

Toepassingsregeling 'Fok van proefdieren'

Inhoud

1	Achtergrond	2
2	Inleiding.....	2
3	Uitgangspunten bij opzetten van onderhouds- en experimentele fok.....	2
3.1	Muis en rat.....	3
3.2	Zebravissen	4
4	Vastlegging fokinformatie	4
4.1	Officiële naamgeving (nomenclatuur)	5
4.2	Generaties.....	5
5	Voorkomen genetische drift	5
5.1	Terugkruisen van de lijn.....	6
6	Standaardcriteria Humane Eindpunten (HEP)/ ongeschiktheid voor fok	7
6.1	Muis en rat.....	7
6.2	Zebravissen	8
7	Richtlijn doden van dieren	8
7.1	Muis en rat ^{12, 13}	8
7.1.1	Neonate ratten of muizen (< 10 dgn.).....	8
7.1.2	Ratten en muizen (>10dgn.).....	8
7.1.3	Embryo's	8
7.1.4	Drachtige dieren	9
7.2	Zebravissen ¹⁴	9
7.2.1	Zebravis embryo's 0-5dpf	9
7.2.2	Zebravis larve 5-15 dpf	9
7.2.3	Zebravis ≥16 dpf	9
8	Richtlijn pups weghalen of introduceren tijdens zoogtijd	9
9	Aanvullende eisen dierfaciliteit voor aanschaf van proefdieren	10
10	Monitoring dieren uit fok met onbekend fenotype.....	10
10.1	Scheppen van genetische gewijzigde lijnen of kruisen van twee bestaande lijnen	11
10.2	Registratie van dieren	12
10.3	Genotypering zonder identificatie	12
10.4	Richtlijnen voor invriezen en opschonen van lijnen	13
11	Literatuur	13
12	Begrippenlijst	14
13	Scholingsmogelijkheden.....	14

1 Achtergrond

Deze toepassingsregeling geeft meer informatie over de praktische invulling die door de IvD gegeven wordt aan het beleidsdocument [Aanschaf en fok van proefdieren](#), met als focus de fok van muizen, ratten en zebravissen. Het beleid en de toepassingsregeling gelden voor alle personen die betrokken zijn bij het fokken van proefdieren bij de Universiteit Utrecht (UU) en Universitair Medisch Centrum (UMC) Utrecht.

De Instantie voor Dierenwelzijn (IvD) stelt deze toepassingsregeling bij op basis van nieuwe inzichten, met inspraak van de aangestelde fokcoördinatoren. Deze toepassingsregeling wordt van kracht zodra de ingangsdatum hiervan is gepubliceerd op de IvD-website en in de IvD-nieuwsbrief.

2 Inleiding

In deze toepassingsregeling schetsen wij de praktische kaders. De toepassingsregeling is onder andere gebaseerd op het advies 'Genetisch gemodificeerde dieren in voorraad gedood' deel 1¹ en 2² van het Nationaal Comité advies dierproevenbeleid (NCad), de herziene handreiking 'Het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en houden van genetisch gewijzigde dieren'³, het 'Guidebook on Mouse and Rat Colony Management' van Charles River⁴, het 'Handbook on Genetically Standardized Mice' van Jackson Laboratory⁷ en het 'Colony Management at Zebrafish Facilities'⁹. De juiste kennis en training vormen de basis voor het goed uitvoeren van fokmanagement. In hoofdstuk 13 zijn scholingsmogelijkheden opgenomen.

3 Uitgangspunten bij opzetten van onderhouds- en experimentele fok

In [beleid aanschaf en fok van proefdieren](#) staat in H4.6 de afwegingen die gemaakt worden voor het in stand houden of cryo-preserveren van een lijn. Als er gekozen wordt voor in stand houden dan betekent dit dat de lijn genetisch zuiver moet worden gehouden, zodat deze toekomstbestendig is. Deze instandhoudingsfok is erop gericht om de stam in leven te houden binnen de faciliteit, met de kleinst mogelijke kans op genetische drift (zie 5) en dus het behouden van een gezonde foklijn. Instandhoudingsfok wordt over het algemeen opgezet in kleine kolonies, om het fokoverschot zo veel mogelijk te beperken. De fokcoördinator bepaalt samen met de onderzoeker voor welke methode gekozen wordt en in welke vorm de genetische modificatie(s) wordt aangehouden.

Er zijn verschillende methoden voor het beheer van de fok, zoals inteeltfok, backcross-fok, continue fok, tijdelijke fok, harem fok, 1:1 fok^{4,7,8,9,11}. Als er meerdere methoden geschikt blijken, met dezelfde mate van ongerief, moet er gekozen worden voor de route die leidt tot het minste aantal dieren 'dood of gedood vóór gebruik in fok of dierproef'². Het NC3Rs heeft een *best practice* handboek opgesteld voor de optimalisatie van het gebruik van fok- en kolonimanagement¹⁰.

