

Datum ontvangst DEC:

22 april 2010 final

DEC nr: 2949 koepel

**Koepelaanvraag**

Aangepast na DEC vergadering no. 168

**DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO****AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN**

Dit formulier dient uiterlijk **7 werkdagen** voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven op Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

Secretaresse DEC en proefdierdeskundige

[REDACTED]

[REDACTED]

E-mail: [REDACTED]

telefoon: [REDACTED] / fax: [REDACTED]

**Dit betreft een koepelaanvraag, waaronder verkorte aanvragen zullen worden ingediend**

**Kerngebied en locatie:****ALGEMEEN****1. Onderzoeksplan****1.1. titel:**

Algemene aanvraag voor sub-acute of sub-chronische toxiciteitsstudies met knaagdieren, honden of (mini)pigs bestemd voor toelaten van voedingsmiddelen, stoffen in handel, verkeer en gebruik in consumentenproducten, of geneesmiddelen (preklinisch onderzoek).

**1.2. studienummer:**

Nvt

**1.3. titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):**

Nvt

**2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD): Contactpersoon [REDACTED]**

maar tevens: [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], en, in voorkomende gevallen, [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] en alle projectleiders die in de komende periode door het TNO management zijn, of zullen worden, geautoriseerd tot het uitvoeren van dit type studies.

E-mail adres onderzoeker: [REDACTED]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr: [REDACTED]

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): [REDACTED], [REDACTED]

**Externe samenwerking (indien van toepassing):** Doorgaans geschiedt het gehele onderzoek binnen de afdeling [REDACTED] ([REDACTED]). Delen van het onderzoek (b.v. analyses of bijzondere verrichtingen) kunnen echter buiten deze afdeling worden uitbesteed. Uiteraard is sprake van samenwerking met de externe opdrachtgever.

**3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:**

De definitieve aanvangsdatum dient per studie te worden gemeld in de verkorte aanvraag

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail:

[REDACTED])

**Geplande duur van het onderzoeksplan:**

Eventuele voorproef : 1 dag/enkele dagen tot enkele weken,

2-wk studie : 2 weken (+ evt recovery periode van 2 weken),

4-wk studie : 4 weken (+ evt recovery periode van 2-4 weken),

13-wk studie : 13 weken (+ evt recovery periode van 2-6 weken).

De dieren worden tenminste 5 dagen voor aanvang in het proefdiergebouw XXXX gehuisvest om te acclimatiseren.**Locatie waar dieren worden gehouden:**

Doorgaans in proefdiergebouw XXXX. In voorkomende gevallen kan de huisvesting worden uitbesteed naar andere locaties. In dat geval worden eveneens alleen ex art. 12 WOD gekwalificeerde medewerkers bij de uitvoering betrokken

**4. Codenummers volgens VWA-registratie:****Voorproef** (niet nodig indien reeds voldoende gegevens beschikbaar)**cq 2-wk of 4-wk proef** (indien niet een 13-wk proef):

| groep                | < kolommen > |                |   |                  |                |   |   |    |   |                 |                 |                                                                  |    |
|----------------------|--------------|----------------|---|------------------|----------------|---|---|----|---|-----------------|-----------------|------------------------------------------------------------------|----|
|                      | 1            | 2 <sup>4</sup> | 3 | 4 <sup>0,6</sup> | 5 <sup>5</sup> | 6 | 7 | 8  | 9 | 10 <sup>8</sup> | 11 <sup>2</sup> | 12 <sup>3</sup>                                                  | 13 |
| contr. <sup>7</sup>  | 1            | 2              | 2 | 5♂ + 5♀          |                | 1 | 7 | 05 | 1 | 4               | 1               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span> | 1  |
| low-                 | 1            | 2              | 2 | 5♂ + 5♀          |                | 1 | 7 | 05 | 1 | 4               | 1               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span> | 1  |
| mid-                 | 1            | 2              | 2 | 5♂ + 5♀          |                | 1 | 7 | 05 | 1 | 4               | 1               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span> | 1  |
| high-                | 1            | 2              | 2 | 5♂ + 5♀          |                | 1 | 7 | 05 | 1 | 4               | 1               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span> | 1  |
| reserve <sup>9</sup> | 1            | 2              | 2 | ca. 3♂ + 3♀      |                | - | - | -  | 1 | 4               | -               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span> | 1  |

