 5 en 15%, behalve bij één dier dat op D17 een gewichtsverlies van 21% bereikte en vervolgens op humane wijze werd gedood.
- **Beoordeling achteraf: ERNSTIG**

**Opmerking:** Aan het einde van het onderzoek bleek het testagens ‘GENEESMIDDEL A’ dat in de Hoge dosis werd toegediend aan de derde groep van twaalf dieren werkzaam bij het terugdringen van de werkelijke ernst tot Matig. Omdat het model echter vereiste dat artritis zich voorafgaand aan de start van de behandeling volledig had ontwikkeld in alle dieren, toen de dieren klinische symptomen vertoonden die consistent waren met een “ernstige” indeling, bleef de indeling naar werkelijke ernst voor deze dieren Ernstig.

Aangezien dit project gepaard gaat met ernstige procedures, worden permanente ernstbeoordelingen regelmatig uitgevoerd door de gebruiker, in overleg met de Animal Welfare Body, dierwetenschappers en de dienstdoende dierenarts, om ervoor te zorgen dat de 3 V's voortdurend worden toegepast.

## Voorbeelden ter illustratie van de ernstbeoordeling

### Model 4 – Beroerte

Laatst bijgewerkt: 05/02/2013

#### Algemene context

Beroerte wordt gedefinieerd als verlies of wijziging van normale lichaamsfunctie die voortvloeit uit een ontoereikende bloedtoevoer naar een deel van de hersenen. Ondanks een beter inzicht in de pathofysiologie van vasculair hersenletsel, blijft een doeltreffende behandeling van beroerte een medische behoefte waarin nog niet is voorzien, en onderzoek is gaande om passende preventieve en therapeutische behandelwijzen te vinden.

Drie verschillende typen beroerte kunnen worden onderscheiden in menselijke patiënten: ischemische, intracerebrale bloeding en meningeale bloeding, maar de meeste diermodellen zijn gebaseerd op het ischemische type. Beroertemodellen vormen een uitdaging vanuit het perspectief van dierenwelzijn. Goede interactie en communicatie tussen alle personen die betrokken zijn bij de wetenschappelijke procedures (dierenartsen, dierwetenschappers 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.

Beroerte wordt doorgaans geïnduceerd in knaagdieren 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. Stamspecifieke verschillen in muizen en ratten zijn geconstateerd, evenals de complexe en significante invloed van leeftijd, geslacht en comorbiditeiten zoals diabetes, hypertensie en atherosclerose. Terwijl preklinisch onderzoek naar beroerte vaak gebruik maakt van gezonde, jonge mannetjesknaagdieren, kan het effect van factoren zoals hierboven vermeld in kaart worden gebracht door gebruik te maken van modellen met comorbide condities (bijv. spontaan hypertonische ratten, streptozotocine (STZ)-geïnduceerde diabetes in ratten). In dergelijke gevallen met comorbide condities zijn zorgvuldige observaties van klinische symptomen en in een vroegere fase vaststelbare humane eindpunten wellicht noodzakelijk.

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 testsamenstelling toegediend. De uitkomstanalyse moet informatie bevatten over omvang van het infarct, sterftcijfer, frequentie van complicaties (bijv. meningeale bloeding), evenals functionele en neurologische evaluatie om toe te zien op voortschrijding. Seriële beeldvorming door middel van magnetische resonantie (MRI) is een krachtig instrument gebleken om informatie te verkrijgen over temporele variatie van infarctomvang, maar kan ook aanvullende informatie verschaffen over bloedstroom of metabolische toestand. Histologische, biochemische en moleculaire eindpunten kunnen ook worden opgenomen.

Er zijn diverse gedragstests die kunnen worden toegepast op beroertemodellen. De eenvoudigste tests omvatten neurologische scoresystemen, die globale neurologische status beoordelen, en tests betreffende het plaatsen van ledematen, gebruikt om motorische reflexen te meten. Deze worden veelal gebruikt om dieren in de acute post-beroertefase te beoordelen. Bij longitudinale studies kunnen complexere tests worden gebruikt om sensomotorische functies (bijv. hoe lang het duurt om een sticker van voorpoten te verwijderen, over een balk lopen, rotarod of traptest) en cognitieve functies waaronder geheugen te meten (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 sensomotorische 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 trainingschema's, zijn hier niet opgenomen, maar voor een omvattend overzicht van het gebruik ervan, zie Schaar et al. (2010).

## Referenties

- Braeuninger S and Kleinschnitz C. Recent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009 Nov; 1:8.
- Freret T and Bouet V. Improvements of the Stroke Model Guidelines – Animal body weight and long-term functional concerns. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009; 2(2): 28-31
- Graham SM et al. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, 2004 Oct; 54(5): 486-496
- Yanamoto H et al. Evaluation of MCAo stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *ExpNeurol*, 2003 Aug; 182(2):261-74

- Liu S et al. Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st edition). Journal of experimental stroke and translational medicine, 2009 Jan 1;2(2):2-27.
- Schaar KL et al. Functional assessments in the rodent stroke model. Experimental & Translational Stroke Medicine, 2010; 2: 13; vrij toegankelijk op <http://www.etsmjournal.com/content/2/1/13>
- Virley et al. A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behaviour. J Cereb Blood Flow Metab, 2000;20: 563-582.

## Onderzoeksopzet

### **Werkzaamheid van een nieuw therapeutisch agens bij afsluiting van middelste hersenslagader (MCAO) m.b.v. intraluminale draad bij ratten**

In dit voorbeeld worden 40 jonge Sprague-Dawley-mannetjesratten (300-350g) onderworpen aan een permanente MCAO met gebruikmaking van de intraluminale filamentmethode onder algehele narcose. De ratten worden gerandomiseerd (n=10/groep) en krijgen hetzij carrier (10ml/kg) of een nieuw testagens (samenstelling A) toegediend in een dosis van 1, 3 of 10 mg/kg, dat gedurende 1 uur via een intraveneus infuus wordt aangebracht in een staartader, te beginnen 30 min na de MCAO. Vervolgdoses (hetzij carrier of samenstelling A in een dosis van 1, 3 of 10 mg/kg) zullen 6 uur en 24 uur na MCAO intraperitoneaal worden toegediend. Ratten zullen in eerste instantie in tweetallen worden gehuisvest in kooien met een ondoorlaatbare bodem met diep strooisel en nestmateriaal. Voeder zal in de periode voorafgaand aan de training worden beperkt om de traptest te vergemakkelijken, aangezien dit een taak is waarbij eetlust een motiverende factor is. Dieren worden *ad libitum* gevoederd vanaf 6 uur voorafgaand aan de operatie tot 6 dagen na de MCAO om postoperatief gewicht en herstel te verbeteren.