Als er gebruik gemaakt wordt van getimede fok dan is het aan te raden om gebruik te maken van het Whitten effect, waarbij de cyclus van de vrouwen gesynchroniseerd wordt door 48 uur voor de start van de fok mannelijke muizen binnen geurafstand van de vrouwen te plaatsen. Bij IVC kooien kan dit

effect bereikt worden door zaagsel uit kooien met mannen in de vrouwenkooi te leggen. Hiermee wordt het aantal dieren dat nodig is gereduceerd.

Voor de fok van muizen zijn er rekentools beschikbaar:

[Fok-koloniecalculator van de Universiteit in Zurich](#)

[Fokplanning van The Jackson Laboratory](#)

3.1 Muis en rat

Een aantal aanbevelingen voor instandhoudingsfok voor kleine-knaagdierkolonies⁸:

- Een minimum van zes fokparen is aan te raden voor het beheer van kleine kolonies. Bij kleiner aantal neemt het risico op genetische drift (zie 5) toe.
- Houd twee generaties van de lijn aan. Vervang fokreserve als de nieuwe generatie geslachtsrijp is.
- Probeer de leeftijd van de fokdieren tussen de acht (muis)/ twaalf (rat) en vijfendertig weken te houden. Fokefficiëntie bij oudere dieren is minder voorspelbaar.
- De maximale leeftijd voor paring is voor fokvrouwen negen maanden, daarna is uitdragen en lactatie toegestaan. Voor embryonaal gebruik is het wel toegestaan om fokvrouwen van negen tot twaalf maanden in fok te zetten.
- De maximale leeftijd voor gebruik van fokmannen is elf maanden. Daarna mogen de dieren nog een maand aangehouden worden om dracht bij de fokvrouwen vast te stellen of het genotype van de nakomelingen te verifiëren.
- Tijdig terugkruisen van de lijn, ongeveer elke zeven tot tien generaties om ontstaan van genetische drift te voorkomen (zie 5).
- Houd de fokprestatie goed in de gaten. Neem onmiddellijk corrigerende maatregelen in overleg met de fokcoördinator, als deze afneemt.

In een aantal situaties kun je afwijken van de vooraf gemaakte afspraken met de fokcoördinator en de IvD. Afwijkingen worden vastgelegd in de bijlage van het fokprotocol.

Redenen voor verhogen van het aantal fokparen	Redenen voor verlagen van het aantal fokparen:
• Regelmatig dode nesten, • Minder pups per nest dan verwacht, • Fokdieren vaker niet vruchtbaar (fertiel), • Afwijkingen in de nakomelingen (ongeschikt voor fok), • Fok met ongerief.	• Grote nesten, • Stabiele foklijn.

Mannelijke muizen zijn na inzet in de fok moeilijker sociaal te huisvesten in verband met dominant gedrag richting elkaar. Er is een aantal manieren om individuele huisvesting bij mannelijke muizen te voorkomen. Een daarvan is het anders opzetten van de fokrondes. Er kan voor gekozen worden om twee fokrondes per fokpaar in te zetten, waarbij de vader met de mannelijke nakomelingen van het eerste nest gespeend worden. De verschillende vormen van het voorkomen van individuele huisvesting staan genoemd in het [beleid preventie individuele huisvesting](#).

Mannelijke ratten zijn over het algemeen minder dominant richting elkaar en kunnen vaak na de fok weer in hun oude groep gehuisvest worden. Als er bij de ratten agressief gedrag wordt waarge-

nomen is het aan te raden om de volledige huisvesting te vervangen en de kooigenoten tegelijk in de nieuwe leefomgeving te plaatsen. Behoud hierbij zo veel mogelijk de oude kooisamenstelling.

3.2 Zebravissen

Aantal aanbevelingen voor de instandhoudingsfok voor kleine zebraviskolonies⁹:

- Een minimum van zes fokparen is aan te raden.
- Voor een genetisch gezonde wildtypekolonie (outbred) is het aan te raden een grotere populatie aan te houden om de lijn robuust en genetisch divers te houden.
- Houdt twee generaties van de lijn aan tot de nakomelingen geslachtsrijp zijn.
- Probeer de leeftijd van de fokdieren tussen de vier en twaalf maanden te houden. Efficiëntie bij oudere fokdieren is minder voorspelbaar.
- Hou de fokprestatie goed in de gaten. Neem onmiddellijk corrigerende maatregelen in overleg met de fokcoördinator als deze afneemt.

In een aantal situaties kun je afwijken van de vooraf gemaakte afspraken met de fokcoördinator en de IvD. Afwijkingen worden vastgelegd in de bijlage van het fokprotocol

Redenen voor verhogen van het aantal fokparen	Redenen voor verlagen van het aantal fokparen:
• Regelmatig geen of slechte legsels • Minder embryo's per legsel dan verwacht • Te weinig founders voor het creëren van een transgene vislijn • Fokdieren vaker niet fertiel • Afwijkingen in de nakomelingen • Fok met ongerief	• Grote legsels • Stabiele foklijn

4 Vastlegging fokinformatie

Van elke **foklijn** moet een administratie bijgehouden worden waarbij ten minste de volgende gegevens worden vastgelegd: gemiddelde nestgrootte/legsel, overlevingspercentage van de pups (knaagdieren), overlevingspercentages larvale stadium na switch (zebravis) en gezondheidsproblemen binnen de fok (dood aangetroffen, humaan eindpunt vanwege klinische problemen). Als het een nieuwe lijn betreft zijn deze gegevens niet altijd bekend. In dat geval moet de lijn tijdens de eerste twee stabiele generaties gemonitord te worden, zie hoofdstuk 10.