**13-wk proef:**

| groep                | < kolommen > |                |   |                  |                |   |   |    |   |                 |                 |                                                                  |    |
|----------------------|--------------|----------------|---|------------------|----------------|---|---|----|---|-----------------|-----------------|------------------------------------------------------------------|----|
|                      | 1            | 2 <sup>4</sup> | 3 | 4 <sup>1,6</sup> | 5 <sup>5</sup> | 6 | 7 | 8  | 9 | 10 <sup>8</sup> | 11 <sup>2</sup> | 12 <sup>3</sup>                                                  | 13 |
| contr. <sup>7</sup>  | 1            | 2              | 2 | 20♂ + 20♀        |                | 1 | 7 | 06 | 1 | 4               | 1               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span> | 1  |
| low-                 | 1            | 2              | 2 | 20♂ + 20♀        |                | 1 | 7 | 06 | 1 | 4               | 1               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span> | 1  |
| mid-                 | 1            | 2              | 2 | 20♂ + 20♀        |                | 1 | 7 | 06 | 1 | 4               | 1               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span> | 1  |
| high-                | 1            | 2              | 2 | 20♂ + 20♀        |                | 1 | 7 | 06 | 1 | 4               | 1               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span> | 1  |
| reserve <sup>9</sup> | 1            | 2              | 2 | ca. 5♂ + 5♀      |                | - | - | -  | 1 | 4               | -               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span> | 1  |

<sup>0</sup> Het aantal van 5/5 dieren is gebaseerd op OECD richtlijn voor sub-acute studies voor rodents. In de richtlijnen voor farmaceutische stoffen (b.v. ICH en EMEA richtlijnen) worden 10 dieren/seks/groep beschouwd als een 'sufficient number of animals'. Afhankelijk van aard van de teststof, de beoogde vraagstelling en in overleg met de opdrachtgever kunnen meer (/ minder) dieren worden ingezet (b.v. vanwege te bereiken van een bepaalde statistische power, of bewezen grote variabiliteit in relevante parameters). Indien de studie dient als voorproef kan b.v. worden volstaan met 4 knaagdieren per groep (voor een voorproef met honden is dit 1 of 2 dieren/seks/groep). Het aantal behandelingsgroepen is doorgaans 3 (low-, mid-, high-) maar kan, afhankelijk van de vraagstelling, worden uitgebreid. Het aantal dieren en groepen dient te worden beargumenteerd in de verkorte aanvraag.

<sup>1</sup> Aantal volgens FDA richtlijnen. In geval van OECD/EC richtlijnen doorgaans 10 knaagdieren/seks/groep. Honden of (mini)pig proeven worden doorgaans uitgevoerd met (3-) 4 mannetjes en (3-) 4 vrouwtjes per groep. Het aantal behandelingsgroepen is doorgaans 3 (low-, mid-, high-) maar kan, afhankelijk van de vraagstelling, worden uitgebreid of verminderd. Het aantal dieren en groepen dient te worden verantwoord in de verkorte aanvraag.

<sup>2</sup> Dieren worden volgens criteria van de SOP (EQU/180) gedood indien in slechte conditie

<sup>3</sup> Ongerief dient specifiek ingevuld te worden bij elke verkorte procedure. Zie verder de betreffende vragen.

<sup>4</sup> Kan ook 1 (muis), 21 (hond) of 42 (pigs) zijn.

<sup>5</sup> Doelcodes (kolom 5) b.v. 01, 03, 10, 15, 16, 17, 19 of 20. Dient specifiek ingevuld te worden bij elke verkorte procedure.

<sup>6</sup> Deze koepelaanvraag geldt echter nadrukkelijk niet voor onderzoek betreffende code 18 (cosmetica onderzoek).

<sup>6</sup> Dit aantal kan worden aangevuld met extra dieren voor recovery groepen of sateliet groepen.