Het functionele resultaat zal dagelijks worden beoordeeld met behulp van een neurologisch scoresysteem (de Bederson-schaal; zie Schaar et al. 2010) en gedragstests (hoe lang het duurt om een sticker van de voorpoten te verwijderen en over een balk lopen); vanaf dag 7 na MCAO zal ook de traptest dagelijks worden uitgevoerd, om voldoende tijd te laten voor postoperatief herstel voordat voederbeperking weer wordt ingevoerd. Geen van de gedragstests zal naar verwachting significante angst veroorzaken. Op dagen 1, 7, 14 en 28 wordt Magnetic Resonance Imaging (MRI) uitgevoerd op geanestheerde ratten om de omvang van het letsel te beoordelen. Alle dieren worden 28 dagen na MCAO gedood.

### Initiële beoordeling vooraf en 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 het lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
Pre-operatieve training op gedragstests over een periode van 2-3 weken: hoe lang het duurt om een sticker van de voorpoten te verwijderen (voor contralaterale verwaarlozing), over een balk lopen (voor coördinatie van achterste ledematen) en traptest (voor het testen van vaardigheid om met voorpoten naar iets te reiken)	Minimale stress/angst kan worden veroorzaakt voordat dieren gewend raken aan de tests, aangezien het verrichten van tests gepaard gaat met het verhuizen van dieren naar nieuwe leefruimten	Geleidelijke gewenning aan tests  Kalme, empathische hantering	Verwijdering uit sessie als tekenen van angst worden geobserveerd  Dieren die binnen een vooraf bepaalde tijdslimiet geen baseline prestatie halen worden uitgesloten van het onderzoek
Voederbeperking (85-90% van vrije voedergewicht) pre-operatief en vanaf 7 dagen na MCAO om traptest te vergemakkelijken	Lichte honger; mogelijk frustratie en angst	Gewichtsverlies bedraagt niet meer dan 10%; is dit wel het geval, dan wordt de voederbeperking opgeheven	Als gedragsproblemen door voedergebrek worden waargenomen, zullen dieren uit het onderzoek worden verwijderd.
Onder algehele narcose, wordt	Pijn en hinder als gevolg van	Gebruik van passende en minimaal	Dieren worden op humane

<p>de MCA tijdelijk (90 min) afgesloten met behulp van een intraluminale draad via de halsslagader</p>	<p>operatie</p> <p>Potentieel voor onverwachte chirurgische complicaties, bijv. meningeale bloedingen, ipsilateraal netvliesletsel, intraluminale thrombusformatie, hersenoedeem hypothalamus betrokkenheid bij consequente 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</p> <p>Aversiviteit en potentiële effecten van anesthesie op fysiologische variabelen (zoals hypothermie, hypotensie, hypoxie)</p> <p>Geringe voedselinname als gevolg van verminderd bewustzijnsniveau, aangetast kauwen en geringe</p>	<p>aversieve anesthesiemiddelen, met passende pijnverdooving (d.w.z. werkzaam maar met minimale neuroprotectieve eigenschappen)</p> <p>Goed opgeleide chirurg die passende aseptische chirurgische technieken toepast (met regelmatige analyse van slagingspercentages)</p> <p>In stand houden van homeostase tijdens anesthesie</p> <p>Gebruik van gestandaardiseerde monofilamenten en operatietechniek om variabiliteit en complicaties als gevolg van omvangrijke beschadigingen te verminderen</p> <p>Intensieve postoperatieve zorg</p>	<p>wijze gedood als een van de volgende gebeurtenissen zich voordoet:</p> <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>
--	--	---	--

	<p>motiliteit, doorgaans in de eerste 48 uur na MCAO</p> <p>Locomotorische stoornis, die stress en/of frustratie teweeg kan brengen</p>	<p>gedurende eerste 3-5 dagen, waaronder externe warmtebronnen.</p> <p>Regelmatige controles van lichaamsgewicht; dagelijkse observatie en wondverzorging</p> <p>Eenvoudig toegankelijk voer en water tijdens de herstelperiode, of extra voeder (puree, vloeibaar) en hulp bij voeding indien noodzakelijk; rehydrateren (bijv. injectie van zoutoplossing) indien noodzakelijk</p>	
<p>Gedragstests (hoe lang het duurt om een sticker van de voorpoten te verwijderen en over een balk lopen) die dagelijks vanaf dag 1 tot dag 28 na MCAO worden uitgevoerd; traptest dagelijks uitgevoerd vanaf dag 7 na MCAO</p>	<p>Dieren kunnen de taken als stressvol ervaren als hun motorische vermogens zijn aangetast</p>	<p>Toe zien op gedragsindicatoren die wijzen op angst</p> <p>Dieren worden voortdurend geobserveerd door ervaren medewerkers</p>	<p>Doorgaans wordt een tijdslimiet (cut-off) vastgesteld om de gevraagde taak te verrichten, en wordt een definitieve score toegekend</p>



<p>Toediening van een nieuw therapeutisch agens langs subcutane/ intraveneuze/ intraperitoneale weg voor en/of na operatie (profylactisch/therapeutisch)</p>	<p>Voorbijgaande hinder gekoppeld aan toedieningsweg</p> <p>Geen bijwerkingen verwacht bij de toegediende dosisniveaus</p>	<p>Toediening overeenkomstige goede praktijken, langs de minst pijnlijke/beangstigende weg en met de minst pijnlijke/beangstigende technieken die verenigbaar zijn met de wetenschappelijke doelstellingen.</p> <p>Dieren zullen nauwlettend worden geobserveerd om bijwerkingen van testgeneesmiddelen op te sporen</p>	<p>Dieren zullen op humane wijze worden gedood als ernstige bijwerkingen van de nieuwe therapeutische agentia worden waargenomen</p>
<p>Longitudinale MRI onder narcose op dagen 1, 7, 14 en 28 na MCAO</p>	<p>Herhaalde anesthesie</p> <p>Aversiviteit en potentiële effecten van anesthesie op fysiologische variabelen (zoals hypothermie, hypotensie, hypoxie)</p>	<p>Gebruik van passende en minimaal aversieve narcosemiddelen</p> <p>In stand houden van homeostase tijdens narcose, waaronder vloeistoftherapie voor of tijdens ingreep als er problemen zijn met uitdroging en verwarming om normothermie te behouden</p>	<p>Dieren die niet volledig herstellen van anesthesie zullen worden geëuthanaseerd</p> <p>Dieren zullen op humane wijze worden gedood als homeostase niet in stand kan worden gehouden na herstel</p>

## **Analyse**

Dit model wordt beschouwd als ERNSTIG vanwege de chirurgische ingreep, de negatieve (maar meestal voorbijgaande) gevolgen van de MCAO op het welzijn van het dier, en de mogelijkheid dat zich significante peri-operatieve complicaties voordoen. De negatieve gevolgen op het welzijn van het dier kunnen echter worden verminderd door intensieve postoperatieve zorg gedurende ten minste de eerste 48 uur, en nauwlettende monitoring in de fase daarna – waarbij onmiddellijk actie wordt ondernemen wanneer zich problemen voordoen. Uit experimenteel oogpunt kan verfijning en standaardisering van elke afzonderlijke procedure leiden tot een verminderde incidentie van complicaties en variabiliteit, en daardoor tot betere gegevenskwaliteit en een vermindering van het aantal gebruikte dieren.