Van elk in huis **gefokt dier** dient er een administratie bijgehouden te worden waarbij ten minste de volgende gegevens worden vastgelegd; uniek diernummer, geslacht, geboortedatum, genotype, stamboom (herleidbaarheid), generatie, juiste naamgeving (nomenclatuur), bestemming dieren (dierexperiment, fokdier, surplus-dier) en eigenaar.

4.1 Officiële naamgeving (nomenclatuur)

Voor elke gegenereerde genetisch gemodificeerde (GG)-lijn moet de correcte naam in overeenstemming met de internationale regels voor nomenclatuur worden vastgesteld. De fokcoördinator legt de volledige stamnaam samen met de overige stam-specifieke informatie vast in de database GG-lijnen Utrecht. Deze lijst is op te vragen bij de fokcoördinator.

Online hulpmiddelen om de juiste nomenclatuur vast te stellen:

- [Mouse nomenclature](#)
- [Rat nomenclature](#)
- [Zebrafish nomenclature](#)

4.2 Generaties

De generaties van inteeltstammen worden bijgehouden als 'F' (filial generation). Om te voorkomen dat er een sub-lijn (twintig generaties) ontstaat, moet er worden teruggekruist op de zuivere achtergrondstam (zie H5.1). Indien een lijn wordt teruggekruist op de achtergrondstam, dan wordt dat aangeduid met een 'N'. Echter, als er tijdens de terugkruising ook broer * zus fok plaatsvindt om bijvoorbeeld experimentele dieren te genereren, dan wordt dit aangeduid als $N_x;F1^{4,7}$. Bijvoorbeeld: Je hebt al 3 generaties teruggekruist op de achtergrondstam, maar je hebt experimentele dieren nodig en je doet een fok met broer*zus, dan duid je de generatie van die nakomelingen aan als $N3;F1$.

5 Voorkomen genetische drift

De definitie van genetische drift volgens het online boek '[Mouse Genetics](#)' van Lee Silver (1995):

"De constante neiging van genen om te evolueren, zelfs in afwezigheid van selectieve krachten. Genetische drift wordt gevoed door spontane neutrale mutaties die willekeurig in een populatie verdwijnen of gefixeerd raken."

Lee Silver zegt hier dat genen continue de neiging hebben om te veranderen, onafhankelijk van de selectie die binnen het onderzoek wordt toegepast. Kleine kolonies zijn gevoeliger voor genetische drift. Dit komt doordat in een kleine kolonie de kans dat een muis met een mutatie geselecteerd wordt voor fok, groter is. Het doorgeven van de mutatie gaat heel snel. Met vier generaties hebben alle muizen in de kolonie de mutatie. Genetische veranderingen zijn niet te stoppen, maar kunnen wel worden afgeremd.

De volgende stappen kunnen hierin genomen worden:

- Twee stambomen van dezelfde lijn aanhouden. Op die manier heb je altijd een back-up beschikbaar.
- Bijhouden van gedetailleerde informatie van de lijn (zie 4).
- Cryo-preserveren van de lijn (zie [H4.6 fok beleid](#) en 10.4).
- Voorkomen van (onbedoelde) selectieve druk (bijvoorbeeld door te kiezen voor de goede fokdieren binnen de lijn).

- De kolonie regelmatig verversen (~7-10 generaties; zie 5.1).
- Single Nucleotide Polymorfisme (SNP)-analyse. Hiervoor wordt het genoom van de muis van de F0/1 geanalyseerd en dit wordt elke zeven à acht generaties vergeleken. Dit is echter een vrij kostbare manier.

Genetische afwijkingen in een lijn vormen een risico voor de betrouwbaarheid van je onderzoeksresultaten, maar ook voor de reproduceerbaarheid van experimenten. Daarom is het van groot belang om te sturen op een zo klein mogelijk kans op genetische drift.

Fenotypische afwijkingen en verminderde fitheid binnen een zebravislijn kunnen worden veroorzaakt door verlies van genetische variatie (genetische drift) en kunnen zowel de betrouwbaarheid als de reproduceerbaarheid van experimenten in gevaar brengen. Daarom is het essentieel om het risico op genetische drift tot een minimum te beperken. In zebravisfaciliteiten wordt een specifieke fokstrategie toegepast om de genetische diversiteit te behouden. Idealiter zouden alle individuen in een populatie in gelijke mate moeten bijdragen aan de volgende generatie. In de praktijk worden embryo's van meerdere onafhankelijke paringen samengevoegd en samen gekweekt in petrischalen. Deze aanpak vergroot de effectieve populatiegrootte en vermindert de impact van genetische drift. Om een hoog niveau van genetische variatie te behouden, moeten embryo's van meer dan 40 afzonderlijke paringen worden samengevoegd. Als dit niet mogelijk is, moet je ten minste het hoogste aantal kruisingen opzetten, afhankelijk van het aantal vissen dat per stam beschikbaar is⁹.

