

**CODE OF PRACTICE  
VOOR HET IMMUNISEREN VAN PROEFDIEREN**

**Aangepaste tweede versie  
augustus 2000**

**Werkgroep immunisatieprocedures  
Keuringsdienst van Waren**



## VOORWOORD

Voor het bio-medisch, biologisch en chemisch onderzoek worden op uitgebreide schaal immunisaties uitgevoerd ten behoeve van:

- de bereiding van specifieke polyclonale immuunsera;
- het genereren van specifieke B-cellen die nodig zijn voor de ontwikkeling van hybridoma's voor de productie van monoclonale antilichamen;
- onderzoek naar a) de beschermende werking van vaccins, b) potentieel beschermende antigenen en kwaliteitscontrole van vaccins;
- fundamenteel immunologisch onderzoek;
- inductie van ziektemodellen.

Het immuniseren van proefdieren leidt in alle gevallen tot een kans op ongerief. Er zijn verschillende factoren die de mate van ongerief bepalen, zoals de aard van het antigeen, de eventuele toepassing van een adjuvans en de wijze van immuniseren (frequentie, route en plaats van injecteren, volume). Dit heeft er toe geleid dat de toenmalige Veterinaire Hoofinspectie in 1990 de Werkgroep immunisatieprocedures heeft ingesteld. Deze werkgroep heeft onder meer geïnventariseerd welke immunisatieprocedures in den lande werden toegepast, welke adjuvantia werden gebruikt en welke mate van ongerief in het geding is. Hierbij bleek dat er geen *communis opinio* bestond over immunisatieprotocollen voor de diverse doeleinden. Veelal maakte men gebruik van procedures die, min of meer routinematig, reeds werden gehanteerd binnen de onderzoeksinstelling of die zijn beschreven in de literatuur.

Een van de belangrijkste taken van de werkgroep was het opstellen van richtlijnen voor de immunisatie van proefdieren. Dit heeft geresulteerd in de **Code of practice voor het immuniseren van proefdieren**. Deze Code is ruim 7 jaar geleden, in 1993, door de toenmalige Veterinaire Hoofinspectie uitgebracht en verzonden aan vergunninghoudende instellingen, proefdierdeskundigen, onderzoekers en dierexperimentencommissies (DEC).

Het **doel** van de Code is het stellen van door deskundigen geaccepteerde richtlijnen, die leiden tot immunisatieprocedures waarbij een optimale immuunrespons wordt bereikt met een minimale belasting van het proefdier. In deze zin moet de Code richtinggevend zijn voor onderzoekers. Voorts kan deze Code een belangrijk hulpmiddel zijn voor Dierexperimentencommissies en proefdierdeskundigen bij het beoordelen van de toelaatbaarheid van dierproeven.

Een dergelijke Code is per definitie de weerslag van wetenschappelijke inzichten en ervaringen die gelden op een bepaald moment.

Uit een inventarisatie die door de Inspectie in 1996 onder proefdierdeskundigen, onderzoekers, DEC's en biotechnici is gehouden, bleek dat de Code op brede schaal ingang heeft gevonden. Binnen verschillende onderzoeksinstellingen heeft de Code geleid tot discussies over en aanpassing van immunisatieprotocollen. Uit de inventarisatie bleek echter ook dat gebruikers de Code op onderdelen niet volledig en/of niet geheel juist achtten.

Op 31 maart 1998 is in Lunteren het symposium getiteld "Immuniseren van proefdieren: heeft de Code of Practice een booster?" gehouden. Tijdens dit symposium stond de vraag centraal of op basis van de opgedane ervaringen en gewijzigde wetenschappelijke inzichten de Code dient te worden aangepast.

Gezien de reacties van gebruikers op de bestaande Code en de conclusies van het bovengenoemde symposium heeft de Inspectie besloten een 2e versie van de Code op te stellen.

De Inspectie heeft de Werkgroep immunisatieprocedures verzocht deze 2e versie uit te werken.

Deze werkgroep bestaat thans uit de volgende leden:

- drs. A.E.J.M. van den Bogaard, Universiteit Maastricht;
- mw.ing. C.J.J. Coenen-de Roo, N.V. Organon, Oss;
- dr. C.F.M. Hendriksen, RIVM, Bilthoven;
- dr. L.A.T. Hilgers, ID-Lelystad;
- mw.dr.ir. P.P.A.M. Leenaars, RIVM, Bilthoven;
- drs. W.A. de Leeuw, Kueringsdienst van Waren Oost, Zutphen;
- dr. H. Snippe, Universiteit Utrecht, Utrecht.