- 7 Het kan nodig zijn extra controle groep(en) op te nemen b.v. als "carrier control group", om de effecten van de carrier te kunnen onderscheiden van die van de teststof. Ook kunnen extra groep(en) nodig zijn als "referentie groep(en)" om effecten van de teststof te kunnen vergelijken met die van een vergelijkbare stof.
- 8 Bij bloedafname, of aan het eind van de proef (aan einde proef komen de dieren dan niet meer bij uit narcose).
- 9 Bij hondenproeven wordt doorgaans 1 reserve dier per sexe besteld of gereserveerd. Bij (mini)pigs kan dat 2 dieren/sex zijn vanwege het feit dat deze proeven veel minder voorkomen en (mini)pigs minder makkelijk te hanteren zijn dan honden.

## RELEVANTIE

### 5. Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden:

- De voorproef kan meerdere functies hebben. Doorgaans zal een dergelijke proef dienen als een 'range-finding study', ter bepaling van de dosislevels in de hoofdstudie, of ter bepaling van de maximum tolerable dose (MTD; voor geneesmiddelen). Maar het doel van een voorproef kan ruimer zijn, b.v. onderzoek naar de palatability van de teststof in het voer, of onderzoek naar mogelijke interacties van de teststof met voercomponenten, of andere specifieke vraagstellingen.
- De sub-acute en sub-chronische proeven worden uitgevoerd vanwege een wettelijke eis m.b.t. de toelating van voedingsmiddelen, stoffen in handel, verkeer of in consumentenproducten, of geneesmiddelen (preklinisch onderzoek). Het betreft hier het onderzoek volgens internationale richtlijnen op mogelijk toxische effecten na herhaalde toediening. Deze koepelaanvraag kan niet gebruikt worden voor het routinematig screenen van vervolgbatches op toxiciteit.

### 6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:

#### 6.a Maatschappelijk belang (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

- 6.a.1 Gezondheid mens/dier
- 6.a.2 Economisch belang
- 6.a.3 Milieu belang
- 6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3

Dit berust op de wetgeving die in het leven is geroepen om consument, patiënt, milieu en werkers te beschermen tegen mogelijke nadelige effecten van herhaalde opname van nieuwe stoffen en producten. Het belang is mede afhankelijk van de beoogde toepassing maar kan betreffen gezondheid mens/dier, economisch belang, milieu belang of ander maatschappelijk belang.

#### 6.b Wetenschappelijk belang:

Het wetenschappelijk belang betreft doorgaans de inventarisatie van de toxicologische eigenschappen van een stof. Het gaat hier dus doorgaans niet om 'fundamenteel wetenschappelijk' onderzoek. Het belang van dit soort proeven voor 'hazard identification' en 'risk assesment' is nietemin bijzonder groot.

### 7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld?

**Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?**

**Zo nee, waarom niet?**

De proeven worden uitgevoerd volgens standaard richtlijnen van b.v. OECD (407, 408), EU (2001/59/EC); 96/54/EC), FDA, EPA, MAFF, MHW, MITI, ICH, EMEA. Deze richtlijnen zijn opgesteld door experts uit verschillende landen en worden vereist door de instanties belast met de beoordeling van de toelaatbaarheid van stoffen. De studieopzet en de te bepalen parameters worden nader bepaald op basis van eigenschappen van de stof, het toepassingsgebied, en eisen van de toelatingsautoriteiten in de verschillende landen. Dit is onderwerp van besluitvorming door opdrachtgever en uitvoerend instituut, soms na overleg met de beoordelende autoriteiten (helaas slechts in uitzonderingsgevallen mogelijk).

## PROEFOPZET

### 8. Wat is de aard van deze dierproef (meer dan 1 rondje kan van toepassing zijn):

- nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/ teststof)
- herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan ,  
DEC-adviezen nos.: 436, 912, 1378, 1817, 2073, 2535 en een hierop gebaseerd inmiddels groot aantal 2-4 wk en 13-wk studies.
- proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:  
wettelijke eis: ja  
testrichtlijn: OECD, EU, FDA, EPA, MAFF, MHW, MITI, ICH, EMEA, etc.
- proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- anders, n.l.: Dit betreft een koepelaanvraag