### **Bijgevolg moet de ernst vooraf worden ingedeeld als ERNSTIG**

#### **Zou de ernst MATIG kunnen zijn?**

Hoewel dit model vooraf altijd als ERNSTIG zou moeten worden aangemerkt om de hierboven geschetste redenen, kan de incidentie van de ernstige effecten worden verminderd door toedoen van ervaren gebruikers, toezicht door doorgewinterde dierenartsen en dierverzorging, en overeengekomen vroegtijdige interventies als zich complicaties voordoen. Een MATIGE ernst zou in sommige gevallen kunnen worden toegestaan, maar enkel per geval voor individuele onderzoeksgroepen die aantoonbare ervaring hebben met dit specifieke model en erom bekend staan het model te kunnen gebruiken zonder meer dan gemiddeld lijden te veroorzaken.

#### **Klinische observatie**

Dieren worden nauwlettend in de gaten gehouden in de periode na de operatie. Pijnverdooving en lokale ondersteunende therapie wordt waar nodig 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

**Alle dieren, behalve één in de placebogroep, herstelden zonder onverwachte complicaties van de operatie, dankzij de intensieve peri-operatieve ondersteuning die werd geboden.**

- Alle 10 met een carrier behandelde dieren hadden gedurende het hele onderzoek de laagste neurologische score, evenals een zwakke performance op de gedragstests vergeleken met behandelde dieren. De klinische score was vergelijkbaar met die van behandelde dieren in de fase die onmiddellijk volgt op de MCAO (eerste 48 u), daarna werden verschillen vastgesteld tussen dieren in de placebogroep:
  - 1/10 dieren moest op dag 2 na de operatie worden geëuthanaseerd doordat ze meer dan 20% van hun lichaamsgewicht hadden verloren (ondanks extra voeding en rehydratie).  
**Beoordeling: ERNSTIG**
  - 6/10 ontwikkelden matige neurologische stoornissen, maar vertoonden mettertijd een minimale verbetering van de klinische score  
**Beoordeling: ERNSTIG**
  - 3/10 dieren ontwikkelden matige neurologische stoornissen, en hun klinische score liep mettertijd geleidelijk terug, mogelijk als gevolg van hun vermogen om te compenseren en zich aan te passen aan langdurige neurologische stoornissen  
**Beoordeling: MATIG**
- Alle 20 met samenstelling A in lagere doses (1 en 3 mg/kg) behandelde dieren vertoonden een verbetering van hun neurologische score 48 uur na MCAO, evenals een verbetering van hun klinische score.  
**Beoordeling: MATIG**
- Alle 10 met samenstelling A in de hoogste dosis (10 mg/ kg) behandelde dieren vertoonden een verbetering van hun neurologische score vergeleken met placebogroep vanaf 24 uur na MCAO, slechts minimaal (5%) lichaamsgewichtverlies 24 uur na operatie, en significante verbetering van de klinische score vanaf 48u na MCAO  
**Beoordeling: MATIG**

## Beoordeling van werkelijke ernst

7 dieren werden aangemerkt als **ERNSTIG**; 33 dieren werden aangemerkt als **MATIG**

## Scoresysteem

Ernst wordt beoordeeld aan de hand van een combinatie van algehele klinische observaties (lichaamsgewicht, voorkomen, gedrag, kooiomgeving) en een procedurespecifieke neurologische evaluatie. De Bederson-schaal is een globale neurologische beoordeling die werd ontwikkeld om neurologische schade na een beroerte te meten. Een scoreschaal van 0-3 wordt gebruikt, waarbij 0= normaal en 3= hoogste niveau van invaliditeit. Tests omvatten flexie van voorste ledematen, weerstand tegen lateraal duwen en rondjes draaien.

score 0: geen waarneembare stoornis

score 1: flexie van voorste ledematen

score 2: verminderde weerstand tegen lateraal duwen (en flexie van voorste ledematen), zonder rondjes draaien

score 3: zelfde gedrag als score 2, zonder rondjes draaien

HEP: humaan eindpunt

	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

<b>Acties</b>	
<b>Score 1</b>	Monitoringfrequentie herzien
<b>4</b>	Extra verzorging bieden, bijv. extra vloeistoffen en natte puree
<b>5</b>	Voortschrijding doornemen met dierenarts
<b>12</b>	Humaan eindpunt vaststellen

Zware pilo-erectie	3
<b>Gedrag</b>	
Enigszins abnormale gang	1
Uiterst abnormale gang	2
Significante mobiliteitsproblemen	3
Immobiliteit >24u	HEP
Gespannen en nerveus bij hantering	2
Merkbaar angstig bij hantering, bijv. trillen, vocaliseren, agressief	3
<b>Milieu</b>	
Enigszins ongeordend nest	1
Nest nauwelijks herkenbaar	2
Geen nest	<b>3</b>
<b>Neurologische score</b>	
Flexie van de voorste ledematen	1
Verminderde weerstand tegen lateraal duwen (flexie van voorste ledematen), zonder rondjes draaien	2
Zelfde gedrag als score 2, zonder rondjes draaien	3

**Acties – Aangezien complicaties doorgaans optreden in de herstelfase direct na de operatie**, is zorgvuldige monitoring en deskundig oordeel van cruciaal belang gedurende de eerste 24 uur om ervoor te zorgen dat negatieve gevolgen in kaart worden gebracht en acties worden ondernomen om deze te bestrijden, en dat dieren op humane wijze worden gedood als hun lijden de categorie 'ernstig' overschrijdt.

**Voorbeeld van een observatieblad (dagen 0-4)**

<b>Dag</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b><u>Voorkomen</u></b>					
Lichaamsgewicht (g) (score)	320 (0)	292 (1)	285 (2)	287 (1)	292 (1)
<b><u>Vacht</u></b>					
Onverzorgd/pilo-erectie	1	1	0	1	0
<b><u>Gedrag</u></b>					
Gang	3	2	2	2	1
Reactie op hantering	0	0	2	0	0
<b><u>Milieu</u></b>					
Nest	3	2	1	0	0
<b><u>Procedurespecifieke neurologische score</u></b>	2	2	1	1	1
Totaalscore	9	8	8	5	3
Letselomvang (MRI-scan)*		11 %			

<b><u>Overige observaties</u></b>	Herstelde probleemloos van operatie, geen complicaties  Gedoseerd op 30 min en 6 u	Beweegt heen en weer in de kooi en heeft geprobeerd een nest te maken	Gedragstests, in eerste instantie angstig maar allemaal voltooid, nest ziet er beter verzorgd uit	Vacht vandaag minder goed verzorgd, maar gewicht stabiel en goed nest	Gedragstests voltooid, minder angstig en gang aanzienlijk verbeterd
-----------------------------------	--	---	---	---	---

\* '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, dierenverzorging en procedures mogelijk te maken.