De genoemde personen participeren in de werkgroep op verzoek van de Inspectie en op basis van hun specifieke expertise, echter op persoonlijke titel en zonder last en ruggespraak.

Voor u ligt de aangepaste 2e versie van de Code of Practice voor het immuniseren van proefdieren. De Inspectie vertrouwt er op dat deze Code een even goed onthaal zal vinden binnen de doelgroep als de eerste versie.

Met nadruk dient te worden gesteld dat de Code niet alleen van toepassing is op immunisaties ten behoeve van de productie van antistoffen. De Code is ook van toepassing op immunisaties ten behoeve van andere doelstellingen, welke zijn verwoord in de aanhef van dit voorwoord. Indien dergelijk onderzoek afwijken van de Code noodzakelijk maakt, dient dit expliciet te worden gerechtvaardigd in het onderzoeksplan.

Op verzoek van de Inspectie zal de werkgroep blijven bestaan om de wetenschappelijke ontwikkelingen kritisch te volgen en, zodra daar aanleiding toe is, de Code of practice bij te stellen. Tevens zal de werkgroep blijven fungeren als vraagbaak en klankbord voor gebruikers van de Code.

Het correspondentie-adres is:  
Wergroep immunisatieprocedures  
p/a Keuringsdienst van Waren Oost  
Afdeling Signalering Veterinaire Producten  
De Stoven 22  
7206 AX ZUTPHEN  
tel. 0575-588100  
fax 0575-588200

Den Haag/Zutphen, augustus 2000

## **CODE OF PRACTICE VOOR HET IMMUNISEREN VAN PROEFDIEREN**

### **1. ALGEMENE OVERWEGINGEN**

Bij het immuniseren van proefdieren streeft men naar een wijze van bereiden en toedienen van een antigeen die resulteert in een optimale immuunrespons. Wat de optimale respons is, is afhankelijk van de vraagstelling: opwekken van humorale en/of cellulaire responsen danwel het induceren van bepaalde ziekten. Uitgangspunt van deze Code is dat men hierbij streeft naar een wijze van immuniseren die met een minimum aan ongerief voor het proefdier gepaard gaat.

### **2. IMMUNISATIEPROTOCOL**

Het doel van de immunisatie kan zijn:

- de bereiding van specifieke polyclonale immuunsera;
- het genereren van specifieke B-cellen die nodig zijn voor de ontwikkeling van hybridoma's voor de productie van monoclonale antilichamen;
- onderzoek naar a) de beschermende werking van vaccins, b) potentieel beschermende antigenen en c) kwaliteitscontrole van vaccins;
- fundamenteel immunologisch onderzoek;
- inductie van ziektemodellen.

Bij het opstellen van een immunisatieprotocol worden, afhankelijk van het doel van de immunisatie, keuzes gemaakt voor de immunisatieroute, het benodigde volume, de dosis van het gebruikte antigeen, het benodigde adjuvans<sup>1</sup> en het aantal keren dat geïmmuniseerd wordt.

Vanzelfsprekend moeten de dierexperimentele handelingen worden uitgevoerd door personen die bevoegd en bekwaam zijn. Het onderzoeksplan moet zijn opgesteld door een daartoe bevoegde onderzoeker.

#### **a) het gebruik van een adjuvans**

Ten behoeve van een optimale respons komt in de volgende situaties toepassing van een adjuvans in aanmerking:

1. het antigeen is zwak immunogeen;
2. het antigeen is in beperkte mate beschikbaar;
3. bij gebruik van lichaamseigen eiwitten;
4. bij het sturen van een immuunrespons.

Bij het opstellen van een immunisatieprotocol stelt de onderzoeker zich op de hoogte van de samenstelling van het adjuvans en van de dierbelastende neveneffecten in relatie tot de route van toediening (zie tabel 1). Gebruik van adjuvantia die een ernstige mate van ongerief veroorzaken, in relatie tot de route van toediening, moet worden gemotiveerd in het onderzoeksplan.

De in te spuiten oplossing of emulsie<sup>2</sup> is bij voorkeur steriel. De bereiding wordt aseptisch uitgevoerd. De te gebruiken injectiespuiten, naalden of canules zijn steriel. Het inoculum is bij voorkeur isotoon en minimaal op kamertemperatuur.

Zie voor de bereiding en analyse van emulsies bijlage 1.

- 1: Een verbinding of een combinatie van verbindingen die samen met een antigeen wordt toegediend om de immuunrespons op het antigeen te verhogen.
- 2: Een formulering van minimaal twee niet-mengbare vloeistoffen, meestal een waterige en een olie-achtige vloeistof, waarbij druppels van de ene vloeistof gedispergeerd zijn in de andere.