### 9. Aan welke behandelingen worden de dieren onderworpen?

Omschrijf zodanig dat dit op het niveau van het individuele dier duidelijk wordt, met inbegrip van het tijdschema en de frequentie waarmee behandelingen worden uitgevoerd. Beschrijf daarbij alle experimentele technieken waaraan de dieren worden onderworpen, met inbegrip van ingrepen, doseringstechnieken, euthanasietechnieken, enz. Verwijs, voorzover van toepassing, naar standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

De dieren worden over het algemeen tijdens de gehele proefperiode dagelijks blootgesteld aan de teststof. De toedieningsfrequentie kan echter lager zijn (b.v. dagelijks, maar niet in het weekend). Bij 'single-dose' studies worden de dieren slechts één keer blootgesteld, waarna over het algemeen een 14-dagen observatieperiode volgt. Doorgaans betreft het orale toediening via het voeder, drinkwater of per maagsonde (1x of 2x per dag; per dosering max.20 ml/kg voor waterige formuleringen of max. 10 ml/kg voor overige carriers). Met name voor studies met farmaceutische stoffen kunnen andere toedienings-frequenties of andere toedieningsroutes<sup>1</sup> vereist zijn (intraveneus, intraperitoneaal, dermaal, subcutaan).

<sup>1</sup> Voor intra-dermale of intracolonaal toediening dient een volledige aanvraag te worden ingediend.

Dermale blootstelling (gewoonlijk 6 uur/dag) kan open of semi-occlusief zijn. Bij open blootstelling wordt gewoonlijk een nekkraag omgedaan om orale blootstelling te voorkomen. De kraag maakt nog steeds normale voedsel- en water opname mogelijk. Bij semi-occlusieve toediening wordt gebruik gemaakt van een patch en lichte tape. Ratten (knaagdieren) worden met de tape omzwachteld; honden of (mini)pigs gewoonlijk niet (Bij minipigs wordt een patch op z'n plaats gehouden door een elastisch net rond het dier).

De dieren worden dagelijks geobserveerd en regelmatig gewogen, en eventuele klinische verschijnselen worden per dier geregistreerd. Aan het eind van de onderzoeksperiode worden alle dieren gedood, na voorafgaande anaesthesie, en pathologisch onderzocht.

Bij elke studie kunnen testen en waarnemingen worden gedaan, zoals:

- Bloed-glucose (laatste week). Een kleine hoeveelheid bloed wordt na enkele uren vasten verzameld dmv staartknip. Het dier wordt hiervoor niet geanaestheesd (rat, muis).
- Urine (laatste week). Ratten worden gedurende 24 uur water onthouden (concentratie test) en de 16 laatste uur van deze periode tevens voeder. Ze worden gedurende 16 uur individueel in metabolismekooien gehuisvest voor opvang van urine. De urine wordt uitgebreid geanalyseerd. (Deze bepaling geldt doorgaans niet voor muizen, maar als het wel gebeurt is de periode van water en voederprivatie veel korter). Voor sommige urine analyses (b.v. kwantitatieve bepaling van electrolyten, eiwit, glucose, creatinine, enzymactiviteit) is urine uit de concentratietest niet optimaal en worden ratten langer dan 16 uur in metabolismekooien gehuisvest (met water en voer, veelal 24 uur acclimatisatie gevolgd door 24 uur opvang urine). Bij honden of (mini)pigs wordt,

doorgaans voor de start en gedurende de sectie, urine verzameld hetzij door catheterisatie hetzij bij sectie door blaaspunctie.