## Voorbeelden ter illustratie van de ernstbeoordeling

### Model 5 – Productie van polyklonale antilichamen bij konijnen

Laatst bijgewerkt: 05/02/2013

#### Algemene context

Het voornaamste doel van de productie van antistoffen in laboratoriumdieren is om hooggeconcentreerde antiserums met een hoge affiniteit te verkrijgen voor gebruik bij experimenten of diagnostische tests.

Moderne biologie en biochemie zijn in hoge mate afhankelijk van betrouwbare, uiterst specifieke antilichamen voor gebruik in het kader van technieken als immunohistochemie, ELISA's, immunoprecipitatie, en immunoblot. De productie van grote hoeveelheden specifieke antilichamen die gericht zijn op eiwitten of peptiden is cruciaal voor het succes van talloze fundamentele en toegepaste onderzoeksprogramma's.

In dit voorbeeld wordt een konijn gebruikt om antilichamen te produceren op kleine peptiden waarvan verondersteld wordt dat ze een belangrijke rol spelen bij de regulering van de celdeling, in het kader van een onderzoeksprogramma dat biochemisch onderzoek naar celdeling bij zoogdieren omvat.

#### Referenties

- Canadian Council on Animal Care; guidelines on antibody production (2002). Te downloaden op [http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody\\_production.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf)
- EFPIA/ECVAM (Diehl K-H et al.) (2001) A good practice guide to the administration of substances and the removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21**: 15-23
- JWGR (2001) Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals* **35**: 1-41
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA & Leach MC (2012) Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS ONE* **7(9)**: e44437 (vrij toegankelijk, <http://www.plosone.org>)
- Leenars M, Hendriksen CFM (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendation. *ILAR Journal* **46**:269-279
- Stills HF (2005) Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal* **46**:280-293



- UFAW/RSPCA (2008) *Refining Rabbit Care: A Resource for Those Working With Rabbits in Research*. Southwater, UK: RSPCA (gratis te downloaden op <http://www.rspca.org.uk/researchrabbits>)

## Onderzoeksopzet

Uit eerdere ervaringen is gebleken dat een konijn voldoende materiaal moet opleveren voor elke peptide. Het konijn zal worden gehuisvest in een box in een stabiele groep van compatibele konijnen (ook gebruikt voor productie van antilichamen), met voldoende ruimte voor verfijning, oefening en normaal sociaal gedrag (UFAW/RSPCA 2008). Het dier zal worden geïmmuniseerd met een mengsel van antigenen/adjuvantia. Op vooraf vastgestelde tijdstippen zullen geringe bloedmonsters worden genomen om te bepalen of de immunisering geslaagd is. Wanneer een geschikte concentratie antilichamen is verkregen, zal het dier onder diepe narcose zonder herstel worden uitgebloed om de antilichamen in het bloed te verzamelen.

De hantering van konijnen kan stressvol zijn en moet alleen worden uitgevoerd door deskundige en empathische medewerkers. Het gedrag van konijnen kan moeilijk te interpreteren zijn en het is goede praktijk om op de hoogte te blijven van de literatuur over het gedrag en welzijn van konijnen. Uit recente literatuur is bijvoorbeeld gebleken dat konijnen onder bepaalde omstandigheden ‘pijngezichten’ kunnen vertonen (Keating et al. 2012) en per geval moet worden nagegaan in hoeverre dit kan worden gebruikt om hun welzijn te beoordelen.

Vanwege de geringe immunogeniteit van de korte-ketenpeptide zal het noodzakelijk zijn om het toe te dienen in combinatie met een adjuvans. Freund's compleet adjuvans (FCA) is eerder gebruikt, maar inmiddels zijn synthetische adjuvantia beschikbaar die voor deze procedure tevens werkzaam zijn en een minimale irriterende werking hebben.

## Initiële beoordeling vooraf en 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 het lijden tot een minimum beperkt?	
		Methodologie en interventies	Eindpunten
Immunisering met antigeen en	Hinder na injectie	Injectievolume, formulering en	Dieren zullen op humane

<p>adjuvans; drie subcutane injecties op dagen 8, 22 en 37</p>	<p>Niet-pijnlijke zwellingen kunnen zich vormen als reactie op de adjuvans</p> <p>Mogelijkheid (zeldzaam) van verzwering op de injectieplaats</p>	<p>frequentie zullen overeenstemmen met goede praktijken en richtlijnen (bijv. EFPIA/ECVAM of JWGR), doorgaans maximaal vier injectieplaatsen en 0,25 ml per injectieplaats</p> <p>Eventuele zweren zullen onmiddellijk door een dierenarts worden behandeld</p>	<p>wijze worden gedood als er tekenen zijn die wijzen op langdurige hinder, pijn of angst (bijv. aanhoudende aandacht voor injectieplaatsen of zwellingen), of wanneer zich zweren vormen die niet genezen</p>
<p>Bloedmonsters om reacties van antilichamen te beoordelen (maximaal 5 monsters)</p>	<p>Vangen, hanteren en in bedwang houden, hetgeen stressvol kan zijn.</p> <p>Lichte hinder als gevolg van de prik</p> <p>Gering risico van bloeding of vorming van hematoom</p>	<p>Bloed wordt afgenomen uit oppervlakkige (oor) ader.</p> <p>Geringe bloedmonsters (&lt;5ml) enkel om concentraties antilichamen te controleren</p> <p>Druk uitoefenen op de bemonsteringslocatie</p>	<p>Als het dier gestrest raakt door de procedure, zal de bemonstering worden uitgesteld totdat het gedrag van het dier weer normaal is</p>
<p>Uitbloeden onder algehele narcose</p>	<p>Lichte hinder en mogelijke aversie tegen de agens tijdens de inductie van narcose</p>	<p>Minimaal aversief narcosemiddel gebruikt</p>	<p>Dier blijft tot aan dood onder narcose</p>

## **Analyse**

Enkel lichte ernst wordt verwacht dankzij de verfijningen op het gebied van houderij en verzorging, goede toedienings- en bemonsteringspraktijken, en een ruime keus aan minimaal irriterende adjuvantia.

### **Bijgevolg moet de ernst vooraf worden ingedeeld als LICHT**

#### ***Zou de procedure verder kunnen worden verfijnd?***

De mogelijkheid om minimaal irriterende adjuvantia en minder aversieve narcosemiddelen te gebruiken moet regelmatig worden geanalyseerd, door de literatuur te bestuderen en de kwestie te bespreken met collega's. Een programma om jonge konijnen te laten wennen aan hantering zou kunnen worden opgezet om stress verder te verminderen (UFAW/RSPCA, 2008).