**b) route, injectieplaats, volume en aantal immunisaties**

Antigenen kunnen in waterige oplossing of als emulsie worden toegediend. Hierna worden de meest gebruikte routes van immunisatie besproken waarbij wordt uitgegaan van zowel waterige als emulsie toedieningen (zie tabel 2). Uitgangspunt is dat het toe te dienen volume niet de maximaal toegestane hoeveelheid overschrijdt. Zie hiervoor tabel 2.

**Subcutaan (s.c.)**

Deze toedieningsroute wordt het meest toegepast en heeft voor routine immunisaties de voorkeur. Een subcutane injectie wordt toegediend in een losse huidplooi (b.v. nek, flank, lies), maar niet op een plaats waar een dier regelmatig wordt opgepakt. Het antigeen-adjuvans mengsel wordt in principe slechts op één plaats toegediend. Toediening op meerdere (maximaal 4) of afwijkende injectieplaatsen dient te worden gemotiveerd in het onderzoeksplan.

**Oraal (p.o.)**

Bij de muis en de rat wordt een antigeenoplossing oraal toegediend met behulp van een geknopte canule. De canule wordt langs het verhemelte doorgeschoven tot in de maag. Let op de goede lengte en dikte van de canule. De lengte van de canule is af te passen vanaf de neuspunt tot het middenrif, net onder het borstbeen. Ervaring met deze toedieningswijze is noodzakelijk.

**Intranasaal (i.n.)**

Deze toedieningsroute met waterige oplossingen wordt gebruikt voor immunisaties en het opwekken van tolerantie. Hierbij wordt een antigeen in waterig milieu met behulp van een pipet of een microcanule toegediend in het begin van een neusgat of via een druppel op de neus bij een dier dat rechtop wordt gehouden. Het is noodzakelijk een kortdurende anesthesie toe te dienen met isofluraan, halothaan of CO<sub>2</sub>. Het gebruik van ether is ongewenst.

**Intracutaan (i.c.) / intradermaal (i.d.)**

Emulsies dienen niet gebruikt te worden voor intracutane injecties, daar dit ulceraties kan veroorzaken. Waterige oplossingen kunnen wel worden toegepast voor intracutane injecties. Als toch een intracutane injectie met emulsie noodzakelijk is, moet dit worden gemotiveerd in het onderzoeksplan. Emulsies kunnen alleen worden toegepast bij konijnen en grotere dieren. .

Bij alle intracutane injecties moet aan vier voorwaarden worden voldaan:

- het injectievolume mag niet groter zijn dan 0.05 ml per injectieplaats;
- indien op meer dan één locatie wordt geïnjecteerd moet er een ruime afstand zijn tussen de verschillende injectieplaatsen rekening houdend met de te verwachten reactie;
- het aantal injectieplaatsen dient beperkt te zijn (max. 4);
- in verband met de kans op ulceraties, moeten injecties op de rug worden toegediend.

**Intramusculair (i.m.)**

Bij de muis, rat en cavia wordt bij voorkeur niet intramusculair geïnjecteerd. Indien wel intramusculair moet worden geïnjecteerd, dient dit expliciet gemotiveerd te worden in het onderzoeksplan. In deze gevallen dient bij voorkeur in de dijbeenspier te worden geïnjecteerd.

**Intraperitoneaal (i.p.)**

Waterige oplossingen kunnen in alle proefdieren via de intraperitoneale route worden toegediend, bijvoorbeeld als alternatief voor de intraveneuze route.

In uitzonderlijke situaties kan het noodzakelijk zijn een emulsie via de intraperitoneale route toe te dienen. Dit is alléén gebruikelijk in de muis en de rat. In verband met de mogelijke bijwerkingen dient in deze gevallen het volume van de toegediende emulsie niet meer dan 0.2 ml te zijn. Voor gebruik van andere adjuvantia gelden andere beperkingen (zie tabel 1). Het gebruik van een emulsie voor intraperitoneale injectie dient gemotiveerd te worden in het onderzoeksplan.

**Voet**

Injecties in de voet zijn per definitie belastend voor een proefdier! Met name injecties met emulsies kunnen ernstig ongerief veroorzaken.

Alleen als er een wetenschappelijk onderbouwde noodzaak is kan het antigeen in de voet toegediend worden. Bij voorkeur dienen de injecties s.c. in de voetzool toegediend worden, omdat daar meer ruimte is. Deze injectie moet worden uitgevoerd door een bevoegd persoon met ervaring met dergelijke toedieningsroutes.

Per dier wordt slechts in één achterpoot geïmmuniseerd en de dieren moeten worden gehouden in kooien met extra dikke bedding.