- Faeces verzamelen. De dieren worden gedurende enkele dagen individueel gehuisvest in metabolisme kooien (water en voer beschikbaar).
- Ophthalmoscopisch onderzoek (aan het begin en aan het eind). Daarbij wordt een mydriaticum op het oog gedruppeld om dilatatie van de pupil te bewerkstelligen. Vervolgens wordt met een ophthalmoscoop in het oog gekeken.
- Lichaamstemperatuur meting via subcutane transponder. Deze wordt m.b.v. injectietechniek zonder verdoving ingebracht en blijft de gehele proefduur aanwezig.
- Functional observational battery (FOB) voor het bepalen van mogelijke neurologische effecten (aan het begin van de studie, regelmatig (beperkt) tijdens de studie, en aan het eind van de studie). De dieren worden geobserveerd buiten de eigen kooi, in een "open field". Daarnaast worden ze getest op hun zintuigelijke vermogens, de grijpkracht in de ledematen en de spontane voortbewegingsactiviteit.
- Bepaling van fertiliteits parameters. Vagina uitstrijkjes ter bepaling van het stadium van de cyclus (dagelijks, gedurende minimaal drie weken). Epididymidal sperm motility, count and morphology, homogenisation resistant sperm counted in testis (bij/ na sectie).
- Voor neuropathologisch onderzoek kan bij sectie gebruik worden gemaakt van perfusie technieken onder anaesthetie.
- Aan het einde van de onderzoeksperiode kan bij knaagdieren bloed worden afgenomen (voor hematologische en klinische chemische bepalingen door punctie van de abdominale aorta na het openen van de buikholte van het geanaestheerde dier tijdens de sectie. Eventueel kan ook tussentijds bloed worden afgenomen<sup>1</sup>. Afhankelijk van de af te nemen hoeveelheid bloed geschiedt dit bij de rat/muis via de staartvene of via orbita-punctie. Soms is het nodig hiervoor extra dieren op te nemen in de proef ("sateliet groepen"). Het opnemen van sateliet groepen kan ook nodig zijn om andere redenen, zoals het doen van extra bloedbepalingen of het verzamelen van weefsel. Bij honden wordt (doorgaans voor de start, eventueel tussentijds en voorafgaand aan de sectie) bloed afgenomen uit de vena jugularis of uit een perifere pootvene. Bij de (mini)pig uit de cranial vena cava waarbij het dier in een speciale rughouding op een matje in een houder ligt (speciaal door breeder vervaardigt). Ook kan gebruik gemaakt worden van gecanuleerde dieren waarbij bloedafname via de canule (in de vena jugularis) wordt afgenomen. Doorgaans kunnen deze dieren met canule en al worden besteld. Indien dieren zelf gecanuleerd moeten worden zal dit apart aangevraagd worden.
- Indien inzicht verkregen dient te worden in het reversibele karakter van eventuele effecten van het teststof kunnen extra groepen ("recovery-groups") worden opgenomen die na de behandelingsperiode langer worden aangehouden en onderworpen aan de waarnemingen die ook in de hoofdstudie gedaan zijn. Dergelijke groepen omvatten doorgaans 5 (soms 10) dieren van elk geslacht en betreffen in ieder geval een controle en een hoogste dosis groep, en wanneer nodig, ook de tussenliggende doseringen.

<sup>1</sup> Bij tussentijdse bloedafnames dient de frequentie van bloedafname te worden vermeld in de verkorte aanvraag. Indien, bij tussentijdse bloedafnames, de afgenomen hoeveelheden niet overeenkomen met Good Practice zal hiervoor speciaal toestemming moeten worden gevraagd. Voor bloedgeveelheden die overeenkomen met Good Practice zal door de DEC toestemming worden gegeven.

**10. Beschrijf de proefopzet en geef het proefschema bij voorkeur volgens onderstaand voorbeeld:**

| GROEP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | BEHANDELING | BIOTECHNISCHE<br>HANDELING(EN) | AANTAL | SEXE |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------|--------|------|
| De proef omvat doorgaans 4 groepen, n.l. één controle groep en drie test groepen die oplopende niveau's van de te onderzoeken stof toegediend krijgen via de geselecteerde route. Het kan nodig zijn extra test groepen of extra controle groep(en) op te nemen, b.v. als "carrier control group", om de effecten van de carrier te kunnen onderscheiden van die der teststof. Ook kan het nodig zijn een (extra) referentie groep op te nemen, of juist minder test groepen (bij een limit test). Afwijkingen van de standaard 4 groepen dienen te worden gemotiveerd in de verkorte aanvraag. |             |                                |        |      |

**11. Hoeveel dieren zullen in totaal worden gebruikt? Onderbouw dit aantal op basis van statistische parameters, literatuurgegevens of verwijs, indien van toepassing, naar proefopzet/standaard studieplan:**

Indien reservedieren voor het onderzoeksplan worden bestemd, dient dit nader te worden gespecificeerd. Motiveer de noodzaak voor reservedieren en het aantal, en geef aan welke behandelingen deze dieren eventueel ondergaan.

