

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effecten van voeding op gedrag bij honden

Aanmeldcode / Protocol: 2008017.a

Stadia van de proef:

19-02-2008 Gekopieerd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Deze studie maakt onderdeel uit van het [redacted] AIO-onderzoeksproject van [redacted] ([redacted]), leerstoelgroep [redacted] en wordt in samenwerking met prof. [redacted] (leerstoelgroep [redacted]), en [redacted] (beide van leerstoelgroep [redacted]) uitgevoerd.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Nadere omschrijving:

Voeding wordt zelden gezien als een factor die invloed heeft op het gedrag van de hond. Ook in de wetenschappelijke literatuur zijn er weinig studies gepubliceerd waarin deze relatie bij honden is onderzocht (Bosch et al., 2007). Uit experimenten met andere diersoorten is gebleken dat er wel degelijk een relatie bestaat tussen gedrag en voeding. Zo is er gevonden dat een verhoogde opname van tryptofaan o.a. agressiviteit (Chamberlain et al 1987), obsessief-compulsief gedrag (Weld et al 1998) en stressgevoeligheid (Koopmans et al 2005) kan verminderen. Tryptofaan is een essentieel aminozuur wat in de hersenen omgezet kan worden naar de neurotransmitter serotonine. Een tekort aan serotonine kan o.a. effect hebben op prikkelbaarheid en gevoelens van angst. Een verhoging van het tryptofaangehalte in de voeding van honden met probleemgedragingen gerelateerd aan het serotonerge systeem (bijv. obsessief-compulsief gedrag, angstigheid, nervositeit) kan de aanmaak van serotonine bevorderen en mogelijk het probleemgedrag doen verminderen.

Daarnaast is gevonden dat een mengsel van vitaminen en mineralen antisociaal gedrag van kinderen vermindert (Schoenthaler et al 2000). Vergelijkbare resultaten zijn gevonden bij jonge gevangenen waarbij het sociaal gedrag werd verbeterd wanneer de gevangenen extra vitaminen, mineralen en omega-3 vetzuren kregen (Gesch et al 2002). Tot nu toe zijn er geen studies uitgevoerd waarbij gekeken is of een dergelijke verrijking van de voeding sociaal gedrag bij honden kan verbeteren.

Direct doel:

Deze studie zal zich richten op de effecten van het verrijken van voer met tryptofaan en een combinatie van tryptofaan, vitamine E, fosfatidylserine (een natuurlijke fosfolipide) en omega-3 vetzuren op probleemgedragingen bij honden.

Uiteindelijk doel:

Inzicht krijgen in de relatie tussen voeding en gedrag bij honden wat een bijdrage kan leveren aan het terugdringen van gedragsproblemen.

Literatuur

G. Bosch, B. Beerda, W.H. Hendriks, A.F.B. Van der Poel, M.W.A. Verstegen, 2007. Impact of nutrition on canine behaviour: current status and possible mechanisms. *Nutrition Research Reviews*, 20, 180-194.

Chamberlain B, Ervin FR, Pihl RO & Young SN (1987) The effect of raising or lowering tryptophan levels on aggression in vervet monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 28, 503-510.

Weld KP, Mench JA, Woodward RA, Bolesta MS, Suomi SJ & Higley JD (1998) Effect of tryptophan treatment on selfbiting and central nervous system serotonin metabolism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Neuropsychopharmacology* 19, 314-321.

Schoenthaler SJ & Bier ID (2000) The effect of vitamin/mineral supplementation on juvenile delinquency among American schoolchildren: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *J Altern Complement Med* 6, 7-17.

Gesch CB, Hammond SM, Hampson SE, Eves A & Crowder MJ (2002) Influence of supplementary vitamins, minerals and essential fatty acids on the antisocial behaviour of young adult prisoners. Randomised, placebo-controlled trial. *Br J Psychiatry* 181, 22-28.

Koopmans SJ, Ruis M, Dekker R, van Diepen H, Korte M & Mroz Z (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiology & Behavior* 85, 469-478.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Wereldwijd worden er jaarlijks miljoenen honden wegens gedragsproblemen aan het asiel afgestaan. Ook al wordt geprobeerd zo veel mogelijk honden terug bij gezinnen te plaatsen, een groot gedeelte van deze honden wordt uiteindelijk ingeslapen. Het exacte aantal is onbekend maar alleen al in de Verenigde Staten wordt het aantal geschat op 3 tot 6 miljoen honden en katten per jaar. Strategieën die gedragsproblemen bij honden tegengaan zullen het welzijn van honden en de eigenaren ten goede komen. Naast belangrijke factoren als opvoeding, sociale omgeving en ras, speelt voeding mogelijk een rol in het tot uiting komen van gedrag bij honden. Zoals eerder vermeldt, is er nog weinig bekend over deze relatie bij honden maar zijn er wel aanwijzingen bij andere diersoorten gevonden dat voeding invloed heeft op gedragingen (agressie, obsessief-compulsief gedrag), stressgevoeligheid en angstigheid. Onderzoek naar de effecten van tryptofaan en supplementen zoals omega-3 vetzuren en fosfatidylserine op gedrag bij honden zal nieuwe inzichten geven die gebruikt kunnen worden in het terugdringen van de incidentie in probleemgedragingen.

1.c. Leksamenvatting:

2. Gepland vanaf: 03-03-2008 tot 31-07-2008

3. Specificatie diergroepen:

Groep 1	50	honden	Honden die controlevoer krijgen
Groep 2	50	honden	Honden die controlevoer + extra tryptofaan krijgen
Groep 3	50	honden	Honden die controlevoer + extra tryptofaan, vitamine E, omega-3 vetzuren en fosfatidylserine

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Voor deze studie worden prive honden gebruikt die tot het type Retriever behoren (bijv Labrador Retriever, Golden Retriever). Dit type hond wordt in verhouding tot andere rassen veel als gezelschapdier gehouden waardoor er een groot aantal honden beschikbaar is om de studiepopulaties samen te stellen. Hondeneigenaren zullen worden gevraagd een vragenlijst in te vullen gericht op oa. problemen bij het alleen thuis zijn, gehoorzaamheid, agressiviteit en angstigheid van hun hond (deels gebaseerd op de Canine Behavioural Assessment and Research Questionnaire, CBARQ, Hsu & Serpell,

2003). Op basis van de vragenlijst zal er een selectie worden gemaakt van honden die betrokken worden bij het onderzoek. Hondeneigenaren worden benaderd via rasverenigingen, dierenartspraktijken, verenigingen van gedragstherapeuten voor honden, studieclubs, etc.

Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1293-1300.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Er is geen ander geschikt model om de gedragsresponse van honden op de voeders te onderzoeken.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Uit een berekening waarbij gebruik is gemaakt van gegevens uit verschillende gedragstesten is gebleken dat er enkele tientallen honden nodig zijn om een dergelijke proef uit te voeren. Het exacte aantal is helaas niet te bepalen.

4.d. Herkomst:

Groep 1	E. andere herkomst
Groep 2	E. andere herkomst
Groep 3	E. andere herkomst

Toelichting:

Prive honden

5.a. Accommodatie: Geen van deze (toelichten).

Honden worden niet gehuisvest. Eigenaren worden verzocht om in de thuissituatie te voeren. De eigenaren van honden die het controlevoer (voer A) en het voer met extra tryptofaan (voer B) worden uitgenodigd om met hun hond naar [REDACTED] te komen en deze deel te laten nemen aan de gedragstest. De gedragstest vindt plaats in het oude isotopenlaboratorium achter het gebouw van [REDACTED].

5.b. Huisvesting & Verzorging:

NVT

5.c. Voeding:

Er worden 3 droge geëxtrudeerde voeders samengesteld: A, controle voer (commercieel beschikbaar voer); B, controle voer + max 4 g/kg tryptofaan; C, controle voer + supplement (tryptofaan, vitaminen E, fosfatidylserine (een natuurlijke fosfolipide) en omega-3 vetzuren). De nutriëntensamenstelling van elk voer voldoet aan eisen zoals deze voor de Nederlandse commerciële hondenvoeders gelden en zijn samengesteld door [REDACTED], erkent wetenschapper in de voeding van gezelschapsdieren. Voer A betreft een standaard voer zonder deficienties in nutriënten waardoor voer B en C kunnen worden gezien als verrijkte voeders.

De hoeveelheid tryptofaan in het controlevoer is 2.1 g/kg wat voldoet aan richtlijnen opgesteld door NRC (2006) en FEDIAF (2008). Het voer B bevat maximaal 6 g/kg (de exacte hoeveelheid wordt nader bepaald). De hoeveelheid tryptofaan is lager dan in een voorgaande varkensstudie waarin de hoeveelheid tryptofaan in de voeders was verhoogd van 2 g/kg naar 7 g/kg (Koopmans et al., 2005; 2006). De exacte samenstelling van het supplement van voer C wordt nader bepaald door [REDACTED].

NRC (2006) Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, D.C., USA: National Academy Press.
FEDIAF (2008) Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.
www.fediaf.org (12 februari 2008).

Koopmans SJ, Guzik AC, van der Meulen J, Dekker R, Kogut J, Kerr BJ & Southern LL (2006) Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. *Journal of Animal Science* 84, 963-971.

Koopmans SJ, Ruis M, Dekker R, van Diepen H, Korte M & Mroz Z (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiology & Behavior* 85, 469-478.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

1. Proefvoer

Er worden 3 droge geextrudeerde voeders samengesteld: A, controle voer; B, controle voer + tryptofaan; C, controle voer + supplement (voor details zie tabblad voeding onder tabblad behuizing).

2. Proefgroepen

Eigenaren van honden van het type Retriever zullen worden gevraagd een internetvragenlijst in te vullen gericht op oa. problemen bij het alleen thuis zijn, nervositeit en angstigheid van hun hond (deels gebaseerd op de Canine Behavioural Assessment and Research Questionnaire, CBARQ, Hsu & Serpell, 2003). Op basis van de vragenlijst zal er een selectie worden gemaakt van honden die betrokken worden bij het onderzoek. Scores van de vragenlijsten worden gebruikt om honden toe te wijzen naar één van de drie voeders.

3. Proefopzet

De proef wordt dubbelblind uitgevoerd (deelnemers en onderzoekers weten in eerste instantie niet aan wie een controle of proefvoer is toegewezen). Elke hond zal gedurende 8 weken het bepaalde proefvoer door de hondeneigenaar gevoerd krijgen. In de week 4 wordt door de eigenaar een verkorte vragenlijst gericht op het gedrag van de hond ingevuld. Na 8 weken wordt de uitgebreidere vragenlijst die bij de selectie van honden is gebruikt door de eigenaren wederom ingevuld. Op basis van de uitkomsten van de uitgebreide vragenlijsten vooraf aan de proef en na 8 weken voeren wordt bepaald of het voer invloed heeft gehad op het probleemgedrag. De verkorte vragenlijsten uit week 4 wordt gebruikt om inzicht te krijgen in de effecten van het voer op het gedrag van de hond gedurende voerperiode. Daarnaast wordt een aantal deelnemers gevraagd om met de hond deel te nemen aan een kortdurende en weinig belastende gedragstest vóór de voerperiode en na 8 weken voeren. De gedragstest bestaat uit vier onderdelen en wordt voorafgegaan door bloedafname. Bloed (5 ml) wordt afgenomen door venipunctuur in de voorpoot (vena cephalica) en opgevangen in EDTA bloedbuizen. Het bloed wordt geanalyseerd op tryptofaan en tryptofaanmetaboliet (oa serotonine) concentraties en serotonine-receptoren op de bloedplaatjes om mogelijke veranderingen in het serotonerge systeem te evalueren en gedragseffecten te verklaren. De gedragstest bestaat uit de volgende onderdelen:

3.1 Open-field test

De hond wordt in de testruimte gelaten en het gedrag wordt voor 5 min geobserveerd. De testruimte is een gemeubileerde ruimte zoals eerder gebruikt voor proeven gericht op verlatingsangst bij honden [REDACTED]. De test heeft een duur van 5 minuten, waarin wordt gekeken hoe de hond reageert op de voor hem vreemde ruimte. De open-field test is een gestandaardiseerde methode om gespannenheid en angstigheid bij ratten en muizen te kwantificeren. Gedragingen die worden gescoord zijn o.a. locomotie en stress gerelateerde gedragingen (bijv. tong uit de bek, lichaam schudden, snuit likken).

3.2 Startle response

Na de 3 minuten durende open-field test zal er een kortdurende geluidspuls (duur 1 seconde, maximaal 90 dB) worden gegeven waarna het gedrag van de hond voor 3 minuten wordt geobserveerd. De geluidspuls is van een lage intensiteit en beoogt een oriëntatie / schrik reactie te induceren, niet een stress response. De procedure sluit aan bij gevalideerde gedragstesten om bij knaagdieren anxiety te meten.

3.3 Novel-object

Na de startle response test wordt er een novel-object hangend aan een touw in de ruimte neergelaten. De response van de hond op het object wordt voor 5 min geobserveerd. De procedure sluit aan bij gevalideerde gedragstesten om bij knaagdieren anxiety te meten.

3.4 Verlatingsangst

Deze test, de testruimte en de procedure zijn vrijwel identiek aan eerder onderzoek van [REDACTED] en [REDACTED] beschreven in het DEC protocol. Na een korte uitleg over de procedure aan de hondeneigenaar zullen de hond en eigenaar de testruimte betreden. Hond en eigenaar zijn gezamenlijk voor 3 minuten in de testruimte. Hierna zal de eigenaar de testruimte verlaten en wordt de

hond voor 5 min alleen gelaten in de testruimte. Na 5 min betreedt de eigenaar weer de testruimte en worden hond en eigenaar weer herenigd wat tevens voor 3 min zal duren.

