

## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50100				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>3.4.4.3</td><td>Uittesten van inzetbaarheid van nieuwe technieken</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	3.4.4.3	Uittesten van inzetbaarheid van nieuwe technieken
Volgnummer	Type dierproef				
3.4.4.3	Uittesten van inzetbaarheid van nieuwe technieken				

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

TNO wil vanuit 3V gedachte/dierproevenbeleid en klantgerichtheid optimale kwaliteit bieden in onze dierexperimenten en state of the art technieken kunnen leveren. Het is vrijwel onmogelijk om te voorspellen welke nieuwe innovatieve technieken in de toekomst beschikbaar zullen worden. Met deze appendix willen wij mogelijk nieuwe apparatuur en nieuwe biotechnieken kunnen uittesten. Dit om zo te bekijken of deze techniek gebruikt kan worden de kwaliteit van onze dierproeven te verbeteren, het ongerief voor de proefdieren te verminderen of een verfijning kan zijn voor bestaande dierproeven (extra read out).

Het zal gaan om technieken die passen in de bestaande portfolio. Deze technieken moeten een inhoudelijk/wetenschappelijke meerwaarde hebben, en mogelijk ook bijdragen aan de vermindering van het ongerief of verfijning van reeds bestaande technieken. In het verleden zijn er al meerdere van deze nieuwe technieken uitgetest en aangeschaft, zoals een bloeddrukmeter waarvoor de dieren niet vooraf opgewarmd hoeven te worden. Op basis van eerdere ervaringen verwachten we dat hier kleine aantallen (tm 10) dieren voor worden ingezet. In uitzonderlijke gevallen kan om meer dieren gaan, bijvoorbeeld als het belangrijk is de natuurlijke spreiding in kaart te brengen of de biologische variatie te weten te komen (bijv. voor het opzetten van niet-invasieve technologieën of bij opzetten van eiwit-metingen/assays of immunokleuringen als er hoge variabiliteit te verwachten is. Voorbeelden van mogelijk nieuwe technieken zou kunnen zijn, een retinal imager.

Voordat een nieuwe techniek in huis gehaald wordt zal met de IvD bekeken worden wat de haalbaarheid en meerwaarde van de nieuwe techniek is. In geval van een positief advies zal er in overleg met de IvD een plan van aanpak gemaakt worden, hoe deze nieuwe techniek uitgetest zal worden. De nieuwe techniek wordt uitgevoerd met gezonde surplus dieren. Dit om te bepalen of de techniek de gewenste kwaliteit heeft

en om medewerkers te trainen om deze nieuwe techniek uit te voeren. Als de resultaten hierin veel belovend zijn zal er in een aparte aanvraag (onder de CCD aanvraag van het betreffende onderzoek) een pilot experiment uitgevoerd worden in een ziektemodel.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Het soort technieken dat onder deze bijlage getest wordt, betreft nieuwe apparatuur of biotechnieken voor *in vivo* metingen aan dieren. Voordat er een test met een nieuwe techniek uitgevoerd wordt, zal er uitvoerig met de IvD overlegd worden. In dit overleg worden de volgende punten stapsgewijs doorlopen:

Wat is de meerwaarde (zowel mbt de 3V's als wetenschappelijk) van de gewenste nieuwe apparatuur/techniek?

Wat is er in de literatuur al bekend?

Wat is de haalbaarheid van de nieuwe techniek?

Past de nieuwe techniek in de huidige portfolio?

Omdat wij ons realiseren dat de omschrijving 'nieuwe techniek' erg vaag is, geven we hieronder enkele voorbeelden van de wijze waarop nieuwe technieken in de afgelopen jaren in gebruik zijn genomen dan wel in ontwikkeling zijn:

1. Echo MRI meting (geïntegreerd):

De ECHO MRI meting bestaat uit een handzaam MRI apparaat waarin de spier/vet index van muizen op niet-invasieve wijze en zonder narcose kan worden bepaald. De muis wordt hiertoe in een buisje enkele seconden in het apparaat geplaatst.