**Intraveneus (i.v.)**

Intraveneuze toediening van emulsies is letaal. Bij booster immunisaties bestaat er een verhoogd risico op dodelijke overgevoelighedsreacties. Aanbevolen wordt om voorafgaande aan de booster immunisatie van een groep het risico hierop in één van de dieren te testen.

**Staatbasis**

Deze route wordt gebruikt bij o.a. de inductie van arthritis bij muizen of ratten.

Hierbij wordt een emulsie of een waterige antigeen oplossing door een s.c. injectie via de staart over de peesaanhechting bij de staartbasis toegediend.

**3. CONTROLE NA IMMUNISATIE**

Ten aanzien van de bewaking van het welzijn van de betrokken dieren worden de richtlijnen die zijn opgenomen in de Code of practice welzijnsbewaking van proefdieren (2000) in acht genomen.

Indien na een immunisatie ernstig ongerief wordt verwacht, moeten de proefdieren naast de dagelijkse routine controle extra worden geobserveerd. Dat wil zeggen dat de aard en frequentie van controles worden aangepast. Per experiment moet een werkprotocol beschikbaar zijn voor alle betrokken medewerkers. In dit werkprotocol moeten ten minste zijn vermeld de kritische momenten in de proef, te verwachten verschijnselen van ongerief, criteria op basis waarvan moet worden besloten tot euthanasie van betrokken dieren over te gaan en de personele verantwoordelijkheden. Bijzondere aandacht kan bijvoorbeeld worden besteed aan algemeen voorkomen van het dier, lichaamsverzorging, lichaamstemperatuur, voedsel- en wateropname, gewicht, injectieplaats, etc. Bij ernstig ongerief dient euthanasie te worden overwogen. Eventueel kan aangepaste huisvesting worden geadviseerd.

Na elke immunisatie wordt achteraf door middel van observatie en eventueel sectie nagegaan of de vooraf ingeschatte mate van ongerief overeenkomt met de werkelijke mate van ongerief.

**4. BLOEDAFNAME**

Als de immunisatie tot doel heeft de productie van antilichamen, is (herhaalde) bloedafname een belangrijk onderdeel van het experiment. Een proefafname vindt plaats 7 tot 10 dagen na de boosterinjectie. Direct of de volgende dag wordt met een geëigende methode de titer bepaald. Als de titer voldoende is wordt er bloed afgenomen 3 dagen tot 4 weken na de proefafname.

Bloedafname dient te geschieden in overeenstemming met de BVA/FRAME/RSPCA/UFAW richtlijnen (1993). Deze richtlijnen zijn internationaal algemeen geaccepteerd en hebben onder meer betrekking op de wijze van bloedafname, plaats van afname, naalddikte, en maximaal af te nemen volumina. In aanvulling hierop wordt verwezen naar publicaties van McGill and Rowan (1989) en van Bertens et al. (1995) (zie tabel 3).

Wanneer maximale volumina worden afgenomen, dient de afnamefrequentie niet hoger te zijn dan 1 x per 2 weken.

Tabel 1  
Klassificatie van ongerief van de meest gebruikte adjuvantia in relatie tot route van toediening.