Het gedrag van de hond wordt gedurende deze gedragstest direct gescoord met behulp van [REDACTED]

Literatuur

Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1293-1300.

De testen zijn samengesteld uit componenten welke zijn gevalideerd bij proefdieren (lees ratten en muizen).

Buwalda B, Koolhaas JM, Bohus B. 1992. Behavioral and cardiac responses to mild stress in young and aged rats: effects of amphetamine and vasopressin. *Physiol Behav.* 51(2):211-6.

Davis M., 1986. Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.* 100:814-824

Davis M., Falls W. A., Campeau S. and Kim M., 1993. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav. Brain Res.* 58: 175-198

Green S. and Hodges H., 1991. Animal models of anxiety. In: Willner P (Ed.) *Behavioral models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge, Cambridge University Press pp 21-49.

Grillon C., Ameli R., Merikangas K., Woods S. W. and Davis M., 1993. Measuring the time course of anticipatory anxiety using the fear-potentiated startle reflex. *Psychophysiology* 30: 340-346

Lee Y., Lopez D. E., Meloni E. G. and Davis M. A., 1996. A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J. Neurosci.* 16: 3775-3789

Daarnaast is gebruikt van bevindingen bij honden (stress onderzoek en praktijk gedragstesten, personal communication Joanne van der Borg).

Beerda B, Schilder MBH, Hooff van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58, 365-381

Voor de gedragsobservaties wordt gebruik gemaakt van wetenschappelijk gepubliceerde protocollen voor het observeren van stress gedragingen bij honden.

Beerda B, Schilder MBH, Hooff van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58, 365-381.

Beerda B, Schilder MBH, Hooff van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1999. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Physiology & Behavior*, 66(2), 233-242.

6.b. Mate van ongerief:

Groep 1	A. Gering
Groep 2	A. Gering
Groep 3	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Vóór de gedragstest in rust een bloedmonster afgenomen waarbij de hond gefixeerd moet worden. Het nemen van het monster alsmede het fixeren kan als gering ongerief door de hond worden ervaren.

Tijdens de gedragstesten worden de honden alleen gelaten in een voor de hond onbekende ruimte.

Hiernaast wordt de hond geconfronteerd met onverwachte geluidspuls (Startle response) en 'novel object'.

Mogelijk dat enkele honden hier angstig/agressief op zullen reageren. De testen zijn echter kortdurend en wijken nauwelijks af van wat de honden in hun dagelijks leven tegenkomen.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Groep 1	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Groep 2	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Groep 3	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Pijnbestrijding:	
Groep 1	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Groep 2	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Groep 3	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

De duur van gedragstesten is tot een minimum beperkt.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Groep 1	Het dier is na de proef in leven gelaten.
Groep 2	Het dier is na de proef in leven gelaten.
Groep 3	Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

NVT

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Voor deze studie zal een grote populatie honden variërend in angstigheid en nervositeit worden gevolgd. De voeders die gebruikt worden zijn complete voeders en de onderzoekers verwachten daardoor geen nadelige gevolgen voor de honden. Het belastende gedeelte van het experiment zijn de gedragstesten en bloedafname. Dit gedeelte van het experiment wordt echter door een beperkt aantal honden doorlopen. Omdat er wordt verwacht dat honden met hoge scores voor nervositeit en angstigheid het meest gevoelig zijn voor het voer met extra tryptofaan (voer B) nemen alleen honden deel aan dit gedeelte van het experiment die hoge scores voor nervositeit en angstigheid hebben en zijn gevoerd zijn met voer het controle voer (voer A) of het met tryptofaan verrijkte voer (voer B). Het aantal honden dat wordt uitgenodigd voor de gedragstest en bloedafname zal hierdoor lager zijn dan 2x50. Het exacte aantal honden zal afhankelijk zijn van het aantal aanmeldingen van hondeneigenaren met relatief nerveuse en angstige honden.

De samenstelling van de gedragstesten zijn specifiek gericht om gespannenheid, stress en angstigheid te meten. Door gebruik te maken van literatuurgegevens en resultaten uit voorgaande gedragsstudies kan worden gefocust op slechts een beperkt aantal testcomponenten. De te verwachten belasting voor de dieren is hierdoor minimaal.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008017.a (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
Groep 1	1	21	5	50					01	1	1	1	3
Groep 2	1	21	5	50					01	1	1	1	3
Groep 3	1	21	5	50					01	1	1	1	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:
Afdeling:

Titel dierproef: Effecten van voeding op gedrag bij honden

Aanmeldcode / Protocol: 2008017.b

Stadia van de proef:

20-02-2008	Aangemeld	
21-02-2008	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
15-04-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
16-04-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Deze studie maakt onderdeel uit van het [redacted] AIO-onderzoeksproject van [redacted] ([redacted]) en wordt in samenwerking met prof. [redacted] (leerstoolgroep [redacted]), en [redacted] (beide van leerstoelgroep [redacted]) uitgevoerd.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Nadere omschrijving:

Voeding wordt zelden gezien als een factor die invloed heeft op het gedrag van de hond. Ook in de wetenschappelijke literatuur zijn er weinig studies gepubliceerd waarin deze relatie bij honden is onderzocht (Bosch et al., 2007). Uit experimenten met andere diersoorten is gebleken dat er wel degelijk een relatie bestaat tussen gedrag en voeding. Zo is er gevonden dat een verhoogde opname van tryptofaan o.a. agressiviteit (Chamberlain et al 1987), obsessief-compulsief gedrag (Weld et al 1998) en stressgevoeligheid (Koopmans et al 2005) kan verminderen. Tryptofaan is een essentieel aminozuur wat in de hersenen omgezet kan worden naar de neurotransmitter serotonine. Een tekort aan serotonine kan o.a. effect hebben op prikkelbaarheid en gevoelens van angst. Een verhoging van het tryptofaangehalte in de voeding van honden met probleemgedragingen gerelateerd aan het serotonerge systeem (bijv. obsessief-compulsief gedrag, angstigheid, nervositeit) kan de aanmaak van serotonine bevorderen en mogelijk het probleemgedrag doen verminderen.

Daarnaast is gevonden dat een mengsel van vitaminen en mineralen antisociaal gedrag van kinderen vermindert (Schoenthaler et al 2000). Vergelijkbare resultaten zijn gevonden bij jonge gevangenen waarbij het sociaal gedrag werd verbeterd wanneer de gevangenen extra vitaminen, mineralen en omega-3 vetzuren kregen (Gesch et al 2002). Tot nu toe zijn er geen studies uitgevoerd waarbij gekeken is of een dergelijke verrijking van de voeding sociaal gedrag bij honden kan verbeteren.

Direct doel:

Deze studie zal zich richten op de effecten van het verrijken van voer met tryptofaan en een combinatie van

tryptofaan, vitamine E, fosfatidylserine (een natuurlijke fosfolipide) en omega-3 vetzuren op probleemgedragingen bij honden.

Uiteindelijk doel:

Inzicht krijgen in de relatie tussen voeding en gedrag bij honden wat een bijdrage kan leveren aan het terugdringen van gedragsproblemen.

Literatuur

G. Bosch, B. Beerda, W.H. Hendriks, A.F.B. Van der Poel, M.W.A. Verstegen, 2007. Impact of nutrition on canine behaviour: current status and possible mechanisms. *Nutrition Research Reviews*, 20, 180-194.

Chamberlain B, Ervin FR, Pihl RO & Young SN (1987) The effect of raising or lowering tryptophan levels on aggression in vervet monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 28, 503-510.

Weld KP, Mench JA, Woodward RA, Bolesta MS, Suomi SJ & Higley JD (1998) Effect of tryptophan treatment on selfbiting and central nervous system serotonin metabolism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Neuropsychopharmacology* 19, 314-321.

Schoenthaler SJ & Bier ID (2000) The effect of vitamin/mineral supplementation on juvenile delinquency among American schoolchildren: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *J Altern Complement Med* 6, 7-17.

Gesch CB, Hammond SM, Hampson SE, Eves A & Crowder MJ (2002) Influence of supplementary vitamins, minerals and essential fatty acids on the antisocial behaviour of young adult prisoners. Randomised, placebo-controlled trial. *Br J Psychiatry* 181, 22-28.

Koopmans SJ, Ruis M, Dekker R, van Diepen H, Korte M & Mroz Z (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiology & Behavior* 85, 469-478.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Wereldwijd worden er jaarlijks miljoenen honden wegens gedragsproblemen aan het asiel afgestaan. Ook al wordt geprobeerd zo veel mogelijk honden terug bij gezinnen te plaatsen, een groot gedeelte van deze honden wordt uiteindelijk ingeslapen. Het exacte aantal is onbekend maar alleen al in de Verenigde Staten wordt het aantal geschat op 3 tot 6 miljoen honden en katten per jaar. Strategieën die gedragsproblemen bij honden tegengaan zullen het welzijn van honden en de eigenaren ten goede komen. Naast belangrijke factoren als opvoeding, sociale omgeving en ras, speelt voeding mogelijk een rol in het tot uiting komen van gedrag bij honden. Zoals eerder vermeldt, is er nog weinig bekend over deze relatie bij honden maar zijn er wel aanwijzingen bij andere diersoorten gevonden dat voeding invloed heeft op gedragingen (agressie, obsessief-compulsief gedrag), stressgevoeligheid en angstigheid. Onderzoek naar de effecten van tryptofaan en supplementen zoals omega-3 vetzuren en fosfatidylserine op gedrag bij honden zal nieuwe inzichten geven die gebruikt kunnen worden in het terugdringen van de incidentie in probleemgedragingen.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 03-03-2008 tot 31-07-2008

3. Specificatie diergroepen:

Groep 1	50	honden	Honden die controlevoer krijgen
Groep 2	50	honden	Honden die controlevoer + extra tryptofaan krijgen
Groep 3	50	honden	Honden die controlevoer + extra tryptofaan, vitamine E, omega-3 vetzuren en fosfatidylserine

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Voor deze studie worden prive honden gebruikt die tot het type Retriever behoren (bijv Labrador Retriever, Golden Retriever). Dit type hond wordt in verhouding tot andere rassen veel als gezelschapsdier gehouden waardoor er een groot aantal honden beschikbaar is om de studiepopulaties samen te stellen.

Hondeneigenaren zullen worden gevraagd een vragenlijst in te vullen gericht op oa. problemen bij het alleen thuis zijn, gehoorzaamheid, agressiviteit en angstigheid van hun hond (deels gebaseerd op de Canine Behavioural Assessment and Research Questionnaire, CBARQ, Hsu & Serpell, 2003). Op basis van de vragenlijst zal er een selectie worden gemaakt van honden die betrokken worden bij het onderzoek. Hondeneigenaren worden benaderd via rasverenigingen, dierenartspraktijken, verenigingen van gedragstherapeuten voor honden, studieclubs, etc.

Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1293-1300.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Er is geen ander geschikt model om de gedragsresponse van honden op de voeders te onderzoeken.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Het gedrag van de honden wordt gemeten aan de hand van uiteenlopende parameters: scores op een schaal van 1-5 (enquêteresultaten) tot frequenties en uren van specifieke gedragselementen tijdens een gedragstest. Dergelijke type data zijn in eerdere studies verzameld en laten standaarddeviaties zien van ~ 1.1 voor angstscores op een schaal van 1-5 en standaarddeviaties van 1 tot 2 voor gedragscomponenten: geïntegreerde PCA scores (tussen -4 en 4) voor een set van gecorreleerde gedragselementen. De minimaal aantoonbare verschillen voor verschillende aantallen dieren per proefgroep is weergegeven in Table 1 ($\alpha=0.05$, $\text{power}=0.9$). Beoogd wordt om gemiddelde verschillen in enquêtescores in de range van 0.5-0.75 aan te kunnen tonen. Voor PCA scores zou een verschil rond de 1.0 aantoonbaar moeten zijn. Dit impliceert dat aantallen in de range van 50-75 dieren per groep nodig zijn voor voldoende power en dergelijk aantallen zijn eerder gebruikt in vergelijkbare, wetenschappelijk gepubliceerde studies (DeNapoli et al., 2000; Heath et al., 2007).