5.1 Terugkruisen van de lijn

Een veelgebruikte methode om de lijn zuiver te houden is elke tien generaties preventief terugkruisen op de achtergrondlijn. Bij voorkeur start je hiermee vanaf F7, maar niet later dan F10. Bij volledige terugkruising van de lijn zijn tien generaties nodig (99,9% homogeniteit). Voor het verversen van de kolonie is het niet altijd nodig om terug te kruisen. De aanschaf van nieuwe fokdieren van de leverancier of rederivatie van aanwezige cryo-voorraad kan ook een mogelijk strategie zijn in het behouden van genetische stabiliteit.

Een betrouwbare manier om de lijn gezond te houden omvat de volgende stappen:

1. Muis uit GG-kolonie (vrouw) * zuivere achtergrondstam (man) → N1-mannen uit deze kruising hebben een 'vers' Y-chromosoom.
2. N1-man (van kruising 1) * zuivere achtergrondstam (vrouw) → N2-mannen uit deze kruising hebben 'vers' X-, Y-chromosoom en mitochondriaal genoom.
3. N2-man (van kruising 2) * zuivere achtergrondstam (vrouw) → N3 verse heterozygote lijn
4. Broer * Zus fok → In stand houden of expanderen van de ververste lijn/creëren van homozygote dieren.

In het fokprotocol is vooraf vastgelegd bij welke generatie er gestart wordt met het terugkruisen en besloten of dit de meest efficiënte methode is. Alternatief is dat de basislijnen opnieuw worden aangekocht.

Als ervoor gekozen wordt om een sublijn aan te houden, check dan de website van [National Academies of Science](#) voor het aanmaken van een unieke laboratoriumcode.

6 Standaardcriteria Humane Eindpunten (HEP)/ongeschiktheid voor fok

Wanneer dieren ingezet worden voor de fok gelden aanvullende criteria voor humane eindpunten en/of het niet langer kunnen inzetten binnen de fok. Afwijken van deze criteria is alleen mogelijk na goedkeuring van de IvD.

6.1 Muis en rat

Fokdieren:

- Fokdieren worden vervangen als er zes aaneengesloten weken na fokinzet geen dracht is geconstateerd.
- Fokdieren worden vervangen als de pups, of een substantieel deel van de worp, bij geboorte of kort erna dood en/of niet levensvatbaar blijkt te zijn, tenzij dit een eerste worp betreft.
- Fokvrouwtjes worden vervangen als zij ook bij het tweede nest niet in staat blijken adequaat voor hun pups te zorgen.
- Fokdieren worden geëuthanaseerd op een leeftijd van maximaal twaalf maanden.
- Fokdieren worden geëuthanaseerd bij zichtbaar gewichtsverlies (ingevallen flanken, zichtbare ruggengraad). Bij twijfel wordt het dier wekelijks gewogen (maximaal 10% gewichtsverlies).
- Fokdieren die meer dan licht ongerief* ervaren gedurende meer dan 24 uur (tenzij meer ongerief is toegestaan in een projectvergunning voor een fok met ongerief) worden geëuthanaseerd.

Pups:

Worden geëuthanaseerd als zij:

- Zichtbaar achterblijven ten opzichte van de normale ontwikkeling.
- Blijvend onvoldoende activiteit laten zien.
- Morfologische afwijkingen vertonen.
- Blijvend afwijkend gedrag en/of afwijkende houding vertonen.
- Meer dan licht ongerief* gedurende meer dan 24 uur ervaren (tenzij meer ongerief of lijn-specifieke klinische verschijnselen zijn toegestaan in een projectvergunning voor een fok met ongerief).

Dieren kunnen als het HEP bereikt is alleen worden aangehouden na toestemming van de aangewezen dierenarts of de IvD.

* Bij de volgende afwijkingen is er in elk geval sprake van meer dan licht ongerief:

1. Partusproblemen zijn altijd reden voor euthanasie en worden als ernstig ongerief geclassificeerd. Als deze problemen (hoekige uitstulpingen, valt buik in en/of wordt harder) op tijd worden herkend kan er een poging gedaan worden om de pups te redden met keizersnede en bij een fostermoeder onder te brengen. Bespreek met de fokcoördinator of het zinvol is om dit in deze situatie te doen (zie 8).
2. Klinische verschijnselen die duiden op matig tot ernstig ongerief, onder meer bol zitten, oren naar achteren, afwijkende stand neus- of snorharen, verminderde mobiliteit, sloom, waterhoofd en olifantstanden.
3. Belemmering in het functioneren van het dier (niet kunnen eten, lopen, etc. ...)
4. Ernstige verwondingen door vechten: afgebeten lichaamsdelen, open wonden aan de penis, dikke gewrichten of huidwonden > 1 cm doorsnee.
5. Pups: ontbreken van melkspot, afstoting door moeder (buiten het nest liggen) en klinische verschijnselen die duiden op matig tot ernstig ongerief, onder meer waterhoofd en olifantstanden.