## **Klinische observaties**

Aangezien enkel lichte bijwerkingen werden verwacht in dit onderzoek, werd een basaal monitoringsysteem gebruikt; d.w.z. het dier werd dagelijks gecontroleerd en observaties werden vastgelegd, maar een gestructureerd registratieblad werd niet noodzakelijk geacht.

Aan het einde van dit voorbeeld is een illustratie van een observatieblad opgenomen.

### Beoordeling van werkelijke ernst

Enkele voorbijgaande, lichte zwellingen op een injectieplaats werden geregistreerd, maar behandeling was niet noodzakelijk. Het konijn vertoonde korte tijd enige aandacht voor de injectieplaatsen, maar dit wees naar het oordeel van de onderzoekers slechts op lichte hinder. 'Pijngezichten' werden niet waargenomen.

Negatieve gevolgen van de feitelijke bloedafname uit de oorader werden niet waargenomen.

De werkelijke ernst voor dit dier werd aangemerkt als **LICHT**.

### Voorbeeld van observatieblad

Productie van antilichamen bij konijnen – Procedure- & observatieblad		
Datum	Lichaamsge- wicht (kg)	Opmerkingen
01/03	3,5	Bloedafname – 5ml uit oorader ; geen negatieve gevolgen waargenomen
02/03		Geen abnormaliteit geconstateerd (NAD)
06/03		NAD
07/03		NAD
08/03	3,6	Geïmmuniseerd – 0,25 ml x 2 subcutane injectieplaatsen, gedurende enkele minuten enige aandacht voor injectieplaatsen (likken), vervolgens weer normaal

09/03		NAD
10/03		NAD
11/03		NAD
12/03		Lichte, niet-pijnlijke zwelling op injectieplaats
13/03		Nog altijd zwelling op injectieplaats, niet erger
14/03		Zwelling op injectieplaats nog altijd aanwezig maar niet pijnlijk bij palpatie
15/03	3,6	Zwelling verdwenen, alles weer normaal

21/03		NAD
22/03	3,6	Geïmmuniseerd – 0,25 ml x 2 subcutane injectieplaatsen, kortstondige aandacht voor injectieplaatsen

28/09		NAD
29/03	3,7	NAD
30/03		Bloedafname – 2 ml uit oorader, geen negatieve gevolgen

05/04		NAD
06/04	3,6	Geïmmuniseerd – 0,25 ml x 2 injectieplaatsen

14/04	3,6	NAD
15/04		Bloedafname – 2 ml uit oorader, geen negatieve gevolgen

26/04		NAD
27/04	3,6	Uitbloeden onder algehele narcose, geen negatieve gevolgen

Aangetoond moet kunnen worden dat het dier ten minste dagelijks is gecontroleerd – d.w.z. op het registratieblad (zie boven) of op het blad met gegevens over de leefruimte.

**Voorbeelden ter illustratie van de ernstbeoordeling**  
**Model 6 – Productie en instandhouding van genetisch gemodificeerde dieren**

Laatst bijgewerkt:05/02/2013

**1. Algemene context**

Het gebruik van genetisch gemodificeerde dieren in onderzoek heeft inzicht verschaft in de werking van genen en hun bijbehorende eiwitten. Verschillende fenotypen kunnen uiteenlopende effecten hebben op het welzijn van dieren, en sommige kunnen pijn, lijden of angst veroorzaken. Hoewel sommige fenotypen en uitkomsten voorspelbaar zijn, kunnen zich talloze onverwachte of secundaire kenmerken voordoen bij het creëren van transgene lijnen, en daardoor is het niet altijd mogelijk om ernst goed te voorspellen. In de praktijk is het fenotype in veel transgene lijnen niet aangetast en kunnen beoordelingsprotocollen worden opgesteld om ervoor te zorgen dat eventuele negatieve fenotypen kunnen worden opgespoord. Het verwachte fenotype kan vaak worden geassocieerd met onvoorziene secundaire fenotypen die zich op verschillende tijdstippen manifesteren en nadelig kunnen worden beïnvloed door diverse omgevingsfactoren.

Bij het beoordelen van de feitelijke schade voor het dier, moet rekening worden gehouden met talloze factoren, zoals het type mutatie, genotype, fenotype en fokstrategie (bijv. vermijden van schadelijke homozygote fenotypen door heterozygoten x wild-type te paren), en de aard van eventuele aanvullende wetenschappelijke of houderijpraktijken en de potentiële effecten van al deze factoren. Systematische en goed getimede observaties, zowel tijdens populatiegroei als gedurende de experimentele fase van een populatie, zijn noodzakelijk om de welzijnstoestand van het dier goed te kunnen beoordelen.

Nieuwe lijnen moeten zorgvuldig worden gemonitord en worden onderworpen aan een standaard welzijnsbeoordeling. Alle lijnen moeten individueel worden beoordeeld door naar behoren opgeleide en deskundige medewerkers tijdens groei en instandhouding van populaties, en informatie over specifiek geobserveerde bijwerkingen moet worden verzameld en gerapporteerd. Bevoegd personeel moet eventuele wetenschappelijke procedures toepassen en, in samenspraak met het verzorgend personeel, eventuele effecten op de dieren monitoren en vastleggen. Humane eindpunten moeten vooraf worden bepaald met betrekking tot parameters als gewichtsverlies, lichaamsconditie en zorgwekkende gedragingen, evenals specifieke ontwikkelingskarakteristieken. Dieren mogen niet in leven worden gehouden als ze de

voorspelde ernstlimiet overschrijden, tenzij ze van eminent wetenschappelijk belang zijn, en dan nog alleen met toestemming van de bevoegde autoriteit.

De aard, het tijdstip en de duur van observaties zullen afhangen van een aantal factoren die geen verband houden met de toegepaste mutatie. Zo kunnen de genetische achtergrond en omgevingsomstandigheden waaronder de dieren worden gehouden, de expressie van het fenotype aanzienlijk veranderen. Deze specifieke factoren moeten naar behoren worden vastgelegd om betere vergelijkingen tussen faciliteiten en monitoring tussen transgene dieren in het algemeen mogelijk te maken. Daarnaast moet ook rekening worden gehouden met de levensduur van elke lijn binnen een specifieke faciliteit, aangezien sommige fenotypen in een laat stadium ontstaan en daardoor alleen zullen worden geobserveerd als de dieren langduriger worden gehouden.