Tabel 1. Minimal differences of means

	alpha = 0.05 (two-sided), beta=0.1	PCAScore (<-4,4>, sigma=1)	PCAScore (<-4,4>, sigma=2)
	Survey score ([1,...,5], sigma=1.1)		
n = 10 / group	1.56	3.07	1.69
n = 20 / group	1.05	2.10	1.16
n = 30 / group	0.85	1.70	0.94
n = 40 / group	0.73	1.47	0.81
n = 50 / group	0.65	1.31	0.72
n = 75 / group	0.53	1.07	0.59

Referentie

DeNapoli JS, Dodman NH, Shuster L, Rand WM & Gross KL (2000) Effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217, 504-508. [Noot: originele 4 proefgroepen bestonden uit 11 honden die uiteindelijk gepoold zijn resulterende in 44 honden]

Heath SE, Barabas S & Craze PA (2007) Nutritional supplementation in cases of canine cognitive dysfunction - A clinical trial. *Applied Animal Behaviour Science* 105, 284-296. [Noot: in de studie zijn alleen honden met probleemgedrag gebruikt (geen 'normale' controle-honden); aantal honden voor placebo 24 en voor experimenteel voer 20 honden]

4.d. Herkomst:

Groep 1	E. andere herkomst
Groep 2	E. andere herkomst
Groep 3	E. andere herkomst

Toelichting:

Prive honden

5.a. Accommodatie: Geen van deze (toelichten)

Honden worden niet gehuisvest. Eigenaren worden verzocht om in de thuissituatie te voeren. De eigenaren

van honden die het controlevoer (voer A) en het voer met extra tryptofaan (voer B) worden uitgenodigd om met hun hond naar [REDACTED] te komen en deze deel te laten nemen aan de gedragstest. De gedragstest vindt plaats in het oude isotopenlaboratorium achter het gebouw van [REDACTED]

5.b. Huisvesting & Verzorging:

NVT

5.c. Voeding:

Er worden 3 droge geextrudeerde voeders samengesteld: A, controle voer (commercieel beschikbaar voer); B, controle voer + max 4 g/kg tryptofaan; C, controle voer + supplement (tryptofaan, vitaminen E, fosfatidylserine (een natuurlijke fosfolipide) en omega-3 vetzuren). De nutrientensamenstelling van elk voer voldoet aan eisen zoals deze voor de Nederlandse commerciële hondenvoeders gelden en zijn samengesteld door [REDACTED], erkent wetenschapper in de voeding van gezelschapsdieren. Voer A betreft een standaard voer zonder deficienties in nutrienten waardoor voer B en C kunnen worden gezien als verrijkte voeders.

De hoeveelheid tryptofaan in het controlevoer is 2.1 g/kg wat voldoet aan richtlijnen opgesteld door NRC (2006) en FEDIAF (2008). Het voer B bevat maximaal 6 g/kg (de exacte hoeveelheid wordt nader bepaald). De hoeveelheid tryptofaan is lager dan in een voorgaande varkensstudie waarin de hoeveelheid tryptofaan in de voeders was verhoogd van 2 g/kg naar 7 g/kg (Koopmans et al., 2005; 2006). De exacte samenstelling van het supplement van voer C wordt nader bepaald door [REDACTED]

NRC (2006) Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, D.C., USA: National Academy Press.

FEDIAF (2008) Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.

www.fediaf.org (12 februari 2008).

Koopmans SJ, Guzik AC, van der Meulen J, Dekker R, Kogut J, Kerr BJ & Southern LL (2006) Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets.

Journal of Animal Science 84, 963-971.

Koopmans SJ, Ruis M, Dekker R, van Diepen H, Korte M & Mroz Z (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. Physiology & Behavior 85, 469-478.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

1. Proefvoer

Er worden 3 droge geextrudeerde voeders samengesteld: A, controle voer; B, controle voer + tryptofaan; C, controle voer + supplement (voor details zie tabblad voeding onder tabblad behuizing).

2. Proefgroepen

Eigenaren van honden van het type Retriever zullen worden gevraagd een internetvragenlijst in te vullen gericht op oa. problemen bij het alleen thuis zijn, nervositeit en angstigheid van hun hond (deels gebaseerd op de Canine Behavioural Assessment and Research Questionnaire, CBARQ, Hsu & Serpell, 2003). Op basis van de vragenlijst zal er een selectie worden gemaakt van honden die betrokken worden bij het onderzoek. Scores van de vragenlijsten worden gebruikt om honden toe te wijzen naar één van de drie voeders.

3. Proefopzet

De proef wordt dubbelblind uitgevoerd (deelnemers en onderzoekers weten in eerste instantie niet aan wie een controle of proefvoer is toegewezen). Elke hond zal gedurende 8 weken het bepaalde proefvoer door de hondeneigenaar gevoerd krijgen. In de week 4 wordt door de eigenaar een verkorte vragenlijst gericht op het gedrag van de hond ingevuld. Na 8 weken wordt de uitgebreidere vragenlijst die bij de selectie van honden is gebruikt door de eigenaren wederom ingevuld. Op basis van de uitkomsten van de uitgebreide vragenlijsten vooraf aan de proef en na 8 weken voeren wordt bepaald of het voer invloed heeft gehad op het probleemgedrag. De verkorte vragenlijsten uit week 4 wordt gebruikt om inzicht te krijgen in de effecten van het voer op het gedrag van de hond gedurende voerperiode. Daarnaast wordt een aantal deelnemers gevraagd om met de hond deel te nemen aan een kortdurende en weinig belastende gedragstest vóór de voerperiode en na 8 weken voeren. De gedragstest bestaat uit vier onderdelen en wordt voorafgegaan

door bloedafname. Bloed (5 ml) wordt afgenomen door venipuncture in de voorpoot (vena cephalica) en opgevangen in EDTA bloedbuizen. Het bloed wordt geanalyseerd op tryptofaan en tryptofaanmetaboliet (oa serotonine) concentraties en serotonine-receptoren op de bloedplaatjes om mogelijke veranderingen in het serotonerge systeem te evalueren en gedragseffecten te verklaren. De gedragstest bestaat uit de volgende onderdelen:

3.1 Open-field test

De hond wordt in de testruimte gelaten en het gedrag wordt voor 5 min geobserveerd. De testruimte is een gemeubileerde ruimte zoals eerder gebruikt voor proeven gericht op verlatingsangst bij honden [REDACTED]. De test heeft een duur van 5 minuten, waarin wordt gekeken hoe de hond reageert op de voor hem vreemde ruimte. De open-field test is een gestandaardiseerde methode om gespannenheid en angstigheid bij ratten en muizen te kwantificeren. Gedragingen die worden gescoord zijn o.a. locomotie en stress gerelateerde gedragingen (bijv. tong uit de bek, lichaam schudden, snuit likken).

3.2 Startle response

Na de 3 minuten durende open-field test zal er een kortdurende geluidspuls (duur 1 seconde, maximaal 90 dB) worden gegeven waarna het gedrag van de hond voor 3 minuten wordt geobserveerd. De geluidspuls is van een lage intensiteit en beoogt een oriëntatie / schrik reactie te induceren, niet een stress response. De procedure sluit aan bij gevalideerde gedragstesten om bij knaagdieren anxiety te meten.

3.3 Novel-object

Na de startle response test wordt er een novel-object hangend aan een touw in de ruimte neergelaten. De response van de hond op het object wordt voor 5 min geobserveerd. De procedure sluit aan bij gevalideerde gedragstesten om bij knaagdieren anxiety te meten.

3.4 Verlatingsangst

Deze test, de testruimte en de procedure zijn vrijwel identiek aan eerder onderzoek van [REDACTED] en [REDACTED] beschreven in het DEC protocol. Na een korte uitleg over de procedure aan de hondeneigenaar zullen de hond en eigenaar de testruimte betreden. Hond en eigenaar zijn gezamenlijk voor 3 minuten in de testruimte. Hierna zal de eigenaar de testruimte verlaten en wordt de hond voor 5 min alleen gelaten in de testruimte. Na 5 min betreedt de eigenaar weer de testruimte en worden hond en eigenaar weer herenigd wat tevens voor 3 min zal duren.

Het gedrag van de hond wordt gedurende deze gedragstest direct gescoord met behulp van [REDACTED]

Literatuur

Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1293-1300.

De testen zijn samengesteld uit componenten welke zijn gevalideerd bij proefdieren (lees ratten en muizen).

Buwalda B, Koolhaas JM, Bohus B. 1992. Behavioral and cardiac responses to mild stress in young and aged rats: effects of amphetamine and vasopressin. *Physiol Behav.* 51(2):211-6.

Davis M., 1986. Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.* 100:814-824

Davis M., Falls W. A., Campeau S. and Kim M., 1993. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav. Brain Res.* 58: 175-198

Green S. and Hodges H., 1991. Animal models of anxiety. In: Willner P (Ed.) *Behavioral models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge, Cambridge University Press pp 21-49.

Grillon C., Ameli R., Merikangas K., Woods S. W. and Davis M., 1993. Measuring the time course of anticipatory anxiety using the fear-potentiated startle reflex. *Psychophysiology* 30: 340-346

Lee Y., Lopez D. E., Meloni E. G. and Davis M. A., 1996. A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J. Neurosci.* 16: 3775-3789

Daarnaast is gebruikt van bevindingen bij honden (stress onderzoek en praktijk gedragstesten, personal

communication Joanne van der Borg).

Beerda B, Schilder MBH, Hooff van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. Applied Animal Behaviour Science, 58, 365-381

Voor de gedragsobservaties wordt gebruik gemaakt van wetenschappelijk gepubliceerde protocollen voor het observeren van stress gedragingen bij honden.

Beerda B, Schilder MBH, Hooff van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. Applied Animal Behaviour Science, 58, 365-381.

Beerda B, Schilder MBH, Hooff van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1999. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. Physiology & Behavior, 66(2), 233-242.

6.b. Mate van ongerief:

Groep 1	A. Gering
Groep 2	A. Gering
Groep 3	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Vóór de gedragtest in rust een bloedmonster afgenomen waarbij de hond gefixeerd moet worden. Het nemen van het monster alsmede het fixeren kan als gering ongerief door de hond worden ervaren. Tijdens de gedragstesten worden de honden alleen gelaten in een voor de hond onbekende ruimte. Hiernaast wordt de hond geconfronteerd met onverwachte geluidspuls (Startle response) en 'novel object'. Mogelijk dat enkele honden hier angstig/agressief op zullen reageren. De testen zijn echter kortdurend en wijken nauwelijks af van wat de honden in hun dagelijks leven tegenkomen.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Groep 1	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Groep 2	A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Groep 3	A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Groep 1	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Groep 2	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Groep 3	A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

De duur van gedragstesten is tot een minimum beperkt.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Groep 1	Het dier is na de proef in leven gelaten.
Groep 2	Het dier is na de proef in leven gelaten.
Groep 3	Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

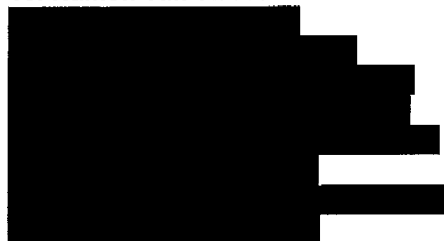
NVT

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Voor deze studie zal een grote populatie honden variërend in angstigheid en nervositeit worden gevolgd. De voeders die gebruikt worden zijn complete voeders en de onderzoekers verwachten daardoor geen nadelige gevolgen voor de honden. Het belastende gedeelte van het experiment zijn de gedragstesten en bloedafname. Dit gedeelte van het experiment wordt echter door een beperkt aantal honden doorlopen. Omdat er wordt verwacht dat honden met hoge scores voor nervositeit en angstigheid het meest gevoelig zijn voor het voer met extra tryptofaan (voer B) nemen alleen honden deel aan dit gedeelte van het experiment die hoge scores voor nervositeit en angstigheid hebben en zijn gevoerd zijn met voer het controle voer (voer A) of het met tryptofaan verrijkte voer (voer B). De werking van voer C wordt hierdoor

alleen getest via vragenlijsten. Het aantal honden dat wordt uitgenodigd voor de gedragstest en bloedafname zal hierdoor lager zijn dan 2x50. Het exacte aantal honden zal afhankelijk zijn van het aantal aanmeldingen van hondeneigenaren met relatief nerveuse en angstige honden. Het exacte aantal honden, dat aan de gedragstest wordt onderworpen zal t.z.t. bij de proefdierdeskundige worden gemeld. De samenstelling van de gedragstesten zijn specifiek gericht om gespannenheid, stress en angstigheid te meten. Door gebruik te maken van literatuurgegevens en resultaten uit voorgaande gedragsstudies kan worden gefocust op slechts een beperkt aantal testcomponenten. De te verwachten belasting voor de dieren is hierdoor minimaal.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008017.b (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
Groep 1	1	21	5	50					01	1	1	1	3
Groep 2	1	21	5	50					01	1	1	1	3
Groep 3	1	21	5	50					01	1	1	1	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effecten van voeding op gedrag bij honden

Aanmeldcode / Protocol: 2008017.c

Stadia van de proef:

16-04-2008	Aangemeld	
24-04-2008	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
04-08-2008	Wijzigen	Secretaris van de DEC
04-08-2008	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Deze studie maakt onderdeel uit van het [redacted] AIO-onderzoeksproject van [redacted] ([redacted] , leerstoelgroep [redacted]) en wordt in samenwerking met prof. [redacted] (leerstoelgroep [redacted]), [redacted] en [redacted] (beide van leerstoelgroep [redacted]) uitgevoerd.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Nadere omschrijving:

Voeding wordt zelden gezien als een factor die invloed heeft op het gedrag van de hond. Ook in de wetenschappelijke literatuur zijn er weinig studies gepubliceerd waarin deze relatie bij honden is onderzocht (Bosch et al., 2007). Uit experimenten met andere diersoorten is gebleken dat er wel degelijk een relatie bestaat tussen gedrag en voeding. Zo is er gevonden dat een verhoogde opname van tryptofaan o.a. agressiviteit (Chamberlain et al 1987), obsessief-compulsief gedrag (Weld et al 1998) en stressgevoeligheid (Koopmans et al 2005) kan verminderen. Tryptofaan is een essentieel aminozuur wat in de hersenen omgezet kan worden naar de neurotransmitter serotonine. Een tekort aan serotonine kan o.a. effect hebben op prikkelbaarheid en gevoelens van angst. Een verhoging van het tryptofaangehalte in de voeding van honden met probleemgedragingen gerelateerd aan het serotonerge systeem (bijv. obsessief-compulsief gedrag, angstigheid, nervositeit) kan de aanmaak van serotonine bevorderen en mogelijk het probleemgedrag doen verminderen.