Adjuvantia	ongerief <sup>a</sup>								
	Route								
	Oraal	Intranasaal	Subcutaan	Staartbasis	Intraperitoneaal	Intramusculair	Intracutaan	Voet	Intraveneus <sup>c</sup>
<b>Emulsies</b>									
Freund compleet adjuvans	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	3,4	4,5	5	5	5	5	- <sup>d</sup>
Water-in-minerale olie emulsie	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	3	4,5	4	4	5	5	- <sup>d</sup>
Freund incompleet adjuvans	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	3	4,5	4	4	5	5	- <sup>d</sup>
Specol <sup>TM</sup>	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	3	4,5	4	4	5	5	- <sup>d</sup>
Montanide ISA <sup>TM b</sup>	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	3	4,5	4	4	5	5	- <sup>d</sup>
Titermax <sup>TM</sup>	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	3	4	4	4	4	5	- <sup>d</sup>
Minerale olie-in-water emulsie	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	3	4	4	4	5	5	5
Niet-minerale olie-in-water emulsie	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	2	4	4	3	4	5	5
Squalane-in-water	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	3	4	4	4	4	5	5
Ribi adjuvant system <sup>TM</sup>	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	3	4	4	4	4	5	5
<b>Onoplosbare zouten</b>									
Al(OH) <sub>3</sub>	1	1	2	2,3	3	3	4	3	5
Al(PO) <sub>4</sub>	1	1	2	2,3	3	3	4	3	5
Aluin	1	1	2	2,3	3	3	4	3	5
<b>Oppervlakte-actieve stoffen</b>									
DDA	1	1	2	2	2	2	3	3	5
Liposomen	1	1	1	2	1	2	2	3	2
Niet-ionische blockpolymeren <sup>b</sup>	1	1	2	2,3	2,3	2,3	3,4	3,4	5
Saponin of Quil A	1	1	2	2,3	2-4	2	4	3	- <sup>d</sup>
ISCOMs	1	1	2	2	2-4	2	2	3	2,3
<b>Polymeren</b>									
Polyacrylzuren <sup>b</sup>	1	1,2	2	2,3	3	2	3	3	5
Carbopol <sup>TM</sup>	1	1,2	2	2,3	3	2	3	3	5
Polysacchariden <sup>b</sup>	1	1	2	2	2	2	2	2	2-4
Dextran sulfaat <sup>c</sup>	1	2	2	2,3	3,4	3	4	4	5
<b>Microbiële producten</b>									
Lipopolysaccharide <sup>b,c</sup>	1	1	2,3	2,3	3,4	2,3	3,4	3,4	4,5
Glycolipiden <sup>b,c</sup>	1	1	2,3	2,3	3,4	2,3	3	3,4	2-5
Glycopeptiden <sup>b,c</sup>	1	1	2,3	2,3	3,4	2,3	3	3,4	2-5
<b>Overige</b>									
Micropartikels <sup>b,c</sup>	1	1,2	2,3	2-4	2,3	2-4	2-4	3,4	2-4
Cytokinen <sup>b,c</sup>	1	1-3	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4
Waterig	1	1	1	1	1	1	1	2	1

<sup>a</sup> score ongerief: 1 = gering; 2 = gering/matig; 3 = matig, 4 = matig/ernstig, 5 = ernstig, 6 = zeer ernstig

<sup>b</sup> ongerief mede afhankelijk van specificaties van het product.

<sup>c</sup> ongerief sterk afhankelijk van dosis.

<sup>d</sup> Water-in-olie emulsies kunnen niet intraveneus worden toegediend.

<sup>e</sup> Alleen in specifieke situaties uitgevoerd. Ongerief product en dosis afhankelijk. Goede observatie noodzakelijk



Tabel 2a:

Route en maximaal volume van het inoculum per injectieplaats voor **kleine proefdieren**  
**N.B. Bij gebruik van een emulsie een zo klein mogelijk volume gebruiken !**

	<b><i>muis</i></b>	<b><i>rat</i></b>	<b><i>cavia</i></b>	<b><i>konijn</i></b>
	20-25 g	250 g	350 g	2,5 kg
<b>oraal (p.o.)</b>	m.b.v. geknopte canule			
max. volume (ml)	0.5-1.0	2.0	5.0	7.5
Sonde dikte (mm)	1.0	2.0	2.0	5.0
<b>intranasaal (i.n.)</b>	in of op het neusgat, onder kortdurende anesthesie			
max. volume (µl)	2*10µl	2*15µl	‡	‡
sonde dikte (mm)	0.45	0.6		
<b>subcutaan (s.c.)</b>	nek	nek	nek	nek/rug
max. volume (ml)	0.5 (waterig) 0.1 (emulsie)	0.5-1 <sup>1)</sup>	1.0	1.5 (waterig) 0.25(emulsie)
nld. dikte	26G	25G	25G	24G
<b>intracutaan (i.c.)</b>	in de huid van de rug			
max. volume (ml)	0.05 per injectieplaats voor alle diersoorten			
nld. dikte	27G-30G	25G	25G	25G
<b>intramusculair (i.m.)</b>	spiermassa in de achterpoten (dijbeenspier)			
max. volume (ml)	0.05	0.1	0.1	0.2-0.5 <sup>1)</sup>
nld. dikte	26G	25G	25G	25G
<b>intraperitoneaal (i.p.)</b>	lateraal van de middellijn ter hoogte van de navel			
max. volume (ml)	1.0	5.0	5-10 <sup>1)</sup>	10-20 <sup>1)</sup> (waterig)
nld. dikte	25G	25G	23G	21G
<b>voet</b>				
max. volume (ml)	0.05	0.05	nvt	nvt
nld. dikte	30G	27G		
<b>intraveneus (i.v.)</b>	staartvene	staartvene	voorpootvene	oorvene
max. volume (ml)	0.2	0.5	0.5-1 <sup>1)</sup>	1-5 <sup>1)</sup>
nld. dikte	25G-27G	23G-25G	22G-27G	21G-23G
<b>staartbasis</b>	s.c. via de staart tot aan de staartbasis			
max. volume (ml)	0.1	0.2	nvt	nvt
nld. dikte	25G	23G-25G		