Wij hebben het apparaat van een collega instituut enkele weken in bruikleen gehad en hebben in deze periode meerdere muizen uit onze fokvoorraad, variërend in geslacht en leeftijd meerdere malen gemeten met het apparaat.

Op basis van de resultaten van deze pilot studie hebben wij de betrouwbaarheid en bruikbaarheid van de metingen kunnen vaststellen en zijn wij overgegaan tot de aankoop van een eigen ECHO MRI apparaat. De Echo MRI metingen worden nu als mogelijk in onze studies naar metabool syndroom aangeboden aan externe partijen (o.a. geneesmiddelontwikkelaars) en hebben ertoe geleid dat metingen waarvoor voorheen interim secties op dieren moesten worden gedaan, nu longitudinaal in hetzelfde dier gemeten kunnen worden.

2. Retinal Imaging (voorlopig niet succesvol gebleken)

Op de afdeling MHR wordt veel onderzoek gedaan naar metabool syndroom. Een van de complicaties die daarbij kan ontstaan is retinopathie. Er is een camera op de markt die door het inspuiten van fluorescente stoffen de lekkage van bloedvaatjes in het oog zou kunnen weergeven. Dit apparaat hebben we te leen gekregen van de fabrikant om uit te testen met gezonde surplus dieren. Om een goed beeld te krijgen moeten de dieren onder anesthesie, krijgen vervolgens oogdruppels (voor pupil verwijding), waarna er een fluorescerende stof wordt ingespoten. We hebben hiervoor gezonde surplus dieren gebruikt die op hoog vet dieet stonden. Een camera legt dit vast in video en in foto. Na een pilot experiment is gebleken dat de kwaliteit van de verkregen resultaten momenteel onvoldoende is om het gebruik van dieren te verantwoorden. De foto geeft onvoldoende resolutie om een goede weergave van de lekkage te zien. Tevens is de laser die in de camera zit dermate sterk dat de dieren niet longitudinaal in de tijd gevolgd kunnen worden en slechts 1 tot 2 keer deze meting kunnen ondergaan. In overleg is daarom besloten niet verder te gaan met deze metingen en het apparaat in deze hoedanigheid niet aan te schaffen. De fabrikant, maar ook TNO zelf, is bezig met de verbetering van de camera. Als de verbeteringen goed doorgevoerd zijn, zal na overleg met de IvD, een nieuw pilot experiment in gezonde dieren worden uitgevoerd.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Er zal in samenspraak met de IvD bepaald worden hoeveel dieren er nodig zijn om de nieuwe techniek te kunnen uittesten. Wij verwachten dat dit zal gaan om 10 dieren per techniek, met een maximum van 20 dieren.

In bepaalde gevallen, bijv. bij een hoge spreiding in de resultaten, is het mogelijk dat er meer dan 20 dieren nodig zijn. In dit geval zal er weer overleg plaats vinden met de IvD om te bepalen of er nog steeds een meerwaarde van de nieuwe techniek is.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Muis (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus*) en cavia (*Cavia aperea porcellus*), Ratten en cavia's komen van een geregistreerde leverancier uit EU of USA. Muizen, zowel wildtype als genetische gemodificeerde dieren meestal uit eigen fok. In het merendeel van de situaties zal gebruik gemaakt worden van surplus dieren uit eigen fok of reservedieren. In principe is er geen voorkeur voor mannen of vrouwen tenzij de handelingen gekoppeld is aan het geslacht.