Daarnaast is gevonden dat een mengsel van vitaminen en mineralen antisociaal gedrag van kinderen vermindert (Schoenthaler et al 2000). Vergelijkbare resultaten zijn gevonden bij jonge gevangenen waarbij het sociaal gedrag werd verbeterd wanneer de gevangenen extra vitaminen, mineralen en omega-3 vetzuren kregen (Gesch et al 2002). Tot nu toe zijn er geen studies uitgevoerd waarbij gekeken is of een dergelijke verrijking van de voeding sociaal gedrag bij honden kan verbeteren.

Direct doel:

Deze studie zal zich richten op de effecten van het verrijken van voer met tryptofaan en een combinatie

van tryptofaan, vitamine E, fosfatidylserine (een natuurlijke fosfolipide) en omega-3 vetzuren op probleemgedragingen bij honden.

Uiteindelijk doel:

Inzicht krijgen in de relatie tussen voeding en gedrag bij honden wat een bijdrage kan leveren aan het terugdringen van gedragsproblemen.

Literatuur

G. Bosch, B. Beerda, W.H. Hendriks, A.F.B. Van der Poel, M.W.A. Verstegen, 2007. Impact of nutrition on canine behaviour: current status and possible mechanisms. *Nutrition Research Reviews*, 20, 180-194.

Chamberlain B, Ervin FR, Pihl RO & Young SN (1987) The effect of raising or lowering tryptophan levels on aggression in vervet monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 28, 503-510.

Weld KP, Mench JA, Woodward RA, Bolesta MS, Suomi SJ & Higley JD (1998) Effect of tryptophan treatment on selfbiting and central nervous system serotonin metabolism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Neuropsychopharmacology* 19, 314-321.

Schoenthaler SJ & Bier ID (2000) The effect of vitamin/mineral supplementation on juvenile delinquency among American schoolchildren: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *J Altern Complement Med* 6, 7-17.

Gesch CB, Hammond SM, Hampson SE, Eves A & Crowder MJ (2002) Influence of supplementary vitamins, minerals and essential fatty acids on the antisocial behaviour of young adult prisoners. Randomised, placebo-controlled trial. *Br J Psychiatry* 181, 22-28.

Koopmans SJ, Ruis M, Dekker R, van Diepen H, Korte M & Mroz Z (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiology & Behavior* 85, 469-478.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Wereldwijd worden er jaarlijks miljoenen honden wegens gedragsproblemen aan het asiel afgestaan. Ook al wordt geprobeerd zo veel mogelijk honden terug bij gezinnen te plaatsen, een groot gedeelte van deze honden wordt uiteindelijk ingeslapen. Het exacte aantal is onbekend maar alleen al in de Verenigde Staten wordt het aantal geschat op 3 tot 6 miljoen honden en katten per jaar. Strategieën die gedragsproblemen bij honden tegengaan zullen het welzijn van honden en de eigenaren ten goede komen. Naast belangrijke factoren als opvoeding, sociale omgeving en ras, speelt voeding mogelijk een rol in het tot uiting komen van gedrag bij honden. Zoals eerder vermeldt, is er nog weinig bekend over deze relatie bij honden maar zijn er wel aanwijzingen bij andere diersoorten gevonden dat voeding invloed heeft op gedragingen (agressie, obsessief-compulsief gedrag), stressgevoeligheid en angstigheid. Onderzoek naar de effecten van tryptofaan en supplementen zoals omega-3 vetzuren en fosfatidylserine op gedrag bij honden zal nieuwe inzichten geven die gebruikt kunnen worden in het terugdringen van de incidentie in probleemgedragingen.

1.c. Leksamenvatting:

2. Gepland vanaf: 21-04-2008 tot 31-07-2008

3. Specificatie diergroepen:

Groep 1	50	honden	Honden die controlevoer krijgen
Groep 2	50	honden	Honden die controlevoer + extra tryptofaan krijgen

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Voor deze studie worden prive honden gebruikt die tot het type Retriever behoren (bijv Labrador Retriever, Golden Retriever). Dit type hond wordt in verhouding tot andere rassen veel als gezelschapsdier gehouden waardoor er een groot aantal honden beschikbaar is om de studiepopulaties samen te stellen. Hondeneigenaren zullen worden gevraagd een vragenlijst in te vullen gericht op oa. problemen bij het alleen thuis zijn, gehoorzaamheid, agressiviteit en angstigheid van hun hond (deels

gebaseerd op de Canine Behavioural Assessment and Research Questionnaire, CBARQ, Hsu & Serpell, 2003). Op basis van de vragenlijst zal er een selectie worden gemaakt van honden die betrokken worden bij het onderzoek. Hondeneigenaren worden benaderd via rasverenigingen, dierenartspraktijken, verenigingen van gedragstherapeuten voor honden, studieclubs, etc.

Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1293-1300.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Er is geen ander geschikt model om de gedragresponse van honden op de voeders te onderzoeken.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Het gedrag van de honden wordt gemeten aan de hand van uiteenlopende parameters: scores op een schaal van 1-5 (enquêteresultaten) tot frequenties en uren van specifieke gedragselementen tijdens een gedragstest. Dergelijke type data zijn in eerdere studies verzameld en laten standaarddeviaties zien van ~ 1.1 voor angstscores op een schaal van 1-5 en standaarddeviaties van 1 tot 2 voor gedragscomponentcores: geïntegreerde PCA scores (tussen -4 en 4) voor een set van gecorreleerde gedragselementen. De minimaal aantoonbare verschillen voor verschillende aantallen dieren per proefgroep is weergegeven in Table 1 ($\alpha=0.05$, $\text{power}=0.9$).

Beoogd wordt om gemiddelde verschillen in enquêtescores in de range van 0.5-0.75 aan te kunnen tonen. Voor PCA scores zou een verschil rond de 1.0 aantoonbaar moeten zijn. Dit impliceert dat aantallen in de range van 50-75 dieren per groep nodig zijn voor voldoende power en dergelijk aantallen zijn eerder gebruikt in vergelijkbare, wetenschappelijk gepubliceerde studies (DeNapoli et al., 2000; Heath et al., 2007). Voor dit onderzoek worden 100 honden per voergroep ingedeeld. Dit om eventuele uitval op te kunnen vangen en het onderscheidend vermogen te kunnen vergroten. Deze honden zullen alleen 8 weken worden gevoerd met een van de proefvoerders.

Tabel 1. Minimal differences of means

$\alpha = 0.05$ (two-sided), $\beta = 0.1$		PCAScore ($<-4,4>$, $\sigma=1$)	PCAScore ($<-4,4>$, $\sigma=2$)
Survey score ([1,...,5], $\sigma=1.1$)			
n = 10 / group	1.56	3.07	1.69
n = 20 / group	1.05	2.10	1.16
n = 30 / group	0.85	1.70	0.94
n = 40 / group	0.73	1.47	0.81
n = 50 / group	0.65	1.31	0.72
n = 75 / group	0.53	1.07	0.59

Referentie

DeNapoli JS, Dodman NH, Shuster L, Rand WM & Gross KL (2000) Effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217, 504-508. [Noot: originele 4 proefgroepen bestonden uit 11 honden die uiteindelijk gepoold zijn resulterende in 44 honden]

Heath SE, Barabas S & Craze PA (2007) Nutritional supplementation in cases of canine cognitive dysfunction - A clinical trial. *Applied Animal Behaviour Science* 105, 284-296. [Noot: in de studie zijn alleen honden met probleemgedrag gebruikt (geen 'normale' controle-honden); aantal honden voor placebo 24 en voor experimenteel voer 20 honden]

4.d. Herkomst:

Groep 1 E. andere herkomst

Groep 2 E. andere herkomst

Toelichting:

Prive honden

5.a. Accommodatie: Geen van deze (toelichten)

Honden worden niet gehuisvest. Eigenaren worden verzocht om in de thuissituatie te voeren. De

eigenaren van honden die het controlevoer (voer A) en het voer met extra tryptofaan (voer B) worden uitgenodigd om met hun hond naar [REDACTED] te komen en deze deel te laten nemen aan de gedragstest. De gedragstest vindt plaats in het oude isotopenlaboratorium achter het gebouw van [REDACTED]

5.b. Huisvesting & Verzorging: NVT

5.c. Voeding:

Er worden 3 droge geextrudeerde voeders samengesteld: A, controle voer (commercieel beschikbaar voer); B, controle voer + max 4 g/kg tryptofaan; C, controle voer + supplement (tryptofaan, vitaminen E, fosfatidylserine (een natuurlijke fosfolipide) en omega-3 vetzuren). De nutriëntensamenstelling van elk voer voldoet aan eisen zoals deze voor de Nederlandse commerciële hondenvoeders gelden en zijn samengesteld door [REDACTED], erkent wetenschapper in de voeding van gezelschapsdieren. Voer A betreft een standaard voer zonder deficienties in nutriënten waardoor voer B en C kunnen worden gezien als verrijkte voeders.

De hoeveelheid tryptofaan in het controlevoer is 2.1 g/kg wat voldoet aan richtlijnen opgesteld door NRC (2006) en FEDIAF (2008). Het voer B bevat maximaal 6 g/kg (de exacte hoeveelheid wordt nader bepaald). De hoeveelheid tryptofaan is lager dan in een voorgaande varkensstudie waarin de hoeveelheid tryptofaan in de voeders was verhoogd van 2 g/kg naar 7 g/kg (Koopmans et al., 2005; 2006). De exacte samenstelling van het supplement van voer C wordt nader bepaald door [REDACTED]

NRC (2006) Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, D.C., USA: National Academy Press.
FEDIAF (2008) Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.
www.fedaf.org (12 februari 2008).

Koopmans SJ, Guzik AC, van der Meulen J, Dekker R, Kogut J, Kerr BJ & Southern LL (2006) Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. *Journal of Animal Science* 84, 963-971.

Koopmans SJ, Ruis M, Dekker R, van Diepen H, Korte M & Mroz Z (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiology & Behavior* 85, 469-478.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

1. Proefvoer

Er worden 3 droge geextrudeerde voeders samengesteld: A, controle voer; B, controle voer + tryptofaan; C, controle voer + supplement (voor details zie tabblad Voeding onder tabblad Behuizing).

2. Proefgroepen

Eigenaren van honden bij voorkeur van het type Retriever zullen worden gevraagd een internetvragenlijst in te vullen gericht op oa. problemen bij het alleen thuis zijn, nervositeit en angstigheid van hun hond (deels gebaseerd op de Canine Behavioural Assessment and Research Questionnaire, CBARQ, Hsu & Serpell, 2003). Op basis van de vragenlijst zal er een selectie worden gemaakt van honden die betrokken worden bij het onderzoek. Scores van de vragenlijsten worden gebruikt om honden toe te wijzen naar één van de drie voeders. Totaal zullen er aan elk voeder 100 honden worden toegewezen resulterende in totaal 300 honden voor het onderzoek. Een beperkt aantal van de honden die voer A en voer B krijgen zal betrokken tevens worden bij het afnemen van de gedragstest en bloed- en urineverzamelen (maximaal 50 honden voor voergroep A en maximaal 50 honden voor voergroep B). De behandeling voor de overige honden zal dus alleen bestaan uit het voeren van de proefvoeders in de thuissituatie en worden niet aangemerkt als proefdieren.

3. Proefopzet

De proef wordt dubbelblind uitgevoerd (deelnemers en onderzoekers weten in eerste instantie niet aan wie een controle of proefvoer is toegewezen). Elke hond zal gedurende 8 weken het bepaalde proefvoer door de hondeneigenaar gevoerd krijgen. In de week 4 wordt door de eigenaar een verkorte vragenlijst gericht op het gedrag van de hond ingevuld. Na 8 weken wordt de uitgebreidere vragenlijst die bij de

selectie van honden is gebruikt door de eigenaren wederom ingevuld. Op basis van de uitkomsten van de uitgebreide vragenlijsten vooraf aan de proef en na 8 weken voeren wordt bepaald of het voer invloed heeft gehad op het probleemgedrag. De verkorte vragenlijsten uit week 4 wordt gebruikt om inzicht te krijgen in de effecten van het voer op het gedrag van de hond gedurende voerperiode. Daarnaast wordt een aantal deelnemers gevraagd om met de hond deel te nemen aan een kortdurende en weinig belastende gedragstest vóór de voerperiode en na 8 weken voeren. Vóór en na de gedragstest zal er speeksel worden verzameld voor de bepaling van cortisolconcentraties (gerelateerd aan het stressniveau). Speekselafname zal zoals in voorgaande studies worden uitgevoerd (2 wattenstaafjes in de wangzakken van de hond voor maximaal minuscule, zie DEC-protocol 2007002.c). Wij verwachten dat de cortisolconcentraties van de honden die controlevoer+tryptofaan hebben gekregen lager zullen zijn na de gedragstest dan de honden die het controlevoer hebben gekregen. De gedragstest bestaat uit vier onderdelen. De gedragstest bestaat uit de volgende onderdelen:

3.1 Open-field test

De hond wordt in de testruimte gelaten en het gedrag wordt voor 5 min geobserveerd. De testruimte is een gemeubileerde ruimte zoals eerder gebruikt voor proeven gericht op verlatingsangst bij honden. De test heeft een duur van 5 minuten, waarin wordt gekeken hoe de hond reageert op de voor hem vreemde ruimte. De open-field test is een gestandaardiseerde methode om gespannenheid en angstigheid bij ratten en muizen te kwantificeren. Gedragingen die worden gescoord zijn o.a. locomotie en stress gerelateerde gedragingen (bijv. tong uit de bek, lichaam schudden, snuit likken).