## Referenties

RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (te downloaden op <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

Wells DJ et al (2006) *Assessing the welfare of genetically altered mice* *Laboratory Animals* **40(2)**: 111-114 (te downloaden op <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=356&page=231&skin=0>)

## 2 Voorbeelden

De drie voorbeelden in de hoofdstukken 2.1 t/m 2.3 hieronder illustreren hoe ernst kan worden beoordeeld in transgene muizen, onder meer door analyse van ontwikkelingsmijlpalen, effect van de procedure en populatiegroei. Elk voorbeeld richt zich op de principes van ernstbeoordeling, zonder in te gaan op elk mogelijk scenario tijdens de groei van de populatie.

Elk model zal voortvloeien uit gestandaardiseerde procedures die chirurgische preparatie van gevasectomiseerde mannelijke fokdieren, de manipulatie van embryo's en hun chirurgische implantatie in schijnzwangere vrouwtjes vereisen. Goede praktijk wordt verondersteld ten aanzien van asepsis, pijnbestrijding en de deskundigheid van de chirurg.



De aanwezigheid in uit founders of kiembaan voortkomende nakomelingen zal worden aangetoond met weefselmonsters die worden verkregen als een bijproduct van identificatie (oorkerving) of door de minst invasieve methode die weefsel voor genotypebeoordeling oplevert. De fenotyperingsstrategie voor elke lijn zal afhangen van het gen, het onderzoeksveld en de voorspelde effecten. De ernst zal worden beoordeeld aan de hand van een reeks gestandaardiseerde observaties.

## 2.1 Transgeen muismodel – *GeneA*<sup>tm1a(Funding)Lab</sup>

### 2.1.1 Algemene context

Een populatie muizen werd tot stand gebracht met een nieuwe mutatie in *GeneA* dat gericht was op een embryonale stamcellijn met een C57BL/6 achtergrond met een onbekend fenotypisch potentieel. Het model werd in stand gehouden met een C57BL/6 achtergrond. Zodra de kiembaantransmissie van G1-muizen tot stand was gebracht, werd een welzijnsbeoordeling uitgevoerd op 30 jongen uit 3-5 nesten van onafhankelijke paringen. De nakomelingen werden gemonitord op vaste mijlpalen in de ontwikkeling van de populatie – bij de geboorte, 14 dagen na de geboorte (in samenhang met identificatie van jongen en herstel van weefsel voor genotypering) en bij het spenen. Een passend scoreblad werd ontwikkeld op basis van een GA Welfare Assessment Scheme (Wells et al. 2006). Dierwetenschappers observeerden de jongen aan de kooizijde, terwijl populatiebeheerders de genotypische verhoudingen monitorden. De muizen werden na het spenen waar mogelijk groepsgewijs gehuisvest in afzonderlijk geventileerde kooien met strooisel, nestmateriaal en milieuverrijking. Dierwetenschappers voerden beoordelingen aan de kooizijde uit tijdens hun dagelijkse interacties totdat de muizen geslachtsrijp waren. rasdieren en toekomstige fokdieren werden over langere tijd beoordeeld om leeftijdsgerelateerde negatieve welzijnseffecten te monitoren en te registreren. Eventuele observaties werden vergeleken met de achtergrondstam en de relevantie ervan werd beoordeeld.

### 2.1.2 Beoordeling vooraf

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 het lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
<b>Baseline-effecten van genetische modificatie</b>	<p>Genetische modificatie kan leiden tot negatieve klinische effecten</p> <p>In gevallen waar deze onvoorspelbaar zijn zou elke aanwijzing dat transgene dieren abnormale lichamelijke of gedragsparameters vertonen (d.w.z. waarvan bekend is dat ze zich voordoen in aan genetische achtergrond gerelateerde fenotypes en/of wildtype controlegroepen) kunnen duiden op een welzijnsprobleem</p>	<p>Permanente monitoring aan kooizijde</p> <p>Welzijnsbeoordeling op vaste tijdstippen in de ontwikkeling: geboorte, spenen en geslachtsrijpheid</p> <p>Naargelang van de aard van eventueel vastgestelde negatieve gevolgen, zullen waar mogelijk passende verbeteringen worden aangebracht, zoals aangepaste fokstrategieën of verfijningen van houderijpraktijken (bijv. meer nestmateriaal om aangetaste thermoregulering te ondersteunen)</p>	Dieren zullen worden gedood als matige ernst wordt overschreden
<b>Weefselmonsters voor genotypering</b>	Potentiële pijn en/of angst veroorzaakt door de weefselbemonsteringsmethode, bijv. oorponsen/oorkerving of 'toppen' van de staart	Wanneer dieren worden geïdentificeerd met behulp van oorkerving, is het goede praktijk om het oorweefsel waar mogelijk te	Niet van toepassing, aangezien de procedure 'eenmalig' moet zijn en het onwaarschijnlijk is dat pijn of angst zodanig van aard is dat dieren

	<p>Staartbiopsie wordt veel gebruikt wanneer grotere hoeveelheden DNA vereist zijn, maar kan zowel kortstondige als langdurige pijn veroorzaken (laatstgenoemde door neuroomvorming)</p>	<p>gebruiken voor fenotypering</p> <p>Voor het ‘toppen’ van de staart moet een zo gering mogelijk deel van de staart worden genomen (rekening houdend met het feit dat herhaalde bemonstering uiterst onwenselijk is), indien nodig onder narcose en pijnverdooving, en moet onmiddellijk actie worden ondernomen tegen overmatig bloeden</p> <p>Nieuwe, minder invasieve technieken moeten gemonitord, lokaal geëvalueerd en waar mogelijk toegepast worden</p>	<p>op humane wijze moeten worden gedood</p>
<b>Fenotypering</b>	<p>Stress veroorzaakt door hantering of fenotypische analyse, bijv. wanneer een dier in een vreemde omgeving wordt geplaatst, toediening van experimentele samenstellingen om een respons op te wekken, infectiemonitoring, anesthesie en in bedwang houden voor beeldvorming, etc.</p>	<p>Opleiding van personeel voor het verrichten van fenotypering tijdens deskundige, empathische en gestandaardiseerde hantering en observaties</p> <p>Gebruik van anesthesie tijdens beeldvorming of pijnlijke procedures. Structureren van fenotypische tests om van de minst</p>	<p>Wanneer de mutatie een strenge respons op een fenotypische analyse uitlokt, worden humane eindpunten bereikt en worden de dieren op humane wijze gedood</p>

		invasieve (bijv. observatie van gedrag in een open ruimte) tot de meest invasieve (bijv. procedures die anesthesie vereisen)	
--	--	--	--

Het onderzochte gen is een nieuwe mutant met onbekende negatieve effecten. Ervaring binnen deze instelling heeft aangetoond dat het overgrote deel van soortgelijke modellen veelal een licht fenotype vertoont. Nu en dan zal een model echter onverwacht matige klinische symptomen vertonen en om die reden zou dit voorbeeld vooraf worden ingedeeld als MATIG.