6.2 Zebravissen

Fokdieren:

- Fokdieren worden vervangen als ze na drie keer geen legsel geven.
- Fokdieren worden vervangen als ze na drie keer geen legsel geven met voldoende overlevingspercentage of te veel achtergrondmutaties zichtbaar worden als fenotypische afwijking (bijvoorbeeld scoliose, kort lichaam, motorische afwijkingen, zijdelings zwemmen, etc.).
- Fokdieren worden geëuthanaseerd op een leeftijd van maximaal achttien maanden.

Embryo's/Larvale/Juvenile stadium:

Worden geëuthanaseerd als zij:

- Zichtbaar achterblijven ten opzichte van de normale ontwikkeling.
- Blijvend onvoldoende activiteit vertonen.
- Afwijkend zwemgedrag vertonen.
- Morfologische afwijkingen hebben
- Blijvend afwijkend gedrag en/of afwijkende houding vertonen.

Als het HEP bereikt is, kunnen dieren alleen worden aangehouden na toestemming van de aangewezen dierenarts en de IvD.

7 Richtlijn doden van dieren

7.1 Muis en rat ^{12, 13}

7.1.1 Neonate ratten of muizen (< 10 dgn.)

Deze kunnen gedood worden door een overdosis anesthesie, decapitatie, of cervicale dislocatie.

Deze methoden zijn toegestaan onder Richtlijn 2010/63/EU (bijlage IV).

- CO₂ is ongeschikt.

7.1.2 Ratten en muizen (>10dgn.)

Deze kunnen gedood worden door een overdosis anesthesie, CO₂-blootstelling, decapitatie onder (isofluraan)sedatie, of cervicale dislocatie (bij rat tot max. 150gr). Deze methoden zijn toegestaan onder Richtlijn 2010/63/EU (bijlage IV).

7.1.3 Embryo's

Als embryo's nodig zijn voor verdere studie en onder anesthesie uit een moederdier genomen moeten worden, dan moet een hogere dosis anestheticum gebruikt worden dan gebruikelijk en de anesthesie moet ook langer aangehouden worden. Vervolgens kunnen de embryo's via decapitatie gedood worden. Het moederdier kan door middel van verbloeding of cervicale dislocatie gedood worden.

Een andere methode is om het moederdier te doden middels cervicale dislocatie en de baarmoeder met embryo's in ijswater te plaatsen, om zo de embryo's te verdoven alvorens ze eruit te halen.

Vervolgens kunnen de embryo's via decapitatie gedood worden.

7.1.4 Drachtige dieren

- CO₂ mag niet worden gebruikt.
- Als embryo's niet nodig zijn voor verdere studie kunnen de drachtige dieren op elke andere wijze die geschikt is voor niet-drachtige dieren, gedood worden. Hierbij moet ervan worden uitgegaan dat het minimaal 30-45 minuten langer duurt (ten opzichte van de dood van het moederdier) voordat de embryo's dood zijn.

7.2 Zebravissen¹⁴

7.2.1 Zebravis embryo's 0-5dpf

1% Sodium Hypoclorite gedurende minimaal 5 minuten

7.2.2 Zebravis larve 5-15 dpf

Tweestapsmethode – stap 1. Verdooving met MS222. Stap 2. Minimaal twintig minuten op ijswater (zonder direct contact met ijs), gevolgd door invriezen of fixatie.

7.2.3 Zebravis ≥16 dpf

Minimaal vijf minuten op ijswater (zonder direct contact met ijs), gevolgd door invriezen of fixatie.

8 Richtlijn pups weghalen of introduceren tijdens zoogtijd

Het weghalen van het complete nest bij de moeder tijdens de zoogtijd geeft een risico op stuwing en mastitis (borstontsteking). Deze dieren moeten de eerste drie dagen na het weghalen van het nest extra in de gaten gehouden worden. Mastitis zal leiden tot een duidelijk klinisch ziektebeeld (roodheid en/of zwelling van het borstweefsel, sloomheid, gebogen houding, etc.). Wanneer dit wordt waargenomen dient het dier gedood te worden. Op basis van voortschrijdend inzicht kan de werkwijze aangepast worden.

Voor projecten waarbij, door de CCD, een voorwaarde is opgenomen over het achterlaten van één of twee pups bij moeder of het moederdier direct doden na het weghalen van de pups, is bovenstaande niet van toepassing.

Het introduceren van extra rat/muis pups bij een lacterende moeder, het fosteren van pups, kan voorkomen bij onverwachte uitval van de moeder of een moederdier dat slecht voor het nest zorgt. Bij het samenvoegen van twee of meer nesten mag de totale nestgrootte niet groter zijn dan twaalf pups. Bij grotere nestsamenstelling kan dit leiden tot onnodig uitval van dieren, omdat het moederdier niet in staat is voor alle pups te zorgen.