3.2 Startle response

Na de 5 minuten durende open-field test zal er een kortdurende geluidspuls (duur 1 seconde, maximaal 90 dB) worden gegeven waarna het gedrag van de hond voor 3 minuten wordt geobserveerd. De geluidspuls is van een lage intensiteit en beoogt een oriëntatie / schrik reactie te induceren, niet een stress response. De procedure sluit aan bij gevalideerde gedragstesten om bij knaagdieren anxiety te meten.

3.3 Novel-object

Na de startle response test wordt er een novel-object hangend aan een touw in de ruimte neergelaten. De response van de hond op het object wordt voor 5 min geobserveerd. De procedure sluit aan bij gevalideerde gedragstesten om bij knaagdieren anxiety te meten.

3.4 Verlatingsangst

Deze test, de testruimte en de procedure zijn vrijwel identiek aan eerder onderzoek van en beschreven in het DEC protocol. Na een korte uitleg over de procedure aan de hondeneigenaar zullen de hond en eigenaar de testruimte betreden. Hond en eigenaar zijn gezamenlijk voor 3 minuten in de testruimte. Hierna zal de eigenaar de testruimte verlaten en wordt de hond voor 5 min alleen gelaten in de testruimte. Na 5 min betreedt de eigenaar weer de testruimte en worden hond en eigenaar weer herenigd wat tevens voor 3 min zal duren.

Het gedrag van de hond wordt gedurende deze gedragstest direct gescoord met behulp van .

In de laatste week van de voerperiode zal er een bloedmonster worden afgenomen bij de hond en vragen wij de eigenaren een urinemonster te verzamelen tijdens het uitlaten in de middag.

3.5 Bloedmonster

De bloedafname zal bij de eigenaar thuis worden gedaan. Het verzamelde bloed (ongeveer 5 ml, venipunctie in de voorpoot (vena cephalica) en opgevangen in EDTA bloedbuizen) zal worden geanalyseerd op vrij en gebonden tryptofaanconcentraties in het plasma. De bepaling kan gebruikt worden om mogelijke veranderingen in het serotonerge systeem te evalueren en gedragseffecten te verklaren. Verwacht wordt dat de honden uit voergroep B een hogere concentratie aan vrij en gebonden tryptofaan zal hebben dan honden uit voergroep A.

3.6 Urinemonster

Enkele milliliters urine zijn betrekkelijk eenvoudig en met weinig tot geen stress op te vangen met een soepbord (onder het teefje schuiven) of soepopscheplepel. De urine zal in de vriezer worden opgeslagen en door ons worden opgehaald wat tevens gecombineerd kan worden met de bloedafname. In de urine verwachten we verschil in concentraties tryptofaanmetabolieten tussen voergroep A en B wat aan zal geven of het metabolisme van tryptofaan via het serotonine en/of kynurenine metabolisme is verhoogd en of er malabsorptie is van tryptofaan (verhoging van indolen in de urine). De bepaling kan gebruikt worden om mogelijke veranderingen in het serotonerge systeem te evalueren en gedragseffecten te verklaren.

4. Literatuur

Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1293-1300.

De testen zijn samengesteld uit componenten welke zijn gevalideerd bij proefdieren (lees ratten en muizen).

Buwalda B, Koolhaas JM, Bohus B. 1992. Behavioral and cardiac responses to mild stress in young and aged rats: effects of amphetamine and vasopressin. *Physiol Behav.* 51(2):211-6.

Davis M., 1986. Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.* 100:814-824

Davis M., Falls W. A., Campeau S. and Kim M., 1993. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav. Brain Res.* 58: 175-198

Green S. and Hodges H., 1991. Animal models of anxiety. In: Willner P (Ed.) *Behavioral models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge, Cambridge University Press pp 21-49.

Grillon C., Ameli R., Merikangas K., Woods S. W. and Davis M., 1993. Measuring the time course of anticipatory anxiety using the fear-potentiated startle reflex. *Psychophysiology* 30: 340-346

Lee Y., Lopez D. E., Meloni E. G. and Davis M. A., 1996. A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J. Neurosci.* 16: 3775-3789

Daarnaast is gebruikt van bevindingen bij honden (stress onderzoek en praktijk gedragstesten, personal communication Joanne van der Borg).

Beerda B, Schilder MBH, Hooft van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58, 365-381

Voor de gedragsobservaties wordt gebruik gemaakt van wetenschappelijk gepubliceerde protocollen voor het observeren van stress gedragingen bij honden.

Beerda B, Schilder MBH, Hooft van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58, 365-381.

Beerda B, Schilder MBH, Hooft van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1999. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Physiology & Behavior*, 66(2), 233-242.

6.b. Mate van ongerief:

Groep 1	A. Gering
Groep 2	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Bij de afname van het bloedmonster moet de hond gefixeerd worden. Het nemen van het monster alsmede het fixeren kan als gering ongerief door de hond worden ervaren. Tijdens de gedragstesten worden de honden alleen gelaten in een voor de hond onbekende ruimte. Hiernaast wordt de hond geconfronteerd met onverwachte geluidspuls (Startle response) en 'novel object'. Mogelijk dat enkele honden hier angstig/agressief op zullen reageren. De testen zijn echter kortdurend en wijken nauwelijks af van wat de honden in hun dagelijks leven tegenkomen.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- Groep 1 A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Groep 2 A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

- Groep 1 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Groep 2 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

De duur van gedragstesten is tot een minimum beperkt.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- Groep 1 Het dier is na de proef in leven gelaten.
Groep 2 Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

NVT

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Voor deze studie zal een grote populatie honden (300 honden) variërend in angstigheid en nervositeit worden gevolgd. De voeders die gebruikt worden zijn complete voeders en de onderzoekers verwachten daardoor geen nadelige gevolgen voor de honden. Het belastende gedeelte van het experiment zijn de gedragstesten en bloedafname. Dit gedeelte van het experiment wordt echter door een beperkt aantal honden doorlopen (maximaal 100 honden). Omdat er wordt verwacht dat honden met hoge scores voor nervositeit en angstigheid het meest gevoelig zijn voor het voer met extra tryptofaan (voer B) nemen alleen honden deel aan dit gedeelte van het experiment die hoge scores voor nervositeit en angstigheid hebben en zijn gevoerd zijn met voer het controle voer (voer A) of het met tryptofaan verrijkte voer (voer B). De werking van voer C wordt hierdoor alleen getest via vragenlijsten. Het aantal honden dat wordt uitgenodigd voor de gedragstest en bloedafname zal hierdoor lager zijn dan 2x50. Het exacte aantal honden zal afhankelijk zijn van het aantal aanmeldingen van hondeneigenaren met relatief nerveuse en angstige honden. Het exacte aantal honden, dat aan de gedragstest wordt onderworpen zal t.z.t. bij de proefdierdeskundige worden gemeld.

De samenstelling van de gedragstesten zijn specifiek gericht om gespannenheid, stress en angstigheid te meten. Door gebruik te maken van literatuurgegevens en resultaten uit voorgaande gedragsstudies kan worden gefocust op slechts een beperkt aantal testcomponenten. De te verwachten belasting voor de dieren is hierdoor minimaal.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008017.c (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
Groep 1	1	21	5	50					01	1	1	1	3
Groep 2	1	21	5	50					01	1	1	1	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effecten van voeding op gedrag bij honden

Aanmeldcode / Protocol: 2008017.d

Stadia van de proef:

07-08-2008	Aangemeld
11-08-2008	Wijzigen
11-08-2008	Gekopieerd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Deze studie maakt onderdeel uit van het [redacted] AIO-onderzoeksproject van [redacted] ([redacted])
[redacted], leerstoelgroep [redacted] en wordt in samenwerking met [redacted]
[redacted] en [redacted] (beide van leerstoelgroep [redacted])
uitgevoerd.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Nadere omschrijving:

Voeding wordt zelden gezien als een factor die invloed heeft op het gedrag van de hond. Ook in de wetenschappelijke literatuur zijn er weinig studies gepubliceerd waarin deze relatie bij honden is onderzocht (Bosch et al., 2007). Uit experimenten met andere diersoorten is gebleken dat er wel degelijk een relatie bestaat tussen gedrag en voeding. Zo is er gevonden dat een verhoogde opname van tryptofaan o.a. agressiviteit (Chamberlain et al 1987), obsessief-compulsief gedrag (Weld et al 1998) en stressgevoeligheid (Koopmans et al 2005) kan verminderen. Tryptofaan is een essentieel aminozuur wat in de hersenen omgezet kan worden naar de neurotransmitter serotonine. Een tekort aan serotonine kan o.a. effect hebben op prikkelbaarheid en gevoelens van angst. Een verhoging van het tryptofaangehalte in de voeding van honden met probleemgedragingen gerelateerd aan het serotonerge systeem (bijv. obsessief-compulsief gedrag, angstigheid, nervositeit) kan de aanmaak van serotonine bevorderen en mogelijk het probleemgedrag doen verminderen.

Daarnaast is gevonden dat een mengsel van vitaminen en mineralen antisociaal gedrag van kinderen vermindert (Schoenthaler et al 2000). Vergelijkbare resultaten zijn gevonden bij jonge gevangenen waarbij het sociaal gedrag werd verbeterd wanneer de gevangenen extra vitaminen, mineralen en omega-3 vetzuren kregen (Gesch et al 2002). Tot nu toe zijn er geen studies uitgevoerd waarbij gekeken is of een dergelijke verrijking van de voeding sociaal gedrag bij honden kan verbeteren.

Direct doel:

Deze studie zal zich richten op de effecten van het verrijken van voer met tryptofaan en een combinatie van tryptofaan, vitamine E, fosfatidylserine (een natuurlijke fosfolipide) en omega-3 vetzuren op

probleemgedragingen bij honden.

Uiteindelijk doel:

Inzicht krijgen in de relatie tussen voeding en gedrag bij honden wat een bijdrage kan leveren aan het terugdringen van gedragsproblemen.

Literatuur

G. Bosch, B. Beerda, W.H. Hendriks, A.F.B. Van der Poel, M.W.A. Verstegen, 2007. Impact of nutrition on canine behaviour: current status and possible mechanisms. *Nutrition Research Reviews*, 20, 180-194.

Chamberlain B, Ervin FR, Pihl RO & Young SN (1987) The effect of raising or lowering tryptophan levels on aggression in vervet monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 28, 503-510.

Weld KP, Mench JA, Woodward RA, Bolesta MS, Suomi SJ & Higley JD (1998) Effect of tryptophan treatment on selfbiting and central nervous system serotonin metabolism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Neuropsychopharmacology* 19, 314-321.

Schoenthaler SJ & Bier ID (2000) The effect of vitamin/mineral supplementation on juvenile delinquency among American schoolchildren: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *J Altern Complement Med* 6, 7-17.

Gesch CB, Hammond SM, Hampson SE, Eves A & Crowder MJ (2002) Influence of supplementary vitamins, minerals and essential fatty acids on the antisocial behaviour of young adult prisoners. Randomised, placebo-controlled trial. *Br J Psychiatry* 181, 22-28.

Koopmans SJ, Ruis M, Dekker R, van Diepen H, Korte M & Mroz Z (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiology & Behavior* 85, 469-478.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Wereldwijd worden er jaarlijks miljoenen honden wegens gedragsproblemen aan het asiel afgestaan. Ook al wordt geprobeerd zo veel mogelijk honden terug bij gezinnen te plaatsen, een groot gedeelte van deze honden wordt uiteindelijk ingeslapen. Het exacte aantal is onbekend maar alleen al in de Verenigde Staten wordt het aantal geschat op 3 tot 6 miljoen honden en katten per jaar. Strategieën die gedragsproblemen bij honden tegengaan zullen het welzijn van honden en de eigenaren ten goede komen. Naast belangrijke factoren als opvoeding, sociale omgeving en ras, speelt voeding mogelijk een rol in het tot uiting komen van gedrag bij honden. Zoals eerder vermeldt, is er nog weinig bekend over deze relatie bij honden maar zijn er wel aanwijzingen bij andere diersoorten gevonden dat voeding invloed heeft op gedragingen (agressie, obsessief-compulsief gedrag), stressgevoeligheid en angstigheid. Onderzoek naar de effecten van tryptofaan en supplementen zoals omega-3 vetzuren en fosfatidylserine op gedrag bij honden zal nieuwe inzichten geven die gebruikt kunnen worden in het terugdringen van de incidentie in probleemgedragingen.

1.c. Leksamenvervatting:

2. Gepland vanaf: 06-05-2008 tot 15-10-2008

3. Specificatie diergroepen:

Groep 1	50	honden	Honden die controlevoer krijgen
Groep 2	50	honden	Honden die controlevoer + extra tryptofaan krijgen

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Voor deze studie worden prive honden gebruikt die tot het type Retriever behoren (bijv Labrador Retriever, Golden Retriever). Dit type hond wordt in verhouding tot andere rassen veel als gezelschapsdier gehouden waardoor er een groot aantal honden beschikbaar is om de studiepopulaties samen te stellen. Hondeneigenaren zullen worden gevraagd een vragenlijst in te vullen gericht op oa. problemen bij het alleen thuis zijn, gehoorzaamheid, agressiviteit en angstigheid van hun hond (deels gebaseerd op de Canine Behavioural Assessment and Research Questionnaire, CBARQ, Hsu & Serpell,

2003). Op basis van de vragenlijst zal er een selectie worden gemaakt van honden die betrokken worden bij het onderzoek. Hondeneigenaren worden benaderd via rasverenigingen, dierenartspraktijken, verenigingen van gedragstherapeuten voor honden, studieclubs, etc.

Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1293-1300.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Er is geen ander geschikt model om de gedragsresponse van honden op de voeders te onderzoeken.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Het gedrag van de honden wordt gemeten aan de hand van uiteenlopende parameters: scores op een schaal van 1-5 (enquêteresultaten) tot frequenties en uren van specifieke gedragselementen tijdens een gedragstest. Dergelijke type data zijn in eerdere studies verzameld en laten standaarddeviaties zien van ~ 1.1 voor angstscores op een schaal van 1-5 en standaarddeviaties van 1 tot 2 voor gedragscomponenten: geïntegreerde PCA scores (tussen -4 en 4) voor een set van gecorreleerde gedragselementen. De minimaal aantoonbare verschillen voor verschillende aantallen dieren per proefgroep is weergegeven in Table 1 ($\alpha=0.05$, $\text{power}=0.9$).

Beoogd wordt om gemiddelde verschillen in enquêtescores in de range van 0.5-0.75 aan te kunnen tonen. Voor PCA scores zou een verschil rond de 1.0 aantoonbaar moeten zijn. Dit impliceert dat aantallen in de range van 50-75 dieren per groep nodig zijn voor voldoende power en dergelijk aantallen zijn eerder gebruikt in vergelijkbare, wetenschappelijk gepubliceerde studies (DeNapoli et al., 2000; Heath et al., 2007). Voor dit onderzoek worden 100 honden per voergroep ingedeeld. Dit om eventuele uitval op te kunnen vangen en het onderscheidend vermogen te kunnen vergroten. Deze honden zullen alleen 8 weken worden gevoerd met een van de proefvoerders.

Tabel 1. Minimal differences of means

	$\alpha = 0.05$ (two-sided), $\beta = 0.1$	PCAScore (<-4,4>, $\sigma=1$)	PCAScore (<-4,4>, $\sigma=2$)
Survey score ([1,...,5], $\sigma=1.1$)			
n = 10 / group	1.56	3.07	1.69
n = 20 / group	1.05	2.10	1.16
n = 30 / group	0.85	1.70	0.94
n = 40 / group	0.73	1.47	0.81
n = 50 / group	0.65	1.31	0.72
n = 75 / group	0.53	1.07	0.59

Referentie

DeNapoli JS, Dodman NH, Shuster L, Rand WM & Gross KL (2000) Effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217, 504-508. [Noot: originele 4 proefgroepen bestonden uit 11 honden die uiteindelijk gepoold zijn resulterende in 44 honden]

Heath SE, Barabas S & Craze PA (2007) Nutritional supplementation in cases of canine cognitive dysfunction - A clinical trial. *Applied Animal Behaviour Science* 105, 284-296. [Noot: in de studie zijn alleen honden met probleemgedrag gebruikt (geen 'normale' controle-honden); aantal honden voor placebo 24 en voor experimenteel voer 20 honden]

4.d. Herkomst:

Groep 1 E. andere herkomst

Groep 2 E. andere herkomst

Toelichting:

Prive honden

5.a. Accommodatie: Geen van deze (toelichten)

Honden worden niet gehuisvest. Eigenaren worden verzocht om in de thuissituatie te voeren. De eigenaren van honden die het controlevoer (voer A) en het voer met extra tryptofaan (voer B) worden

uitgenodigd om met hun hond naar [REDACTED] te komen en deze deel te laten nemen aan de gedragstest. De gedragstest vindt plaats in het oude isotopenlaboratorium achter het gebouw van [REDACTED]

5.b. Huisvesting & Verzorging:

NVT

5.c. Voeding:

Er worden 3 droge geextrudeerde voeders samengesteld: A, controle voer (commercieel beschikbaar voer); B, controle voer + max 4 g/kg tryptofaan; C, controle voer + supplement (tryptofaan, vitaminen E, fosfatidylserine (een natuurlijke fosfolipide) en omega-3 vetzuren). De nutriëntensamenstelling van elk voer voldoet aan eisen zoals deze voor de Nederlandse commerciële hondenvoeders gelden en zijn samengesteld door [REDACTED], erkent wetenschapper in de voeding van gezelschapsdieren. Voer A betreft een standaard voer zonder deficienties in nutriënten waardoor voer B en C kunnen worden gezien als verrijkte voeders.

De hoeveelheid tryptofaan in het controlevoer is 2.1 g/kg wat voldoet aan richtlijnen opgesteld door NRC (2006) en FEDIAF (2008). Het voer B bevat maximaal 6 g/kg (de exacte hoeveelheid wordt nader bepaald). De hoeveelheid tryptofaan is lager dan in een voorgaande varkensstudie waarin de hoeveelheid tryptofaan in de voeders was verhoogd van 2 g/kg naar 7 g/kg (Koopmans et al., 2005; 2006). De exacte samenstelling van het supplement van voer C wordt nader bepaald door [REDACTED].

NRC (2006) Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, D.C., USA: National Academy Press.

FEDIAF (2008) Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.

www.fediaf.org (12 februari 2008).

Koopmans SJ, Guzik AC, van der Meulen J, Dekker R, Kogut J, Kerr BJ & Southern LL (2006) Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. *Journal of Animal Science* 84, 963-971.

Koopmans SJ, Ruis M, Dekker R, van Diepen H, Korte M & Mroz Z (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiology & Behavior* 85, 469-478.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

1. Proefvoer

Er worden 3 droge geextrudeerde voeders samengesteld: A, controle voer; B, controle voer + tryptofaan; C, controle voer + supplement (voor details zie tabblad Voeding onder tabblad Behuizing).

2. Proefgroepen

Eigenaren van honden bij voorkeur van het type Retriever zullen worden gevraagd een internetvragenlijst in te vullen gericht op oa. problemen bij het alleen thuis zijn, nervositeit en angstigheid van hun hond (deels gebaseerd op de Canine Behavioural Assessment and Research Questionnaire, CBARQ, Hsu & Serpell, 2003). Op basis van de vragenlijst zal er een selectie worden gemaakt van honden die betrokken worden bij het onderzoek. Scores van de vragenlijsten worden gebruikt om honden toe te wijzen naar één van de drie voeders. Totaal zullen er aan elk voeder 100 honden worden toegewezen resulterende in totaal 300 honden voor het onderzoek. Een beperkt aantal van de honden die voer A en voer B krijgen zal betrokken tevens worden bij het afnemen van de gedragstest en bloed- en urineverzamelen (maximaal 50 honden voor voergroep A en maximaal 50 honden voor voergroep B). De behandeling voor de overige honden zal dus alleen bestaan uit het voeren van de proefvoeders in de thuissituatie en worden niet aangemerkt als proefdieren.

3. Proefopzet

De proef wordt dubbelblind uitgevoerd (deelnemers en onderzoekers weten in eerste instantie niet aan wie een controle of proefvoer is toegewezen). Elke hond zal gedurende 8 weken het bepaalde proefvoer door de hondeneigenaar gevoerd krijgen. In de week 4 wordt door de eigenaar een verkorte vragenlijst gericht op het gedrag van de hond ingevuld. Na 8 weken wordt de uitgebreidere vragenlijst die bij de selectie van honden is gebruikt door de eigenaren wederom ingevuld. Op basis van de uitkomsten van de

uitgebreide vragenlijsten vooraf aan de proef en na 8 weken voeren wordt bepaald of het voer invloed heeft gehad op het probleemgedrag. De verkorte vragenlijsten uit week 4 wordt gebruikt om inzicht te krijgen in de effecten van het voer op het gedrag van de hond gedurende voerperiode. Daarnaast wordt een aantal deelnemers gevraagd om met de hond deel te nemen aan een kortdurende en weinig belastende gedragstest vóór de voerperiode en na 8 weken voeren. Vóór en na de gedragstest zal er speeksel worden verzameld voor de bepaling van cortisolconcentraties (gerelateerd aan het stressniveau). Speekselafname zal zoals in voorgaande studies worden uitgevoerd (2 wattenstaafjes in de wangzakken van de hond voor maximaal minuit, zie DEC-protocol 2007002.c). Wij verwachten dat de cortisolconcentraties van de honden die controlevoer+tryptofaan hebben gekregen lager zullen zijn na de gedragstest dan de honden die het controlevoer hebben gekregen. De gedragstest bestaat uit vier onderdelen. De gedragstest bestaat uit de volgende onderdelen:

3.1 Open-field test

De hond wordt in de testruimte gelaten en het gedrag wordt voor 1 min geobserveerd. De testruimte is een lege ruimte zoals eerder gebruikt voor proeven (). De test heeft een duur van 1 minuut, waarin wordt gekeken hoe de hond reageert op de voor hem vreemde ruimte. De open-field test is een gestandaardiseerde methode om gespannenheid en angstigheid bij ratten en muizen te kwantificeren. Gedragingen die worden gescoord zijn o.a. locomotie en stress gerelateerde gedragingen (bijv. tong uit de bek, lichaam schudden, snuit likken). Tijdens de open-field test is een achtergrondruis aanwezig met lage intensiteit.

3.2 Sudden-silence test

De achtergrondruis valt na 1 min open-field test weg. Dit zal mogelijk het stoppen van gedrag veroorzaken (bijv. het stoppen van locomotie/exploratie) in combinatie met een orientatie-reactie.

3.3 Startle response

Na de sudden-silence test zal er een kortdurende geluidspuls (duur 1 seconde, maximaal 90 dB) worden gegeven waarna het gedrag van de hond voor 1 minuut wordt geobserveerd. De geluidspuls is van een lage intensiteit en beoogt een oriëntatie / schrik reactie te induceren, niet een stress response. De procedure sluit aan bij gevalideerde gedragstesten om bij knaagdieren anxiety te meten.

3.4 Novel-object

Na de startle response test wordt er een novel-object hangend aan een touw in de ruimte neergelaten. De response van de hond op het object wordt voor 1 min geobserveerd. De procedure sluit aan bij gevalideerde gedragstesten om bij knaagdieren anxiety te meten.

3.5 Verlatingsangst

Deze test, de testruimte en de procedure zijn vrijwel identiek aan eerder onderzoek van en beschreven in het DEC protocol. Na een korte uitleg over de procedure aan de hondeneigenaar zullen de hond en eigenaar de testruimte betreden. Hond en eigenaar zijn gezamenlijk voor 3 minuten in de testruimte. Hierna zal de eigenaar de testruimte verlaten en wordt de hond voor 5 min alleen gelaten in de testruimte. Na 5 min betreedt de eigenaar weer de testruimte en worden hond en eigenaar weer herenigd wat tevens voor 3 min zal duren.

Het gedrag van de hond wordt gedurende deze gedragstest direct gescoord met behulp van

In de laatste week van de voerperiode zal er een bloedmonster worden afgenomen bij de hond en vragen wij de eigenaren een urinemonster te verzamelen tijdens het uitlaten in de middag.

3.6 Bloedmonster

De bloedafname zal door , hoofd bij het Departement , bij de eigenaar thuis worden gedaan. Het verzamelde bloed (ongeveer 10 ml, venipuncture in de hals en opgevangen in EDTA bloedbuizen) zal worden geanalyseerd op concentraties vrije aminozuren (o.a. tryptofaan) in het plasma. De bepaling kan gebruikt worden om mogelijke veranderingen in het

serotonerge systeem te evalueren en gedragseffecten te verklaren. Verwacht wordt dat de honden uit voergroep B een hogere concentratie aan tryptofaan zal hebben dan honden uit voergroep A.

3.7 Urinemonster

Enkele milliliters urine zijn betrekkelijk eenvoudig en met weinig tot geen stress op te vangen met een soepbord (onder het teefje schuiven) of soepopscheplepel. De urine zal in de vriezer worden opgeslagen en door ons worden opgehaald wat tevens gecombineerd kan worden met de bloedafname. In de urine verwachten we verschil in concentraties tryptofaanmetabolieten tussen voergroep A en B wat aan zal geven of het metabolisme van tryptofaan via het serotonine en/of kynurenine metabolisme is verhoogd en of er malabsorptie is van tryptofaan (verhoging van indolen in de urine). De bepaling kan gebruikt worden om mogelijke veranderingen in het serotonerge systeem te evalueren en gedragseffecten te verklaren.

4. Literatuur

Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1293-1300.

De testen zijn samengesteld uit componenten welke zijn gevalideerd bij proefdieren (lees ratten en muizen).

Buwalda B, Koolhaas JM, Bohus B. 1992. Behavioral and cardiac responses to mild stress in young and aged rats: effects of amphetamine and vasopressin. *Physiol Behav.* 51(2):211-6.

Davis M., 1986. Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.* 100:814-824

Davis M., Falls W. A., Campeau S. and Kim M., 1993. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav. Brain Res.* 58: 175-198

Green S. and Hodges H., 1991. Animal models of anxiety. In: Willner P (Ed.) *Behavioral models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge, Cambridge University Press pp 21-49.

Grillon C., Ameli R., Merikangas K., Woods S. W. and Davis M., 1993. Measuring the time course of anticipatory anxiety using the fear-potentiated startle reflex. *Psychophysiology* 30: 340-346

Lee Y., Lopez D. E., Meloni E. G. and Davis M. A., 1996. A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J. Neurosci.* 16: 3775-3789

Daarnaast is gebruikt van bevindingen bij honden (stress onderzoek en praktijk gedragstesten, personal communication Joanne van der Borg).