Het aantal nieuw te implementeren technieken wordt geschat op 1-2 per jaar voor studies met muizen, voor ratten en cavia's ca. 1 per 2-3 jaar. uitgaande van een benodigd aantal dieren van 10-20 per nieuwe techniek schatten we het aantal dieren over een periode van 5 jaar derhalve als volgt in:

Muizen: 150

Ratten: 30

Cavia's: 30

De hier berekende en aangevraagde aantallen dieren betreffen een maximaal aantal dieren, het is zeer goed mogelijk dat het werkelijke aantal dieren dat per jaar gebruikt gaat worden lager zal uitvallen.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Waar mogelijk worden de dieren hergebruikt om weefsels (zoals in bijlage 2) uit te verzamelen.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vermindering

Door nieuwe technieken, zoals de  $\mu$ CT scanner te gebruiken kan leverfibrose in life gemeten worden en hoeven er niet tussentijds dieren geofferd te worden om de aanwezige fibrose te bepalen. Hierdoor zijn er minder dieren nodig om een studie uit te voeren.

Verfijning

Mogelijk komt er een techniek beschikbaar die een verfijning biedt op reeds bestaande technieken. Een voorbeeld hiervan is onze nieuwe bloeddrukmeter. De dieren hoeven voor de metingen niet opgewarmd te worden (voor het oude apparaat was dit wel nodig), hierdoor is vooral bij obese muizen, die door hun onderhuidse vetlaag gevoelig zijn voor oververhitting, de uitval een stuk minder.

**Vervanging**

De nieuwe uit te testen technieken zullen met zo min mogelijk aantallen dieren uitgetest worden. Mocht een nieuwe techniek interessant genoeg zijn om verder mee te gaan zullen verdere pilot experimenten onder afgegeven vergunningen worden gebracht als wijziging of melding.

Tevens zullen wij voordat we een nieuwe techniek gaat uittesten uitvoerig overleggen met de IvD en zoveel mogelijk literatuuronderzoek doen. Hierdoor zullen de nieuwe technieken zo optimaal mogelijk uitgevoerd worden met zo min mogelijk ongerief. Per uit te testen techniek zal gekeken worden wat een adequate manier is om het ongerief voor de dieren zo laag mogelijk te houden.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Om het ongerief zoveel mogelijk te vermijden wordt er indien nodig gebruik gemaakt van adequate anesthesie, pijnbestrijding en euthanasie.  
De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

NVT

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er zijn geen andere vormen van welzijnsaantasting te voorzien. Mochten er eventueel wel andere vormen van welzijnsaantasting voorzien worden zal er met de IvD overlegd worden of er nog steeds een meerwaarde van de nieuwe techniek is.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De mogelijke oorzaken zijn niet te voorspellen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Waar nodig zullen de dieren adequate anesthetica en pijnbestrijding krijgen.

### J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

X Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Om de mate van ongerief van een nieuwe handeling te bepalen wordt als leidraad de handelingentabel uit bijlage 1 gebruikt. De nieuwe technieken die vallen onder niet-invasieve handelingen zullen geclassificeerd worden als licht ongerief (bijvoorbeeld gedragstesten). Nieuwe technieken die onder narcose uitgevoerd worden zullen in de eerste instantie vallen in de categorie terminaal. Pas als de nieuwe techniek goed bevonden wordt zullen de dieren eventueel eenmalig bijkomen uit de narcose en zullen deze dieren een matig ongerief ondergaan. Als een nieuwe techniek goed wordt bevonden zal deze in een aparte aanvraag ingediend worden om verder gevalideerd te worden.

Geschatte percentages ongerief

Licht ongerief: Muizen 80% (n=120), Ratten 50% (n=15), Cavia's 50% (n=15)

Matig ongerief: Muizen 5% (n=7), Ratten 25% (n=7), Cavia's 25% (n=7)

Terminaal: Muizen 15% (n=23), Ratten 25% (n=8), Cavia's 25% (n=8)

De hierboven genoemde percentages zijn schattingen gebaseerd op historische gegevens. Afhankelijk van de techniek kunnen deze percentages anders uitvallen.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

√ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De dieren die gebruikt worden voor het uittesten van nieuwe technieken/apparatuur zijn surplus dieren uit onze eigen fok of reservedieren uit studies. De surplus dieren uit eigen fok dieren zijn niet bruikbaar in experimenten vanwege leeftijd, geslacht of onjuist fenotype en zouden anders ongebruikt geëuthanaseerd worden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

√ Ja