Fosteren van net geboren muizen dient zo jong mogelijk gedaan te worden en het verschil in leeftijd tussen de nesten mag niet groter zijn dan 24 tot 48 uur. De acceptatie van de pups door de fostermoeder kan vergroot worden door de pups in te wrijven met nestmateriaal van het nest van de fostermoeder of door de vrouw een paar seconden aan een tissue met parfum te laten ruiken⁸.

9 Aanvullende eisen dierfaciliteit voor aanschaf van proefdieren

De faciliteit waar de dieren worden gehuisvest kan nadere eisen stellen aan de aan te schaffen dieren, gerelateerd aan praktische, logistieke of zoötechnische randvoorwaarden, zoals microbiële status. Voor knaagdieren gelden verder de volgende eisen:

- Aanschaf is alleen mogelijk als een bepaalde diersoort, stam, ras, of specifiek genotype verkrijgbaar is bij een erkende commerciële proefdierleverancier die als *preferred supplier*[†] is aangemerkt.
- In uitzonderlijke gevallen, na overleg met de aangewezen dierenarts, kunnen knaagdieren van andere externe bronnen betrokken worden. In dat geval gelden strikte importeisen. Afhankelijk van de gezondheidsstatus kunnen deze soms onder strenge inperkingscondities aangeschaft worden voor een kortdurend, eenmalig experiment.
- Zebravissen van andere externe bronnen kunnen alleen worden toegelaten na overleg met de manager van de vissenfaciliteit.
- Bij de import vanuit een *non-preferred supplier* van een ratten- of muizenlijn voor het opzetten van een fok wordt de aanschaf van sperma of (bevruchte) eicellen verkozen boven de aanschaf van een fokpaar waaruit na sanering de lijn gefokt wordt. Hierbij wordt samengewerkt met commerciële gespecialiseerde partijen.

10 Monitoring dieren uit fok met onbekend fenotype

In dit hoofdstuk staat de praktische uitwerking beschreven zoals opgesteld in het Uitvoeringsbesluit (2020/569/EU)⁵ en de daarbij behorende Europese richtlijn 'Genetisch gewijzigde dieren'⁶.

Voor de volgende situaties geldt geén projectvergunningplicht met betrekking tot het aanhouden van de fok. Dit geldt alleen als er geen bovendrempelige handelingen worden uitgevoerd bij het in stand houden van:

- Bestaande genetisch gewijzigde lijnen met een fenotype zonder welzijnsaantasting;
- Lijnen waarbij uitsluitend reportergenen in het genoom zijn geïntroduceerd; Deze genen leiden niet per se tot een pathologisch fenotype. Ook bij inkruising zal dit niet leiden tot een pathologisch fenotype;
- Niet gekruiste Cre- of Lox-lijnen met een fenotype zonder welzijnsaantasting;
- Bestaande lijnen met een genetische modificatie waarbij het fenotype alleen actief is bij behandeling met een inductiemiddel (bijvoorbeeld tamoxifen). Vanaf het moment van inductie geldt wel een vergunningplicht.

[†] Lijst met commerciële leveranciers die voldoen aan de eisen van de faciliteit ten aanzien van onder andere microbiële status en die zijn opgenomen in het auditprogramma van kritische leveranciers van de faciliteit. Het management van de betreffende faciliteit houdt de lijst actueel en kan inzage geven in de lijst.

Voor de volgende situaties geldt wél projectvergunningplicht met betrekking tot het opzetten of aanhouden van de fok:

- Immuundeficiënte dieren
- Dieren uit een foklijn waarbij alleen ongerief optreedt bij homozygote dieren of lethale fenotype bij homozygote dieren. Ook wanneer gebruik gemaakt wordt van een fokstrategie waarbij er geen homozygote dieren ontstaan, door bijvoorbeeld heterozygote dieren met wildtype te kruisen.
- Stammen met een lichamelijke aantasting door genetische aanpassing. Voorbeelden hiervan zijn blinde muizen en dieren met overgewicht.
- Stammen waarbij een pathologisch fenotype leeftijdsafhankelijk is en is aangetoond vanaf een bepaalde leeftijd. Ook wanneer de nakomelingen van deze lijn nooit deze leeftijd zullen bereiken.
- Nieuwe stammen of inkruisingen waarbij nog niet bekend is of er een pathologisch fenotype aanwezig is (zie 10.1).

10.1 Scheppen van genetische gewijzigde lijnen of kruisen van twee bestaande lijnen

In de EU-richtlijn, '[Genetisch gewijzigde dieren](#)'⁶ staat de welzijnsbeoordeling voor het scheppen van genetisch gewijzigde lijnen beschreven. Het doel hiervan is om op een uniforme en kwantitatieve manier het welzijn van de dieren te beoordelen.

De beoordeling beslaat drie gebieden:

- A. Relevante informatie (naam lijn, genetische wijziging, beoordelingsgegevens, uiteindelijke ernstgraad). Dit wordt het dierpaspoort genoemd;
- B. Welzijnsbeoordeling aan de hand van specifieke parameters voor de beoordeelde soort;
- C. Informatie over welzijnskwesties (huisvestings- en verzorgingsbehoeften, en/of suggesties voor verfijningsstrategieën).