<sup>1)</sup> afhankelijk van het gewicht van het dier

‡ geen maximaal volume en sondedikte bekend

nld. dikte = naalddikte, dit wordt aangegeven in G( =Gauge)

30G = 0.30 mm      25G = 0.50 mm      22G = 0.70 mm      19G=1.00 mm  
 27G = 0.40 mm      24G = 0.55 mm      21G = 0.80 mm      18G=1.10 mm

10

26G = 0.45 mm

23G = 0.60 mm

20G = 0.90 mm

Tabel 2b:

Route en maximaal volume van het inoculum per injectieplaats voor **grote proefdieren**  
**N.B. Bij gebruik van een emulsie een zo klein mogelijk volume gebruiken !**

	<i>kip</i>	<i>hond</i>	<i>schaap</i>	<i>geit</i>	<i>rund</i>
<b>subcutaan (s.c.)</b>					
max. volume (ml)	0.5	1.0	2.0	2.0	2.0
nld. dikte	23G <sup>1)</sup>	23-25G <sup>1)</sup>	18-21G <sup>1)</sup>	18-21G <sup>1)</sup>	18-21G <sup>1)</sup>
<b>intramusculair(i.m.)</b>					
max. volume (ml)	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0
nld. dikte	21-23G <sup>1)</sup>	23-25G <sup>1)</sup>	18-21G <sup>1)</sup>	18-21G <sup>1)</sup>	18-21G <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> afhankelijk van het gewicht van het dier

nld. dikte = naalddikte, dit wordt aangegeven in G( =Gauge)

30G = 0.30 mm

27G = 0.40 mm

26G = 0.45 mm

25G = 0.50 mm

24G = 0.55 mm

23G = 0.60 mm

22G = 0.70 mm

21G = 0.80 mm

20G = 0.90 mm

19G = 1.00 mm

18G = 1.10 mm

Tabel 3:

Maximale volumina bloed die kunnen worden afgenomen (Bertens et al., 1995)

Diersoort	Volume (ml)
Muis	0,3
Hamster	0,3
Rat	2,0
Cavia	5,0
Konijn	15 <sup>#</sup>
Kat	20
Hond	100-500 <sup>#</sup>
Aap	20-200 <sup>#</sup>
Varken	200-500 <sup>#</sup>
Schaap	200-600 <sup>#</sup>
Paard	500-7000 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>Afhankelijk van lichaamsgewicht

## Referentielijst

### Protocollen/technieken

- Bertens, A.P.M.G., Baumans, V., ten Berg, R.G.M., Timmerman, A. (1995). Experimentele technieken. In: Zutphen, L.F.M. van, Baumans, V. en Beynen, A.C. eds. Proefdieren en dierproeven. Utrecht, Wetenschappelijke uitgeverij Bunge, 267-286.
- BVA/FRAME/RSPCA/UFAW. (1993). Joint Working Group on Refinement: Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Lab.Anim.*, 27, 1-22.
- Hanly, W.C., Artwohl, J.E. & Bennett, B.T. (1995). Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR Journal*, 37, 93-118.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988). *Antibodies, a Laboratory Manual*, 92-114. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- MgGuill, M.W. and Rowan, A.N. (1989). Biological effects of blood loss: implication for sampling volumes and techniques. *ILAR Journal*, 31, 5-20.
- Schade, R., Staak, C., Hendriksen, C.F.M., Erhard, M., Hugl, H., Koch, G., Larsson, A., Pollmann, W., van Regenmortel, M., Rijke, E., Spielmann, H., Steinbusch, H. & Straughan, D. (1996). The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. ECVAM workshop report 21; *ATLA*, 24, 925-934.

### Pathologie

- Broderson, J.R. (1989). A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab.Anim.Sci.*, 39, 400-405.
- Chapel, H.M. and August, P.J. (1976). Report on nine cases of accidental injury to man with Freund's complete adjuvant. *Clinical and Experimental Immunology*, 24, 538-541.
- Johnston, B.A., Eisen, H. and Fry, D. (1991). An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. *Lab.Anim.Sci.*, 41, 15-21.
- Leenaars, P.P.A.M., Koedam, M.A., Wester, P.W., Baumans, V., Claassen, E., Hendriksen, C.F.M. (1998). Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. *Lab.Anim.*, 32(4), 387-406.
- Lipman, N.S., Trudel, L.J., Murphy, J.C. and Sahali, Y. (1992). Comparison of immune response potentiation and *in vivo* inflammatory effects of Freund's and Ribi adjuvants in mice. *Lab.Anim.Sci.*, 42, 193-197.
- Walvoort, H.C. (1991). Assessment of distress through pathological examination. In *Animals in Biomedical Research*. C.F.M. Hendriksen and H.B.W.M. Koëter (Eds.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, the Netherlands, 265-271.