Doorgaans zal de proef worden uitgevoerd met de aantallen zoals aangegeven in item 4 (dus 4 groepen met 5, 10 of 20 dieren/sexe/groep; in geval van honden of (mini)pigs doorgaans (3-) 4 dieren/sexe/groep).

Ook het aantal reserve dieren zal conform deze informatie zijn. Het aangegeven aantal reserve dieren is nodig ter mogelijke vervanging van dieren die niet gebruikt kunnen worden door b.v. ziekte of afwijkend gewicht. Tevens dienen de reserve dieren als schildwachtdieren en kunnen eventueel gebruikt worden voor serologische bepalingen. Indien satelliet of recovery groepen moeten worden opgenomen dient dit te worden gemotiveerd in de verkorte aanvraag.

**PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING**

**12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:**

N.B. indien sprake is van een transgene lijn, in Nederland gemaakt na 1 april 1997, dient hiervoor een vergunning door de Minister van LNV te zijn verleend. Specificeer bij vraag 8.

Doorgaans Wistar rat (kan ook Sprague Dawley of andere stam zijn). Bij de keuze speelt eerder onderzoek, specifieke gevoeligheid, en achtergrondpathologie een rol. In plaats van de rat kan ook een muis worden gebruikt (CD-1 maar ook hier zijn verschillende stammen mogelijk). Daarnaast kunnen de studies worden uitgevoerd met Beagle honden of (mini)pigs (meestal Göttingen).

**13. Wat is de herkomst van de dieren:**

- aangekocht van proefdierfokker
- aangekocht elders, n.l.:
- overcomplete dieren
- eigen fok
- reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)
- anders, n.l.:

Aangekocht van proefdierfokker (meestal fokbedrijf binnen de EU, indien daar niet verkrijgbaar komen ook andere erkende instellingen in aanmerking).

**14. Wat is het eindpunt van de dierproef:**

- euthanasie ten behoeve van de proef
- euthanasie na afloop van de proef
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

Euthanasie. Knaagdieren door sedatie (doorgaans via O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> narcose, evt via Nembutal injectie) en verbloeding of door decapitatie. Honden en minipigs door sedatie (Sodium pentobarbital) en daarna verbloeding.

**15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?**

Vermeld groepssamenstelling, kooitype, voedersysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

Knaagdieren: Groeps- of individuele huisvesting in macrolon bakken met strooisel en kooiverrijking. In uitzonderingsgevallen (afhankelijk van specifieke vraagstellingen of bijzondere proefvoeren) kan huisvesting in draadgaaskooien worden overwogen. In dermale studies zullen de ratten standaard individueel gehuisvest worden in draadgaaskooien met kooiverrijking. In alle overige gevallen dient het gebruik van draadgaaskooien te worden gemotiveerd in de verkorte aanvraag. Mannelijke muizen worden individueel gehuisvest i.v.m. kans op vechten. Voeder (meel of pellet) en water worden verstrekt *ad libitum*.

Honden: Huisvesting in groepen (doorgaans per 4 mannetjes of 4 vrouwtjes) in (geschakelde) kennels (roestvrijstalen constructie met vaste bodem) of individueel bij canulatie. De kennels kunnen worden onderverdeeld in 4 aparte hokken (b.v. tijdens het voeren). De kennels worden dagelijks gereinigd. Voeder (pellets) wordt in dagelijks afgemeten hoeveelheden verstrekt. Water wordt verstrekt *ad libitum*. (Mini)pigs individueel (dermale blootstelling of gecanuleerd) of in groepen in kennels/hokken op stro en met speelbal.

Klimaat: Licht/donker: 12u/12u. Temperatuur: target 20-24 °C (knaagdieren)/ 15-21 °C (hond), 18-27 °C (Mini)pig). Relatieve vochtigheid: target 40 - 70 % . Inspectie van de dieren 2 x daags, weekenden 1 x daags.