Wanneer moet er een welzijnsbeoordeling plaatsvinden?

- Als het een nieuw gegenereerde lijn betreft;
- Als het een kruising van twee bestaande lijnen betreft;
- Als niet redelijkerwijs kan worden aangetoond dat de lijn door de genetische wijziging geen pathologisch fenotype heeft.

De monitoring bestaat uit:

- Dieren uit de eerste twee stabiele generaties.
- Minimaal zeven mannen en zeven vrouwen uit meer dan één nest/legsel.
- Representatieve leeftijden. Kort na geboorte (bijvoorbeeld bij de eerste verschoonbeurt van de kooi), tijdens identificatie (verzamelen weefsel voor genotypering), tijdens het spenen en opnieuw na geslachtsrijpheid (tijdens regulier verzorgingsmoment). Als het experiment oudere dieren vereist, wordt deze oudere leeftijdscategorie ook meegenomen in de monitoring.
- Dieren met relevante genotypen (heterozygoot, hemizyoot en homozygoot).
- Dieren met een overeenkomstige genetische achtergrond (bijvoorbeeld wild-type) of van een gedefinieerde referentielijn moeten als controledieren dienen.

De monitoring wordt uitgevoerd volgens de DALAS (Dutch Association for Laboratory Animal Science)-monitoringsformulieren. Deze formulieren zijn op te vragen bij de fokcoördinatoren, IvD en MyDALAS.

De IvD, dierenarts en fokcoördinator stellen samen met de fokbeheerder en onderzoeker aan de hand van de welzijnsmonitoringslijsten vast of het al dan niet een fok met pathologisch fenotype betreft. De welzijnsbeoordeling wordt herzien en geactualiseerd naarmate er meer gegevens beschikbaar komen. Dit is onderdeel van de evaluatiegesprekken met de onderzoeker, fokcoördinator en de IvD.

10.2 Registratie van dieren

Tijdens de monitoringsfase:

In de jaarlijkse statistieken worden alle dieren (inclusief ouderdieren) die gebruikt worden voor het scheppen van de lijn vermeld onder het doel van het fundamenteel/toegepaste onderzoek waarvoor de lijn wordt gecreëerd. Enige uitzondering: wildtypenakomelingen worden niet meegenomen in de jaarlijkse statistieken (tenzij deze voor andere procedures zijn gebruikt, bijvoorbeeld invasieve genotypering zonder identificatie). Deze dieren worden wel tijdens de vijfjaarlijkse rapportage meegenomen.

Wanneer er tijdens de monitoring pups dood gevonden (of vermist) zijn dan moet dit in de eerste twee generaties als ernstig ongerief gerekend worden. Er bestaat dan wel een kans dat hiermee onjuiste getallen in de jaarregistratie worden vermeld. Dit komt omdat ook de wildtype controledieren een percentage uitval zullen hebben. Hierdoor is de vroegtijdige sterfte dus niet per se inherent is aan het ongerief binnen de lijn. Daarom moet de fok als geheel gemonitord worden. Pas wanneer het percentage dood gevonden of vermiste pups hoger is dan verwacht, wordt de fok op dat moment als lijn met ernstig ongerief erkend en passende maatregelen (stopzetten fok, aanvragen wijziging, etc.) genomen. Dit besluit wordt altijd in overleg met de IvD, de dierenarts, de fokcoördinator en de onderzoeker genomen.

Bij instandhouding van een lijn:

Alle dieren van een lijn zonder ongerief worden jaarlijks gerapporteerd voor het doel waarvoor ze zijn aangehouden. Dit betreft dieren gebruikt voor fok, dieren gebruikt in experiment (registratie op de experimentele vergunning), dieren gedood voor gebruik in experiment of fok, etc.

Dieren uit een lijn met ongerief, die niet onder een experimenteel protocol worden gebruikt, worden alleen onder de fokvergunning geregistreerd als zij welzijnsaantasting hebben ondervonden door de aangebrachte genetische wijziging. Gezonde dieren worden geregistreerd zoals beschreven bij een lijn zonder ongerief.

10.3 Genotypering zonder identificatie

Als er overtollig weefsel afkomstig van het identificeren van een dier verkregen wordt, door bijvoorbeeld oorknip, dan is er geén vergunningsplicht. Voor invasieve methoden waarbij weefsel wordt afgenomen, maar er geen identificatie plaatsvindt, geldt wel een vergunningplicht. Voorbeelden hiervan zijn genotypering op basis van bloed, het toppen van de staart bij knaagdieren, skinswab bij

vissen of het knippen van de vinnen bij vissen. Hiervoor dient een fokprotocol ingediend te worden bij de IvD.