### 2.1.3 Resultaten

*Initiële beoordeling bij pasgeboren dieren (bij geboorte):*

<b>Kleur van jongen (alleen voor pasgeborenen)</b>	Normaal
<b>Activiteit van jongen (alleen voor pasgeborenen)</b>	Normaal
<b>Milk spot (alleen voor pasgeborenen)</b>	Aanwezig
<b>Strooisel</b>	Alle jongen stemden overeen met de achtergrondparameters met betrekking tot omvang en homogeniteit van het strooisel , en ontwikkeling en groei van jongen

*De volgende indicatoren werden geobserveerd 14 dagen na de geboorte en tijdens het spenen:*

<b>Voorkomen</b>	Alle jongen waren morfologisch ‘normaal’ Er waren geen aanwijzingen voor misvorming
<b>Omvang, beveeldheid en groei</b>	Normale groei, volgens standaard groeicurve voor de achtergrondstam
<b>Vacht</b>	Normaal
<b>Gedrag – houding, gang, activiteit en interacties met de omgeving</b>	Normaal gedrag en interacties tussen alle dieren in de kooi; hyperactiviteit of agressie werden niet waargenomen.
<b>Klinische symptomen</b>	Geen
<b>Relatieve omvang</b>	Normaal in vergelijking tot de achtergrond
<b>Aantallen</b>	Sterftecijfer voorafgaand aan het spenen was normaal vergeleken met de achtergrond

### **Klinische observaties**

Alle observaties en statistieken voor pasgeboren jongen werden aangemerkt als normaal vergeleken met de genetische achtergrond (C57BL/6) met homozygote, heterozygote en wildtype muizen die werden geboren bij normale Mendeliaanse ratio's.

Toen ze 4 weken oud waren werden de homozygote en wildtype controlemuizen (7+7) over een periode van 16 weken onderworpen aan een reeks observationele en lichte procedurettests zoals SHIRPA, dysmorfologie, open veld, bloed klinische chemie, DEXA en Faxitron-beeldvorming. Na afloop van dit experiment vertoonde de fenotypische analyse een afname van de glucoseafbraak bij homozygote muizen na

een intraperitoneale glucosetolerantietest (ipGTT). Hoewel de glucoseafbraak tijdens de procedure afnam, keerden alle dieren na de procedure terug naar hun uitgangstoestand en werden verder geen negatieve gevolgen vastgesteld.

#### **2.1.4 Analyse van de resultaten**

##### **Beoordeling van de werkelijke ernst**

Na totstandbrenging van de populatie werden voor de instandhouding en uitbreiding van de populatie heterozygote en wild-type muizen gebruikt. Bij de muizen die werden gebruikt voor voortplanting en instandhouding, werden geen pathologische fenotypen waargenomen, en derhalve ondervonden deze geen negatieve effecten. Aangezien geen pathologisch fenotype wordt verwacht, kon deze lijn zonder projectvergunning homozygoot worden gemaakt en in stand worden gehouden.

Het paren van heterozygote x heterozygote muizen leverde homozygote muizen op. Een groep van deze muizen werd gebruikt voor een standaard fenotypering bestaande uit een reeks lichte protocollen, waaronder het aanbrengen van een naald voor bloedbemonstering tijdens de intraperitoneale glucosetolerantietest. Wild-type controlegroepen werden tegelijkertijd aan de tests onderworpen. Het cumulatieve effect op de muizen zou licht zijn geweest, vanwege de bloedbemonstering en daaropvolgende fenotyperingsprocedures, in tegenstelling tot het algehele effect van de genetische modificatie.

##### **Samenvatting**

Fokken en in stand houden – geen negatieve gevolgen

Homozygote + controlemuizen – LICHT– vanwege de screeningtests (niet het effect van de genetische modificatie)

**Deze transgene muislijn heeft een niet-pathologisch fenotype. Het fokken van bestendige lijnen zou krachtens de richtlijn geen projectvergunning vereisen.**

## 2.2 Transgeen muismodel – *Tg(GeneB)<sup>Labcode</sup>*

### 2.2.1 Algemene context

Een populatie genetisch gemodificeerde muizen met een overexpressie van een transgen wordt tot stand gebracht als een model om een vorm van kanker te bestuderen. De lijn wordt gecreëerd in een C57BL/6 achtergrond. Het ontstaan van de tumor en de snelheid waarmee deze groeit kan echter niet worden gedefinieerd en zal moeten worden beoordeeld in het kader van de karakterisering van het model. Zodra lijnen zijn gecreëerd zal een welzijnsbeoordeling als beschreven in hoofdstuk 2.1 worden uitgevoerd. De meest bruikbare lijn zal worden uitgebreid om dit type leukemie te bestuderen.

### 2.2.2 Beoordeling vooraf

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 het lijden tot een minimum beperkt?	
	Negatieve gevolgen	Methodologie en interventies	Eindpunten
<b>Beoordeling en karakterisering van tumorontwikkeling</b>	Gewichts- en conditieverlies zullen voortschrijden naarmate de kanker zich ontwikkelt	De interventies zullen worden gebaseerd op dagelijkse observaties aan de hand van criteria zoals gewichtsverlies, verlies van lichaamsconditie, lusteloosheid, etc.	Ras- en fokdieren die klinische symptomen vertonen welke niet samenhangen met experimentele procedures, zoals gewichtsverlies van meer dan 15%, dofte vacht, en lusteloosheid, zullen op humane wijze worden gedood
	Subcutane zwellingen kunnen hinder	Dagelijkse observaties en	Dieren worden op humane wijze

	<p>veroorzaken, normaal gedrag, postuur of voortbeweging nadelig beïnvloeden</p> <p>Dieren zijn wellicht vatbaarder voor ziekte vanwege een verzwakt immuunsysteem</p>	<p>monitoring van algehele gezondheidstoestand en tumorgroei</p>	<p>gedood als de tumor verzweert, of normaal gedrag, postuur of voortbeweging belemmert, of een diameter van meer dan 1,2 cm heeft</p> <p>Dieren die tekenen van intercurrente ziekte vertonen zullen op humane wijze worden gedood</p>
--	--	--	---

Het onderzochte model zal worden gemuteerd om de voorspelde genetische stoornis teweeg te brengen. Het ontstaan van ziekte kan niet eenvoudig worden voorspeld maar de klinische symptomen kunnen vooraf worden vastgelegd zodat het ontstaan kan worden gekarakteriseerd. Zodra het eenmaal gekarakteriseerd is moet het model in stand worden gehouden, zodat het kan worden gebruikt tijdens experimentele vervolgstudies naar potentiële behandelingen voor dit type kanker. Dit voorbeeld zou vooraf worden ingedeeld als MATIG.