### Ongerief

- Amyx, H.L. (1987). Control of animal pain and distress in antibody production and infectious disease studies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 191, 1287-1289.
- Barclay, R.J., Herbert, W.J. & Poole, T.B., Eds. (1988). *The Disturbance Index: a behavioural method of assessing the severity of common laboratory procedures on rodents*. Animal Welfare Research Report No 2, 36 pp., Potters Bar, Herts., UK: UFAW.
- Bulthuis, R.J.A., Bergman, A.F., Nijessen, S., Schlingmann, F., Tolboom, J., Remie, R., Van de Weerd, H.A., Van Loo, P.L.P., Baumans, V. & Van Zutphen, L.F.M. (1997). Automated behaviour classification: the LABORAS project. In: *Harmonization of Laboratory Animal Husbandry* (ed. P.N. O'Donoghue), 17-18. Royal Society of Medicine Press. London.
- Griffiths, P.H.M. (1991). Clinical assessment of pain, distress and discomfort. In: *Animals in Biomedical Research; Replacement, Reduction and Refinement: Present Possibilities and Future Prospects*. C.F.M. Hendriksen and H.B.W.M. Koëter (Eds.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, the Netherlands, 235-246.
- Jansen van 't Land, C. and Hendriksen, C.F.M. (1995). Change in locomotor activity pattern in mice: a model for recognition of distress? *Laboratory Animals*, 29, 286-293.
- Morton, D.B. & Griffiths, P.H.M. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet.Rec.*, 116, 431-436.
- Toth, L.A., Dunlap, A.W., Olson, G.A. and Hessler, J.R. (1989). An evaluation of distress

following intraperitoneal immunization with Freund's adjuvant in mice. *Lab.Anim.Sci.*, 39, 122-126.

van den Broek, F.A.R., Peters, M.A.W., Van Tintelen, G., Kaper, J., Van Beresteijn, E.C.H. en Beynen, A.C. (1994). De invloed van het intraperitoneaal toedienen van Freund's adjuvans op enkele welzijnsindicatoren bij muizen. *Biotechniek*, 33(1), 9-11.

### **Adjuvantia**

- Allison, A.C. and Byars, N.E. (1992). Immunological adjuvants and their mode of action. In: *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*, W.R. Ellis (Ed.), Butterworth Heineman, Boston, 431-449.
- Audibert, F.M. and Lise, L.D. (1993). Adjuvants: Current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunology Today*, 14(6), 81-284.
- Bennett, B., Check, I.J., Olsen, M.R. and Hunter, R.L. (1992). A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J.Immunol.Meth.*, 153, 31-40.
- Claassen, E. & Boersma, W.J.A. (eds.). (1992). 44th Forum in Immunology: Characteristics and practical use of new-generation adjuvants as an acceptable alternative to Freund's complete adjuvant. *Res.Immunol.*, 143(5), 475-582.
- Cox, J.C. & Coulter, A.R. (1997). Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine.*, 15, 248-256.
- Dalsgaard, C., Hilgers, L. and Trouve, G. (1990). Classical and new approaches to adjuvant use in domestic foor animals. *Adv.Vet.Sci.Comp.Med.*, 35, 121-160.
- Deeb, B.J., Digiacomo, R.F., Kunz, L.L. and Stewart, J.L. (1992). Comparison of Freund's and Ribi adjuvants for inducing antibodies to the synthetic antigen (TG)-AL in rabbits. *J.Immunol.Meth.*, 152, 105-113.
- Gupta, R.K., Relyveld, E.H., Lindblad, E.B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S. and Gupta, C.K. (1993). Adjuvants - A balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*, 11, 293-306.
- Leenaars, P.P.A.M. (1997). Adjuvants in Laboratory Animals. PhD thesis, Erasmus University Rotterdam. 207 pp.
- Stewart-Tull, D.E.S. Ed. (1995). *The Theory and Practical Application of Adjuvants*. 380 pp., John Wiley & Sons, Chichester.
- Stills, H.F. and Bailey, M.Q. (1991). The use of Freund's complete adjuvant. *Lab.Anim.*, 20, 25-30.
- Vogel, F.R., & Powell, M.F. (1995). A compendium of vaccine adjuvants and excipients. In *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. M.F. Powell & M. J. Newman), 141-228, Plenum Press, New York.