Beerda B, Schilder MBH, Hooft van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58, 365-381

Voor de gedragsobservaties wordt gebruik gemaakt van wetenschappelijk gepubliceerde protocollen voor het observeren van stress gedragingen bij honden.

Beerda B, Schilder MBH, Hooft van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58, 365-381.

Beerda B, Schilder MBH, Hooft van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1999. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Physiology & Behavior*, 66(2), 233-242.

6.b. Mate van ongerief:

Groep 1	A. Gering
Groep 2	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Bij de afname van het bloedmonster moet de hond gefixeerd worden. Het nemen van het monster alsmede het fixeren kan als gering ongerief door de hond worden ervaren. Tijdens de gedragstesten worden de honden alleen gelaten in een voor de hond onbekende ruimte. Hiernaast wordt de hond

geconfronteerd met onverwachte geluidspuls (Startle response) en 'novel object'. Mogelijk dat enkele honden hier angstig/agressief op zullen reageren. De testen zijn echter kortdurend en wijken nauwelijks af van wat de honden in hun dagelijks leven tegenkomen.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Groep 1 A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Groep 2 A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Groep 1 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Groep 2 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

De duur van gedragstesten is tot een minimum beperkt.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Groep 1 Het dier is na de proef in leven gelaten.

Groep 2 Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

NVT

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Voor deze studie zal een grote populatie honden (300 honden) variërend in angstigheid en nervositeit worden gevolgd. De voeders die gebruikt worden zijn complete voeders en de onderzoekers verwachten daardoor geen nadelige gevolgen voor de honden. Het belastende gedeelte van het experiment zijn de gedragstesten en bloedafname. Dit gedeelte van het experiment wordt echter door een beperkt aantal honden doorlopen (maximaal 100 honden). Omdat er wordt verwacht dat honden met hoge scores voor nervositeit en angstigheid het meest gevoelig zijn voor het voer met extra tryptofaan (voer B) nemen alleen honden deel aan dit gedeelte van het experiment die hoge scores voor nervositeit en angstigheid hebben en zijn gevoerd zijn met voer het controle voer (voer A) of het met tryptofaan verrijkte voer (voer B). De werking van voer C wordt hierdoor alleen getest via vragenlijsten. Het aantal honden dat wordt uitgenodigd voor de gedragstest en bloedafname zal hierdoor lager zijn dan 2x50. Het exacte aantal honden zal afhankelijk zijn van het aantal aanmeldingen van hondeneigenaren met relatief nerveuse en angstige honden. Het exacte aantal honden, dat aan de gedragstest wordt onderworpen zal t.z.t. bij de proefdierdeskundige worden gemeld.

De samenstelling van de gedragstesten zijn specifiek gericht om gespannenheid, stress en angstigheid te meten. Door gebruik te maken van literatuurgegevens en resultaten uit voorgaande gedragsstudies kan worden gefocust op slechts een beperkt aantal testcomponenten. De te verwachten belasting voor de dieren is hierdoor minimaal.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008017.d (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
Groep 1	1	21	5	50					01	1	1	1	3

Groep 2	1	21	5	50	01	1	1	1	3
---------	---	----	---	----	----	---	---	---	---

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Effecten van voeding op gedrag bij honden

Aanmeldcode / Protocol: 2008017.e

Stadia van de proef:

11-08-2008

Aangemeld

11-08-2008

Goedgekeurd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting:

Deze studie maakt onderdeel uit van het [redacted] AIO-onderzoeksproject van [redacted] ([redacted]
[redacted], leerstoelgroep [redacted]) en wordt in samenwerking met prof.
[redacted] (leerstoelgroep [redacted]),
[redacted] en [redacted] (beide van leerstoelgroep [redacted])
uitgevoerd.

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. van dieren

Nadere omschrijving:

Voeding wordt zelden gezien als een factor die invloed heeft op het gedrag van de hond. Ook in de wetenschappelijke literatuur zijn er weinig studies gepubliceerd waarin deze relatie bij honden is onderzocht (Bosch et al., 2007). Uit experimenten met andere diersoorten is gebleken dat er wel degelijk een relatie bestaat tussen gedrag en voeding. Zo is er gevonden dat een verhoogde opname van tryptofaan o.a. agressiviteit (Chamberlain et al 1987), obsessief-compulsief gedrag (Weld et al 1998) en stressgevoeligheid (Koopmans et al 2005) kan verminderen. Tryptofaan is een essentieel aminozuur wat in de hersenen omgezet kan worden naar de neurotransmitter serotonine. Een tekort aan serotonine kan o.a. effect hebben op prikkelbaarheid en gevoelens van angst. Een verhoging van het tryptofaangehalte in de voeding van honden met probleemgedragingen gerelateerd aan het serotonerge systeem (bijv. obsessief-compulsief gedrag, angstigheid, nervositeit) kan de aanmaak van serotonine bevorderen en mogelijk het probleemgedrag doen verminderen.

Daarnaast is gevonden dat een mengsel van vitaminen en mineralen antisociaal gedrag van kinderen vermindert (Schoenthaler et al 2000). Vergelijkbare resultaten zijn gevonden bij jonge gevangenen waarbij het sociaal gedrag werd verbeterd wanneer de gevangenen extra vitaminen, mineralen en omega-3 vetzuren kregen (Gesch et al 2002). Tot nu toe zijn er geen studies uitgevoerd waarbij gekeken is of een dergelijke verrijking van de voeding sociaal gedrag bij honden kan verbeteren.

Direct doel:

Deze studie zal zich richten op de effecten van het verrijken van voer met tryptofaan en een combinatie van tryptofaan, vitamine E, fosfatidylserine (een natuurlijke fosfolipide) en omega-3 vetzuren op probleemgedragingen bij honden.

Uiteindelijk doel:

Inzicht krijgen in de relatie tussen voeding en gedrag bij honden wat een bijdrage kan leveren aan het terugdringen van gedragsproblemen.

Literatuur

G. Bosch, B. Beerda, W.H. Hendriks, A.F.B. Van der Poel, M.W.A. Verstegen, 2007. Impact of nutrition on canine behaviour: current status and possible mechanisms. *Nutrition Research Reviews*, 20, 180-194.

Chamberlain B, Ervin FR, Pihl RO & Young SN (1987) The effect of raising or lowering tryptophan levels on aggression in vervet monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 28, 503-510.

Weld KP, Mench JA, Woodward RA, Bolesta MS, Suomi SJ & Higley JD (1998) Effect of tryptophan treatment on selfbiting and central nervous system serotonin metabolism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Neuropsychopharmacology* 19, 314-321.

Schoenthaler SJ & Bier ID (2000) The effect of vitamin/mineral supplementation on juvenile delinquency among American schoolchildren: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *J Altern Complement Med* 6, 7-17.

Gesch CB, Hammond SM, Hampson SE, Eves A & Crowder MJ (2002) Influence of supplementary vitamins, minerals and essential fatty acids on the antisocial behaviour of young adult prisoners. Randomised, placebo-controlled trial. *Br J Psychiatry* 181, 22-28.

Koopmans SJ, Ruis M, Dekker R, van Diepen H, Korte M & Mroz Z (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiology & Behavior* 85, 469-478.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

Wereldwijd worden er jaarlijks miljoenen honden wegens gedragsproblemen aan het asiel afgestaan. Ook al wordt geprobeerd zo veel mogelijk honden terug bij gezinnen te plaatsen, een groot gedeelte van deze honden wordt uiteindelijk ingeslapen. Het exacte aantal is onbekend maar alleen al in de Verenigde Staten wordt het aantal geschat op 3 tot 6 miljoen honden en katten per jaar. Strategieën die gedragsproblemen bij honden tegengaan zullen het welzijn van honden en de eigenaren ten goede komen. Naast belangrijke factoren als opvoeding, sociale omgeving en ras, speelt voeding mogelijk een rol in het tot uiting komen van gedrag bij honden. Zoals eerder vermeldt, is er nog weinig bekend over deze relatie bij honden maar zijn er wel aanwijzingen bij andere diersoorten gevonden dat voeding invloed heeft op gedragingen (agressie, obsessief-compulsief gedrag), stressgevoeligheid en angstigheid. Onderzoek naar de effecten van tryptofaan en supplementen zoals omega-3 vetzuren en fosfatidylserine op gedrag bij honden zal nieuwe inzichten geven die gebruikt kunnen worden in het terugdringen van de incidentie in probleemgedragingen.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 06-05-2008 tot 15-10-2008

3. Specificatie diergroepen:

Groep 1	50	honden	Honden die controlevoer krijgen
Groep 2	50	honden	Honden die controlevoer + extra tryptofaan krijgen

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

Voor deze studie worden prive honden gebruikt die tot het type Retriever behoren (bijv Labrador Retriever, Golden Retriever). Dit type hond wordt in verhouding tot andere rassen veel als gezelschapsdier gehouden waardoor er een groot aantal honden beschikbaar is om de studiepopulaties samen te stellen. Hondeneigenaren zullen worden gevraagd een vragenlijst in te vullen gericht op oa. problemen bij het alleen thuis zijn, gehoorzaamheid, agressiviteit en angstigheid van hun hond (deels gebaseerd op de Canine Behavioural Assessment and Research Questionnaire, CBARQ, Hsu & Serpell, 2003). Op basis van de vragenlijst zal er een selectie worden gemaakt van honden die betrokken worden

bij het onderzoek. Hondeneigenaren worden benaderd via rasverenigingen, dierenartspraktijken, verenigingen van gedragstherapeuten voor honden, studieclubs, etc.

Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1293-1300.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

Er is geen ander geschikt model om de gedragsresponse van honden op de voeders te onderzoeken.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Het gedrag van de honden wordt gemeten aan de hand van uiteenlopende parameters: scores op een schaal van 1-5 (enquêteresultaten) tot frequenties en uren van specifieke gedragselementen tijdens een gedragstest. Dergelijke type data zijn in eerdere studies verzameld en laten standaarddeviaties zien van ~ 1.1 voor angstscores op een schaal van 1-5 en standaarddeviaties van 1 tot 2 voor gedragscomponenten: geïntegreerde PCA scores (tussen -4 en 4) voor een set van gecorreleerde gedragselementen. De minimaal aantoonbare verschillen voor verschillende aantallen dieren per proefgroep is weergegeven in Table 1 ($\alpha=0.05$, power= 0.9). Beoogd wordt om gemiddelde verschillen in enquêtescores in de range van 0.5-0.75 aan te kunnen tonen. Voor PCA scores zou een verschil rond de 1.0 aantoonbaar moeten zijn. Dit impliceert dat aantallen in de range van 50-75 dieren per groep nodig zijn voor voldoende power en dergelijk aantallen zijn eerder gebruikt in vergelijkbare, wetenschappelijk gepubliceerde studies (DeNapoli et al., 2000; Heath et al., 2007). Voor dit onderzoek worden 100 honden per voergroep ingedeeld. Dit om eventuele uitval op te kunnen vangen en het onderscheidend vermogen te kunnen vergroten. Deze honden zullen alleen 8 weken worden gevoerd met een van de proefvoeders.

Tabel 1. Minimal differences of means

	alpha = 0.05 (two-sided), beta=0.1	PCAScore (<-4,4>, sigma=1)	PCAScore (<-4,4>, sigma=2)
	Survey score ([1,...,5], sigma=1.1)		
n = 10 / group	1.56	3.07	1.69
n = 20 / group	1.05	2.10	1.16
n = 30 / group	0.85	1.70	0.94
n = 40 / group	0.73	1.47	0.81
n = 50 / group	0.65	1.31	0.72
n = 75 / group	0.53	1.07	0.59

Referentie

DeNapoli JS, Dodman NH, Shuster L, Rand WM & Gross KL (2000) Effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217, 504-508. [Noot: originele 4 proefgroepen bestonden uit 11 honden die uiteindelijk gepoold zijn resulterende in 44 honden]

Heath SE, Barabas S & Craze PA (2007) Nutritional supplementation in cases of canine cognitive dysfunction - A clinical trial. *Applied Animal Behaviour Science* 105, 284-296. [Noot: in de studie zijn alleen honden met probleemgedrag gebruikt (geen 'normale' controle-honden); aantal honden voor placebo 24 en voor experimenteel voer 20 honden]

4.d. Herkomst:

Groep 1 E. andere herkomst
Groep 2 E. andere herkomst

Toelichting:

Prive honden

5.a. Accommodatie: Geen van deze (toelichten)

Honden worden niet gehuisvest. Eigenaren worden verzocht om in de thuissituatie te voeren. De eigenaren van honden die het controlevoer (voer A) en het voer met extra tryptofaan (voer B) worden uitgenodigd om met hun hond naar [REDACTED] te komen en deze deel te laten nemen aan de

gedragstest. De gedragstest vindt plaats in het oude isotopenlaboratorium achter het gebouw van [REDACTED]

5.b. Huisvesting & Verzorging:

NVT

5.c. Voeding:

Er worden 3 droge geextrudeerde voeders samengesteld: A, controle voer (commercieel beschikbaar voer); B, controle voer + max 4 g/kg tryptofaan; C, controle voer + supplement (tryptofaan, vitaminen E, fosfatidylserine (een natuurlijke fosfolipide) en omega-3 vetzuren). De nutriëntensamenstelling van elk voer voldoet aan eisen zoals deze voor de Nederlandse commerciële hondenvoeders gelden en zijn samengesteld door [REDACTED], erkent wetenschapper in de voeding van gezelschapsdieren. Voer A betreft een standaard voer zonder deficienties in nutriënten waardoor voer B en C kunnen worden gezien als verrijkte voeders.