### 2.2.3 Resultaten

Welzijnsbeoordelingen werden uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 2.2 hierboven. Er werden geen abnormaliteiten geconstateerd in ontwikkelingsmijlpalen en groei tot aan geslachtsrijpheid. De populatie werd uitgebreid met rasdieren en toekomstige fokdieren die vanaf een leeftijd van 10 weken werden gepaard om de populatie op peil te houden en nieuwe proefdieren voort te brengen. Dieren werden gedurende deze hele periode gemonitord en tumorontwikkeling werd vastgelegd vanaf een leeftijd van 18 weken in 60% van de dieren die drager waren van de mutatie. Het klinische verloop van de ziekte lag tussen 4 en 6 weken, waarna de dieren moesten worden geëuthanaseerd.



## 2.2.4 Analyse van de resultaten

### Beoordeling van de werkelijke ernst

60% van de dieren die de mutatie droegen ontwikkelden tumoren vanaf een leeftijd van 18 weken. De fokstrategie paarde dieren vanaf een leeftijd van 10 weken. De kans dat fokparen tumoren ontwikkelden werd voldoende groot geacht om het fokken en in stand houden te wijzigen. Fokparen werden vervolgens vanaf een leeftijd van 6 weken gepaard en de paringen ontbonden door de mannelijke fokdieren te doden bij een leeftijd van 12 weken. Vrouwelijke ras- en fokdieren werden dagelijks gemonitord om vroegtijdige symptomen van tumorontwikkeling op te sporen. Dieren die niet werden gebruikt of vereist werden op humane wijze gedood voordat sprake was van klinische symptomen.

### Samenvatting

Dieren jonger dan 18 weken – geen negatieve gevolgen

Dieren vanaf 18 weken die tumoren ontwikkelen – LICHT dankzij in een vroege fase vaststelbare klinische eindpunten

Dieren vanaf 18 weken die tumoren ontwikkelen en – LICHT of MATIG naargelang van de hantering van klinische eindpunten.

## 2.3 Transgeen muismodel – *GeneC<sup>tm1a(Funding)Lab</sup>*

### 2.3.1 Algemene context

Een populatie muizen met een mutatie in *GeneC* gericht op een embryonale stamcellijn afgeleid van de C57BL/6 achtergrond met een bekend fenotypisch potentieel werd tot stand gebracht om gedrag en geheugen te testen. Het model werd in stand gehouden op een C57BL/6 achtergrond. Zodra de kiembaantransmissie van G1-muizen tot stand was gebracht, werd een basale welzijnsbeoordeling uitgevoerd.

### 2.3.2 Beoordeling vooraf

Evenals in hoofdstuk 2.1 is het onderzochte gen een nieuwe mutant. De bedoeling is het model te gebruiken bij toekomstig gedragsonderzoek om de werkzaamheid van nieuwe farmaceutische samenstellingen te testen. Ervaring binnen deze instelling heeft aangetoond dat het overgrote deel van soortgelijke modellen veelal een licht fenotype vertoont. Nu en dan zal een model echter onverwacht matige klinische symptomen vertonen en om die reden zou dit voorbeeld vooraf worden ingedeeld als MATIG.

### 2.3.3 Resultaten

Alle observaties en ratio's werden aangemerkt als normaal vergeleken met de genetische achtergrond van dit model (C57BL/6) met homozygote, heterozygote en wildtype muizen die werden geboren bij normale Mendeliaanse ratio's.

Toen ze 4 weken oud waren werden de homozygote en wildtype controlemuizen onderworpen aan een reeks observaties en tests om leren en geheugen te beoordelen. Deze tests waren uitgevoerd over een periode van 10 weken. Na afloop van deze fenotypische analyse werden geen pathologische fenotypes waargenomen. Het model werd vervolgens gebruikt om de werkzaamheid van nieuwe farmaceutische samenstellingen te testen.

Het fokken van de heterozygote muizen leverde gezonden homozygote dieren op die dezelfde voortplantingskenmerken vertoonden als de achtergrondstam. Om het aantal dieren te beperken werd een fokstrategie van homozygote paringen gehanteerd. In tegenstelling tot de oorspronkelijke paring, waarbij homozygote muizen voortkwamen uit een heterozygote x heterozygote paring, had de nieuwe groep homozygote dieren die voortkwamen uit homozygote ouderparen een groeiachterstand ten opzichte van hun broers en zussen; bovendien kregen ze hun oorspronkelijke grootte en gewicht niet helemaal terug.

Hoewel de lijn oorspronkelijk bedoeld was als een gedrags- en geheugenmodel, werd een nadere analyse uitgevoerd op weefsel- en bloedmonsters die bij deze dieren werden afgenomen. Tijdens de analyse van de bloed-biochemieresultaten en daaropvolgend literatuuronderzoek bleek *GeneC* een cruciaal transporter proteïne te zijn dat zich bindt aan vitamine B12. De verwijdering van *GeneC* leidde tot

een in het extracellulaire transportmechanisme, hetgeen weer leidde tot stoornissen van de DNA-synthese en de eiwit- en vetstofwisseling. Het effect van deze mutatie zou niet zichtbaar zijn geweest in muizen die geboren waren uit een heterozygoot vrouwtje, aangezien de vitamine B12-bron van de moeder in utero via de placenta wordt overgebracht naar de zich ontwikkelende foetus. De oorspronkelijke knock-outdieren voor dit gen hadden dan ook voldoende B12 opgeslagen om tot een leeftijd van minimaal 16 weken te kunnen overleven en groeien, hetgeen garant stond voor normale voortplanting en vruchtbaarheid vergeleken met de achtergrondstam.

### 2.3.4 Analyse van de resultaten

#### *Beoordeling van de werkelijke ernst*

Dit voorbeeld laat zien dat instandhouding van de populatie een vergaand en vaak onverwacht effect kan hebben op de muizen. Uitgaande van de eerdere informatie en resultaten van de primaire voortplanting en fenotypering zou deze populatie onopmerkelijk zijn bevonden. Het in stand houden van een populatie bij een homozygote paringsstrategie zou normaliter minimale aantallen dieren voortbrengen, hetgeen wenselijk is om het gebruik van dieren tot een minimum te beperken. Onvoorziene, pathologische fenotypes kunnen zich voordoen in lijnen die voorheen als normale dieren in stand zijn gehouden zonder projectvergunning. Als gevolg van de negatieve welzijnseffecten op de dieren in dit voorbeeld zou dit model opnieuw een projectvergunning vereisen als deze fokstrategie werd toegepast.

#### *Samenvatting*

Instandhouding van heterozygote paren – Geen negatieve gevolgen

Instandhouding van homozygote paren – MATIGE ernst voor nakomelingen van deze generatie, vanwege groeiachterstand en groeistoornissen.

**Voorbeeld 2.3 – Dit wijst op de noodzaak voor instellingen om accurate en bruikbare welzijnsgegevens uit te wisselen wanneer zich pathologische fenotypen manifesteren, bijvoorbeeld in de vorm van een ‘muispaspoort’<sup>1</sup>.**

---

<sup>1</sup> RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (te downloaden op <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