**ONGERIEF**

**16. Beschrijf de aard van het ongerief:**

Geef hierbij, gespecificeerd **per handeling** of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.

| Groep(en) <sup>1</sup> | Aantal dieren <sup>2</sup> | (be)handeling en effecten <sup>3</sup> | Tijdsduur of frequentie <sup>4</sup> | Verwachte mate van ongerief <sup>5</sup> |
|------------------------|----------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|
|                        |                            |                                        |                                      |                                          |
|                        |                            |                                        |                                      |                                          |
|                        |                            |                                        |                                      |                                          |
|                        |                            |                                        |                                      |                                          |
|                        |                            |                                        |                                      |                                          |

Toelichting:

- 1 Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- 2 Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- 3 Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- 4 Tijdsduur wordt in uren, dagen, weken (resp u, d, w) uitgedrukt. Frequentie heeft betrekking op het aantal maal dat een (be)handeling wordt verricht (b.v. bloedmonsters, gavage).

- 5 Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandel-effect.  
Gebruik de codering:  
Code 1: gering  
Code 2: gering/matig  
Code 3: matig  
Code 4: matig/ernstig  
Code 5: ernstig  
Code 6: zeer ernstig  
[Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.]
- 6 Vermeld bij vraag 17 het ongerief dat verwacht wordt t.g.v. alle (be)handelingen en effecten, die de omschreven groep(en) ondervinden met gebruikmaking van de codes onder punt 5 code 1 t/m 5.

Voor elk onderzoeksplan (verkorte aanvraag) dient het ingeschatte ongerief specifiek ingevuld te worden.

Het ongerief als gevolg van proeftechnische handelingen wordt als volgt ingeschat:

- Groepshuisvesting Code 1. Individuele huisvesting < 4-wk Code 1; > 4wk Code 2 (excl. mannelijke muizen).
- Het merken, regelmatig wegen en tenslotte doden van de dieren voor sectie: gering ongerief (Code 1);
- Toediening teststof via voer: gering ongerief (Code 1);
- Dagelijks oraal doseren; matig ongerief (dwang) (Code 3);
- Doseren via intraveneuse, intraperitoneale, dermale, subcutane toedieningsroutes: matig tot ernstig ongerief (Code 3-5);
- Temperatuur transponder inbrengen (Code 2);
- Haarverwijdering met tondeuse: licht ongerief (Code 1);
- Eénmaal staartbloed voor glucose: gering/matig ongerief (kort pijn en schrik) (Code 2);
- Urine concentratietest knaagdier: Indiv. huisvesting/ voer- en wateronthouding <24 uur: gering/matig ongerief (Code 2), indien >24 uur: matig ongerief (Code 3); Afname urine bij de hond: gering-matig ongerief (Code 2)
- Ophthalmoscopisch onderzoek: enkelvoudig: gering. Herhaald: gering/matig (mydriasis, veel licht in het oog) (Code 2);
- FOB: enkelvoudig: gering; herhaald: gering/matig (provocatie reflexen) (Code 2);
- Bloedafname bij rat/muis: herhaald staart - gering/matig (herhaald maar kort pijn en schrik) (Code 2); orbitapunctie matig (kans weefseltrauma, ontwaken uit verdoving) (Code 3). Bloedafname bij de hond of (mini)pig: gering ongerief (Code 1);
- Effecten teststof: variërend van gering (of zelfs nihil) ongerief (Code 1) tot zeer ernstig (Code 6).

#### 17. Geef een inschatting van het totale verwachte ongerief voor het proefdier

Op basis van de tabel onder vraag 16 wordt per groep het totale ongerief geschat.

| Groep(en)                                 | Aantal dieren                             | Totaal ongerief                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| zie boven,<br>afhankelijk van<br>aanvraag | zie boven,<br>afhankelijk van<br>aanvraag | De kans op ongerief is een combinatie van de inschatting als weergegeven in antwoord op vraag 16. Het ongerief zal doorgaans gering zijn, maar soms tijdelijk hoger tgv biotechnische handelingen. Het ongerief wordt hierdoor op 2 geschat. Voor elk onderzoeksplan (verkorte aanvraag) dient het ingeschatte ongerief specifiek ingevuld te worden. |

#### 18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen? Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

De dieren worden minimaal 1x per dag bekeken waarbij goed op de klinische verschijnselen wordt gelet, zodat bij te groot ongerief de dieren voortijdig kunnen worden gedood (zie vraag 19).

Bloedafname (d.m.v. orbitapunctie) of verbloeding bij sectie geschiedt onder verdoving.