De hoeveelheid tryptofaan in het controlevoer is 2.1 g/kg wat voldoet aan richtlijnen opgesteld door NRC (2006) en FEDIAF (2008). Het voer B bevat maximaal 6 g/kg (de exacte hoeveelheid wordt nader bepaald). De hoeveelheid tryptofaan is lager dan in een voorgaande varkensstudie waarin de hoeveelheid tryptofaan in de voeders was verhoogd van 2 g/kg naar 7 g/kg (Koopmans et al., 2005; 2006). De exacte samenstelling van het supplement van voer C wordt nader bepaald door [REDACTED]

NRC (2006) Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, D.C., USA: National Academy Press.

FEDIAF (2008) Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.

www.fediaf.org (12 februari 2008).

Koopmans SJ, Guzik AC, van der Meulen J, Dekker R, Kogut J, Kerr BJ & Southern LL (2006) Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. *Journal of Animal Science* 84, 963-971.

Koopmans SJ, Ruis M, Dekker R, van Diepen H, Korte M & Mroz Z (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiology & Behavior* 85, 469-478.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

1. Proefvoer

Er worden 3 droge geextrudeerde voeders samengesteld: A, controle voer; B, controle voer + tryptofaan; C, controle voer + supplement (voor details zie tabblad Voeding onder tabblad Behuizing).

2. Proefgroepen

Eigenaren van honden bij voorkeur van het type Retriever zullen worden gevraagd een internetvragenlijst in te vullen gericht op oa. problemen bij het alleen thuis zijn, nervositeit en angstigheid van hun hond (deels gebaseerd op de Canine Behavioural Assessment and Research Questionnaire, CBARQ, Hsu & Serpell, 2003). Op basis van de vragenlijst zal er een selectie worden gemaakt van honden die betrokken worden bij het onderzoek. Scores van de vragenlijsten worden gebruikt om honden toe te wijzen naar één van de drie voeders. Totaal zullen er aan elk voeder 100 honden worden toegewezen resulterende in totaal 300 honden voor het onderzoek. Een beperkt aantal van de honden die voer A en voer B krijgen zal betrokken tevens worden bij het afnemen van de gedragstest en bloed- en urineverzamelen (maximaal 50 honden voor voergroep A en maximaal 50 honden voor voergroep B). De behandeling voor de overige honden zal dus alleen bestaan uit het voeren van de proefvoerders in de thuissituatie en worden niet aangemerkt als proefdieren.

3. Proefopzet

De proef wordt dubbelblind uitgevoerd (deelnemers en onderzoekers weten in eerste instantie niet aan wie een controle of proefvoer is toegewezen). Elke hond zal gedurende 8 weken het bepaalde proefvoer door de hondeneigenaar gevoerd krijgen. In de week 4 wordt door de eigenaar een verkorte vragenlijst gericht op het gedrag van de hond ingevuld. Na 8 weken wordt de uitgebreidere vragenlijst die bij de selectie van honden is gebruikt door de eigenaren wederom ingevuld. Op basis van de uitkomsten van de uitgebreide vragenlijsten vooraf aan de proef en na 8 weken voeren wordt bepaald of het voer invloed

heeft gehad op het probleemgedrag. De verkorte vragenlijsten uit week 4 wordt gebruikt om inzicht te krijgen in de effecten van het voer op het gedrag van de hond gedurende voerperiode. Daarnaast wordt een aantal deelnemers gevraagd om met de hond deel te nemen aan een kortdurende en weinig belastende gedragstest vóór de voerperiode en na 8 weken voeren. Vóór en na de gedragstest zal er speeksel worden verzameld voor de bepaling van cortisolconcentraties (gerelateerd aan het stressniveau). Speekselafname zal zoals in voorgaande studies worden uitgevoerd (2 wattenstaafjes in de wangzakken van de hond voor maximaal minuit, zie DEC-protocol 2007002.c). Wij verwachten dat de cortisolconcentraties van de honden die controlevoer+tryptofaan hebben gekregen lager zullen zijn na de gedragstest dan de honden die het controlevoer hebben gekregen. De gedragstest bestaat uit vier onderdelen. De gedragstest bestaat uit de volgende onderdelen:

3.1 Open-field test

De hond wordt in de testruimte gelaten en het gedrag wordt voor 1 min geobserveerd. De testruimte is een lege ruimte zoals eerder gebruikt voor proeven (). De test heeft een duur van 1 minuut, waarin wordt gekeken hoe de hond reageert op de voor hem vreemde ruimte. De open-field test is een gestandaardiseerde methode om gespannenheid en angstigheid bij ratten en muizen te kwantificeren. Gedragingen die worden gescoord zijn o.a. locomotie en stress gerelateerde gedragingen (bijv. tong uit de bek, lichaam schudden, snuit likken). Tijdens de open-field test is een achtergrondruis aanwezig met lage intensiteit.

3.2 Sudden-silence test

De achtergrondruis valt na 1 min open-field test weg. Dit zal mogelijk het stoppen van gedrag veroorzaken (bijv. het stoppen van locomotie/exploratie) in combinatie met een oriëntatie-reactie.

3.3 Startle response

Na de sudden-silence test zal er een kortdurende geluidspuls (duur 1 seconde, maximaal 90 dB) worden gegeven waarna het gedrag van de hond voor 1 minuut wordt geobserveerd. De geluidspuls is van een lage intensiteit en beoogt een oriëntatie / schrik reactie te induceren, niet een stress response. De procedure sluit aan bij gevalideerde gedragstesten om bij knaagdieren anxiety te meten.

3.4 Novel-object

Na de startle response test wordt er een novel-object hangend aan een touw in de ruimte neergelaten. De response van de hond op het object wordt voor 1 min geobserveerd. De procedure sluit aan bij gevalideerde gedragstesten om bij knaagdieren anxiety te meten.

3.5 Verlatingsangst

Deze test, de testruimte en de procedure zijn vrijwel identiek aan eerder onderzoek van en beschreven in het DEC protocol. Na een korte uitleg over de procedure aan de hondeneigenaar zullen de hond en eigenaar de testruimte betreden. Hond en eigenaar zijn gezamenlijk voor 3 minuten in de testruimte. Hierna zal de eigenaar de testruimte verlaten en wordt de hond voor 5 min alleen gelaten in de testruimte. Na 5 min betreedt de eigenaar weer de testruimte en worden hond en eigenaar weer herenigd wat tevens voor 3 min zal duren.

Het gedrag van de hond wordt gedurende deze gedragstest direct gescoord met behulp van

In de laatste week van de voerperiode zal er een bloedmonster worden afgenomen bij de hond en vragen wij de eigenaren een urinemonster te verzamelen tijdens het uitlaten in de middag.

3.6 Bloedmonster

De bloedafname zal door , hoofd , bij het Departement), bij de eigenaar thuis worden gedaan. Het verzamelde bloed (ongeveer 10 ml, venipuncture in de hals en opgevangen in EDTA bloedbuizen) zal worden geanalyseerd op concentraties vrije aminozuren (o.a. tryptofaan) in het plasma. De bepaling kan gebruikt worden om mogelijke veranderingen in het serotonerge systeem te evalueren en gedragseffecten te verklaren. Verwacht wordt dat de honden uit

voergroep B een hogere concentratie aan tryptofaan zal hebben dan honden uit voergroep A.

3.7 Urinemonster

Enkele milliliters urine zijn betrekkelijk eenvoudig en met weinig tot geen stress op te vangen met een soepbord (onder het teefje schuiven) of soepopscheplepel. De urine zal in de vriezer worden opgeslagen en door ons worden opgehaald wat tevens gecombineerd kan worden met de bloedafname. In de urine verwachten we verschil in concentraties tryptofaanmetabolieten tussen voergroep A en B wat aan zal geven of het metabolisme van tryptofaan via het serotonine en/of kynurenine metabolisme is verhoogd en of er malabsorptie is van tryptofaan (verhoging van indolen in de urine). De bepaling kan gebruikt worden om mogelijke veranderingen in het serotonerge systeem te evalueren en gedragseffecten te verklaren.

4. Literatuur

Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 1293-1300.

De testen zijn samengesteld uit componenten welke zijn gevalideerd bij proefdieren (lees ratten en muizen).

Buwalda B, Koolhaas JM, Bohus B. 1992. Behavioral and cardiac responses to mild stress in young and aged rats: effects of amphetamine and vasopressin. *Physiol Behav.* 51(2):211-6.

Davis M., 1986. Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.* 100:814-824

Davis M., Falls W. A., Campeau S. and Kim M., 1993. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav. Brain Res.* 58: 175-198

Green S. and Hodges H., 1991. Animal models of anxiety. In: Willner P (Ed.) *Behavioral models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge, Cambridge University Press pp 21-49.

Grillon C., Ameli R., Merikangas K., Woods S. W. and Davis M., 1993. Measuring the time course of anticipatory anxiety using the fear-potentiated startle reflex. *Psychophysiology* 30: 340-346

Lee Y., Lopez D. E., Meloni E. G. and Davis M. A., 1996. A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J. Neurosci.* 16: 3775-3789

Daarnaast is gebruikt van bevindingen bij honden (stress onderzoek en praktijk gedragstesten, personal communication Joanne van der Borg).

Beerda B, Schilder MBH, Hooft van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58, 365-381

Voor de gedragsobservaties wordt gebruik gemaakt van wetenschappelijk gepubliceerde protocollen voor het observeren van stress gedragingen bij honden.

Beerda B, Schilder MBH, Hooft van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58, 365-381.

Beerda B, Schilder MBH, Hooft van JARAM, Vries de HW, Mol JA, 1999. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Physiology & Behavior*, 66(2), 233-242.

6.b. Mate van ongerief:

Groep 1	A. Gering
Groep 2	A. Gering

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Bij de afname van het bloedmonster moet de hond gefixeerd worden. Het nemen van het monster alsmede het fixeren kan als gering ongerief door de hond worden ervaren. Tijdens de gedragstesten worden de honden alleen gelaten in een voor de hond onbekende ruimte. Hiernaast wordt de hond geconfronteerd met onverwachte geluidspuls (Startle response) en 'novel object'. Mogelijk dat enkele

honden hier angstig/agressief op zullen reageren. De testen zijn echter kortdurend en wijken nauwelijks af van wat de honden in hun dagelijks leven tegenkomen.

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- Groep 1 A. Niet toegepast (geen aanleiding).
Groep 2 A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

- Groep 1 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Groep 2 A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

De duur van gedragstesten is tot een minimum beperkt.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- Groep 1 Het dier is na de proef in leven gelaten.
Groep 2 Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

NVT

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Voor deze studie zal een grote populatie honden (300 honden) variërend in angstigheid en nervositeit worden gevolgd. De voeders die gebruikt worden zijn complete voeders en de onderzoekers verwachten daardoor geen nadelige gevolgen voor de honden. Het belastende gedeelte van het experiment zijn de gedragstesten en bloedafname. Dit gedeelte van het experiment wordt echter door een beperkt aantal honden doorlopen (maximaal 100 honden). Omdat er wordt verwacht dat honden met hoge scores voor nervositeit en angstigheid het meest gevoelig zijn voor het voer met extra tryptofaan (voer B) nemen alleen honden deel aan dit gedeelte van het experiment die hoge scores voor nervositeit en angstigheid hebben en zijn gevoerd zijn met voer het controle voer (voer A) of het met tryptofaan verrijkte voer (voer B). De werking van voer C wordt hierdoor alleen getest via vragenlijsten. Het aantal honden dat wordt uitgenodigd voor de gedragstest en bloedafname zal hierdoor lager zijn dan 2x50. Het exacte aantal honden zal afhankelijk zijn van het aantal aanmeldingen van hondeneigenaren met relatief nerveuse en angstige honden. Het exacte aantal honden, dat aan de gedragstest wordt onderworpen zal t.z.t. bij de proefdierdeskundige worden gemeld.

De samenstelling van de gedragstesten zijn specifiek gericht om gespannenheid, stress en angstigheid te meten. Door gebruik te maken van literatuurgegevens en resultaten uit voorgaande gedragsstudies kan worden gefocust op slechts een beperkt aantal testcomponenten. De te verwachten belasting voor de dieren is hierdoor minimaal.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2008017.e (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					35	1	1	01					
Groep 1	1	21	5	50					01	1	1	1	3
Groep 2	1	21	5	50					01	1	1	1	3

Uw aanvraag 2008017.b, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten ongerief dat de dieren ondergaan en dat de vraag m.b.t. alternatieven voldoende is beantwoord.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2008017.b, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC verzoekt u extra aandacht te besteden aan de stress bij bloedafname thuis, aangezien niet zeker is, dat deze minder is dan in een vreemde omgeving.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2008017.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten geringe ongerief dat de dieren ondergaan en dat de vraag m.b.t. alternatieven voldoende is beantwoord.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2008017.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2008017.d, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Kan je nog even de bevoegdheden wijzigen? [REDACTED] is niet art 9 bevoegd. [REDACTED] is art 12 bevoegd. De betrokken studenten zijn niet art 9 bevoegd, maar een vermelding dat ze de art 9 cursus gedaan hebben verdient wel de voorkeur.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Proefdierdeskundige

Uw aanvraag 2008017.e, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Proefdierdeskundige