Indien de eerste genotypering gefaald heeft en er opnieuw DNA verzameld moet worden

Voor het 'herknippen' van oortjes of teentjes ten behoeve van genotypering geldt ook een vergunningplicht, omdat dit niet meer dient om de dieren te identificeren⁶. In dat geval stuurt de onderzoeker een mail naar de IvD voor toestemming, waarbij de reden van hertypering en diergerelateerde informatie worden vermeld. Registratie van deze extra handeling moet worden bijgehouden en tijdens het jaarregistratiegesprek worden overlegd. Hierbij tellen de dieren waarbij de extra handeling is uitgevoerd ook als dierproef in de registratie, tenzij het dier gebruikt is binnen een dierexperiment. In dat geval wordt het dier alleen voor dat laatste gebruik geregistreerd.

10.4 Richtlijnen voor invriezen en opschonen van lijnen

Cryopreservatie (invriezen)

Dit is niet vergunningplichtig wanneer er gebruik wordt gemaakt van ingevroren sperma van gedode dieren. Dit geldt alleen als deze dieren niet voor dit doel gedood zijn, want onder de Nederlandse wetgeving geldt het doden van proefdieren voor het verkrijgen van weefsel ook als dierproef. Wanneer er gebruik gemaakt wordt van levende dieren is dit wel vergunningplichtig.³

Van unieke lijnen moet het voortbestaan gewaarborgd zijn (zie [beleid aanschaf en fok van proefdieren H4.7](#)). Back-up van een lijn kan door middel van cryopreservatie. Het is van belang dat als er voor deze strategie gekozen wordt, er voldoende materiaal wordt opgeslagen om de lijn weer op te starten. De algemene regel die hiervoor gehanteerd wordt voor ratten en muizen is 3 rietjes met sperma of 120 embryo's als minimum grens. Meer informatie hierover is op te vragen bij de fokcoördinator.

Rederivatie (opschonen) van genetisch gewijzigde lijnen

Dit is vergunningplichtig wanneer het plaatsvindt met een wetenschappelijk doel. Bijvoorbeeld wanneer de immuunreacties kunnen worden beïnvloed door de aanwezige ziekteverwekker(s), maar de gezondheid van de dieren niet in het gedrang komt³.

Rederivatie is niet vergunningplichtig wanneer dit wordt uitgevoerd met het oog op dierenwelzijn, bijvoorbeeld wanneer er sprake is van murine hepatitis virus (MHV), waar de dieren ziek van kunnen worden³.

11 Literatuur

- 1 Genetisch gemodificeerde dieren in voorraad gedood, NCad, 2016
- 2 [Genetisch gemodificeerde dieren, Dood of gedood voor gebruik in fok of dierproef, deel 2, kwaliteitscriteria, NCad, 2018](#)
- 3 [Herziene handreiking 'Het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en houden van genetisch gewijzigde dieren', 2023](#)
- 4 [Guidebook on Mouse and Rat Colony Management, Charles River Laboratories, 2015](#)
- 5 [Uitvoeringsbesluit \(2020/569/EU\)](#)

- 6 European Commission, Directorate-General for Environment, *Framework for the genetically altered animals under Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes*, Publications Office of the European Union, 2022
- 7 *The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice*, 2009
- 8 *Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice*, 2007
- 9 Colony Management at Zebrafish Facilities, Inês Goncalves and Joana Monteiro, Intech open, 2023, DOI: 10.5772/intechopen.1003707
- 10 <https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/breeding-and-colony-management>
- 11 *Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats: FELASA working group report*, 2020, Laboratory Animals
- 12 AVMA. (2020). AVMA guidelines for the euthanasia of animals. Retrieved 10 April 2020, from American Veterinary Medical Association website
- 13 National Institute of Health. [Internet]. 2016. NIH Guidelines for euthanasia of rodent fetuses and neonates https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b4_rodent_euthanasia_pup.pdf
- 14 SCHEER - Revision of Annexes III and IV of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes regarding accommodation parameters and methods of killing for zebrafish, and accommodation parameters for Passerine birds, October 2023

12 Begrippenlijst

Homozygoot	Mutatie op beide allelen
Heterozygoot	Mutatie op 1 van de 2 chromosomen
Hemizygote	Mutatie op het x of y allel

13 Scholingsmogelijkheden

- The Jackson Laboratory – Online micro- en minicourses: <https://education.learning.jax.org/>
- Optimizing Research Reproducibility by Minimizing Genetisch Drift: <https://www.criver.com/resources/webinar-pi-rm-charles-river-hosted-jax-webinar-optimizing-research-reproducibility-minimizing-genetic-drift>
- Designing en optimizing mouse breeding schemes: <https://resources.jax.org/jax-on-demand/designing-optimizing-mouse-breeding-schemes>

Documenttype:	Beleidsdocument
Auteur(s):	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Medebeoordelaars:	Fok coördinatoren
Eindverantwoordelijke:	Hoofd instantie voor Dierenwelzijn
Opdrachtgever:	
Datum akkoord	
portefeuillehouder Wod UMC Utrecht:	
portefeuillehouder Wod UU:	
Ingangsdatum:	
Documentversie:	1.0
Revisiedatum:	Nvt
Toelichting revisie:	Nvt