**19. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, dan wel voortijdig gedood?**

Dieren in slechte conditie worden zonodig individueel gehuisvest.

De criteria volgens welke de dieren uit de proef dienen te worden genomen staan vermeld in SOP

(Standaardwerkvoorschrift; 253). De beslissing wordt genomen na overleg tussen biotechnicus, veterinaire , proefdierdeskundige en/of study director.

**20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop?**

Specificeer hier het risico op en de aard van mogelijke complicaties, in aanvulling op het antwoord op vraag 16 en in samenhang met de beantwoording van vraag 19.

Indien van toepassing dient deze vraag in de verkorte aanvraag aan de orde te komen.

**ALTERNATIEVEN**

**21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel *in vivo* als *in vitro*, bestaan voor deze dierproef?**

**Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5 (doel van de proef), waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:**

**Geef ook aan in welke zin eventueel gebruik wordt gemaakt van alternatieve methoden:**

Het betreft hier door de overheid vereiste proeven. Er zijn voor dergelijke 'whole animal study' thans geen alternatieven. Het wordt algemeen onwaarschijnlijk geacht dat dergelijke alternatieven binnen afzienbare tijd beschikbaar zullen komen.

Voor het bepalen van de toxiciteit na herhaalde toediening dient een keuze te worden gemaakt tussen een 14-dagen, 28-dagen en een 90-dagen blootstelling. Vaak is er geen keuze maar schrijft regelgeving de blootstellingsduur voor. In principe wordt gekozen voor het beperktste protocol (kortste proefduur; zo min mogelijk dieren, testen en bemonsteringen). Het kan echter zijn dat in een later stadium alsnog b.v. een 13-wk studie vereist is (b.v. als het gebruik van de stof een jaarlijks tonnage gaat overschrijden).

Toediening van de teststof via het voeder verdient, i.v.m. het welzijn van de dieren, de voorkeur. Toediening via maagsonde is nodig wanneer de teststof niet stabiel is in het voeder, of wanneer de dieren b.v. te weinig zouden opnemen van voeder dat de teststof bevat, of wanneer de vraagstelling bolusadministratie vereist. Dergelijke vragen worden voorafgaand aan de hoofdstudie beantwoord (chemische analyse, voorproef). Ook dient voorinformatie over de toxiciteit van de teststof beschikbaar te zijn of verkregen te worden zodat de testdoseringen relevant zijn voor het doel en niet meer ongerief veroorzaken dan onvermijdelijk is.

Er wordt getracht het onderzoek zo uit te voeren dat alle gevraagde gegevens, voorzover te voorzien, in één studie verkregen worden. Eventuele aanvullende waarnemingen en eventuele extra dieren of groepen worden daarom direct in het onderzoeksplan opgenomen, zodat niet later een vergelijkbare maar uitgebreidere studie verricht hoeft te worden

**22. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan:**

- ☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]
- ☐ Art. 14 functionaris ([REDACTED], tel [REDACTED])
- ☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)
- ☐ elders, n.l.:
- ☒ zo nee; waarom niet:

Het betreft hier een door de overheid vereiste proef, volgens internationaal erkende richtlijnen

**ANDERE ASPEKTEN**

**23. Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang?**

Hier kan alle informatie aan de orde gesteld worden die u verder nog onder de aandacht van de Commissie wenst te brengen.

Dit aanvraagformulier is opgesteld om te voldoen aan het verzoek van de DEC tot vernieuwing van de algemene aanvraag voor de uitvoering van bovengenoemde studies (DEC adviezen 436, 912, 1378, 1817, 2073, 2535), teneinde dit type studies de komende tijd te kunnen aanmelden met gebruikmaking van het verkorte formulier. Uiteraard dient alle bijzondere, studiespecifieke informatie te worden vermeld bij elke verkorte procedure.

**24. Geef hieronder, indien van toepassing, toelichting op de door u in dit aanmeldformulier gebruikte afkortingen:**

Onderzoeker (contactpersoon)

[REDACTED]

datum:

Management

[REDACTED]

datum:

Na behandeling ontvangt de vergunninghouder het advies van de DEC TNO. Kopie van dit advies gaat tevens naar management en onderzoeker.