### **Bestaande richtlijnen**

- Bundesamt für Veterinärwesen. (1998). Richtlinie 3.04: Fachgerechte und tierschutzkonforme Antikörper gewinnung in Kaninchen, Hühnern und Labornagetieren; (Production of antibodies in rabbits, chickens and rodents according to the principles of animal welfare and laboratory animal science). Zwitserland.  
Zie: <http://www.admin.ch/bvet/>
- CCAC. (1991). Canadian Council on Animal Care. CCAC guidelines on acceptable immunological procedures. 2 pp. Ottawa, Ontario, Canada. Zie: <http://www.ccac.ca/>
- Grumstrupp-Scott, J. & Greenhouse, D.D. (1988). NIH intramural recommendations for the research use of complete Freund's adjuvant. *ILAR News* XXX(2), 9.
- Home Office Inspectorate. (1991). *Antibody Production - Advice on Protocols for Minimal Severity*. UK.
- Inspectie Waren en Veterinaire Zaken. (2000). Code of practice welzijnsbewaking van proefdieren.
- Jackson, L.R. & Fox, J.G. (1995). Institutional policies and guidelines on adjuvants and antibody production. *ILAR Journal*, 37, 141-152.

Leenaars, P.P.A.M., Hendriksen, C.F.M., de Leeuw, W.A., Carat, F., Delahaut, P., Fischer, R.,

- Halder, M., Hanly, W.C., Hartinger, J., Hau, J., Lindblat, E.B., Nicklas, W., Outschoorn, I.M. and Stewart-Tull, D.E.S. 1999. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendations of ECVAM workshop 35. *ATLA*, 27, 79-96.
- SCAW. (1989). Scientists Center for Animal Welfare; Guidelines on Immunological Procedures. *SCAW Newsletter*, 11(3), 2-6.

## BEREIDING EN ANALYSE VAN EMULSIES VOOR IMMUNISATIE

1. Water-in-olie emulsies  
(b.v. Freund incompleet adjuvans, Freund compleet adjuvans, Incomplete Seppic Adjuvant<sup>TM</sup>, en Specol).

Definitie Water-in-olie emulsie:

*Een formulering van water-druppels in een oliefase waarbij het antigeen zich in de waterfase, c.q. binnenfase bevindt.*

Bij de bereiding van formuleringen van water-in-olie wordt de antigen oplossing gedispergeerd in een olie die veelal van minerale oorsprong is. Aan de olie zijn een of meerdere detergentia toegevoegd om de verkregen emulsie te stabiliseren. Er bestaan verschillende manieren om een emulsie op kleine schaal te bereiden (b.v. d.m.v. twee injectie-spuiten die met elkaar verbonden zijn). Het water-gehalte kan variëren tussen enkele % en 45 %. Lucht in de water- of oliefase kan een ongunstig effect hebben op de kwaliteit van het produkt en de lokale reactie. De aard van de emulsie wordt vastgesteld door de mengbaarheid met water en olie te bepalen; een druppel water-in-olie emulsie blijft intact in water maar valt uiteen of vermengt zich met olie. Een indruk van de grootte van de waterdruppels kan verkregen worden m.b.v. een microscoop (bij een vergroting van 400x of 1000x) waarbij de emulsie verdund kan worden in olie.

2. Olie-in-water emulsies  
(b.v. Ribit Adjuvant System<sup>TM</sup>, Synthex Adjuvant Formulation, MF59 en sulfolipo-polysaccharide/squalane).

Definitie Olie-in-water emulsie:

*Een formulering van olie-druppels in een waterfase, waarbij het antigeen zich in de waterfase, c.q. buitenfase bevindt.*

Bereiding van formuleringen op basis van een olie-in-water adjuvans omhelst bereiding van de emulsie en vervolgens mengen of oplossen van het antigeen in de emulsie. De emulsie bevat twee of meerdere detergentia om de emulsie te stabiliseren. Het olie-gehalte kan variëren tussen enkele % en 40 %. De aard van de emulsie kan getest worden door het bepalen van de mengbaarheid met water en olie; een druppel olie-in-water emulsie blijft intact in olie maar valt uiteen of vermengt zich met water. De grootte van de olie-druppels is een indicatie voor de kwaliteit en stabiliteit van de emulsie (c.q. vaccin) en kan m.b.v. een microscoop (bij een vergroting van 400x of 1000x) worden bepaald waarbij de emulsie verdund kan worden in een waterige oplossing.

Emulsies met beperkte stabiliteit (m.n. water-in-olie formuleringen) worden kort voor gebruik gemaakt.