



# Genetisch gewijzigde dieren in vergunning en registratie

P.S. (Nelleke) Verhave  
IvD Leiden, LUMC en Universiteit Leiden. Contact: p.s.verhave@lumc.nl

Afbeelding Novo Nordisk

Twee vragen hielden ons het afgelopen jaar bezig.

1. **Wanneer hebben we een projectvergunning nodig bij het maken dan wel fokken, opschonen of invriezen van genetisch gewijzigde dieren?**
2. **Hoe moeten we deze dieren opnemen in de registratie?**

De Europese Commissie heeft in 2021 nogmaals uitgelegd hoe bovenstaande vragen beantwoord moeten worden (uitvoeringsbesluit 2020/569/EU) [1]. Vanaf 1 januari 2023 gaan we ook in Nederland de Europese richtlijn [2] volgen voor nieuwe projectaanvragen en vanaf 1 januari 2024 ook de registratie met betrekking tot genetisch gewijzigde dieren. Onder genetisch gewijzigde (GGW) dieren vallen transgene, knock-out en andere genetische aanpassingen in dieren en ook natuurlijk voorkomende of geïnduceerde mutanten. Er zullen in Nederland wijzigingen plaatsvinden in de projectvergunningen en in de registratie van proefdieren en dierproeven. Ongewijzigd blijft het feit, dat de instelling als geheel een instellingsvergunning nodig heeft. Een instelling kan een instellingsvergunning hebben voor het verrichten van dierproeven en/of een vergunning voor het fokken en leveren van proefdieren.

## Disclaimer

Dit artikel biedt een indruk van de EU-regelgeving om te duiden wat dit betekent voor de fok van proefdieren en specifiek met betrekking tot genetisch gewijzigde lijnen. De onderstaande tekst bevat twee keer dezelfde elementen gezien vanuit projectvergunning en vanuit registratieperspectief.

Op het moment van schrijven was een herziening van de handreiking met betrekking tot projectvergunningverlening voor het fokken van genetisch gewijzigde dieren nog niet gepubliceerd. Ook een richtlijn voor het registreren van fokdieren in lijn met de Europese regelgeving is momenteel nog niet in het Nederlands beschikbaar. Deze publicatie is verschenen om te voorzien in de behoefte in Nederland om in heldere taal en vorm inzicht te geven in de Europese regelgeving over genetisch gewijzigde dieren. Deze tekst heeft geen wettelijke status. De poster op pagina 24 en 25 is een schematische weergave van de tekst.

1. **Wanneer hebben we een projectvergunning nodig bij het fokken en maken van genetisch gewijzigde dieren?**

### **Invasieve handeling**

In een aantal situaties is er een projectvergunning nodig. In het algemeen geldt dat wanneer je invasieve handelingen aan dieren doet die nodig zijn voor het maken of in stand houden van een genetisch gewijzigde lijn, hiervoor altijd een projectvergunning noodzakelijk is. Dit geldt bijvoorbeeld voor een monstername, zoals de vinknip bij zebravissen, maar ook voor handelingen als een vasectomie, een superovulatie of een embryotransplantatie. Wanneer de monstername samengaat met identificatie (oorknip of teenknip bij jonge pups) dan is er geen projectvergunning nodig. Wanneer het dier al eerder een oorknip heeft gehad ter identificatie en er opnieuw een oorknip genomen moet worden voor het vaststellen van het genotype van het dier, dan is deze handeling wel onderdeel van een projectvergunning.

### **Intrinsiek ongerief**

Voor het fokken en houden van GGW-lijnen met intrinsiek ongerief is altijd een projectvergunning nodig. Er is sprake van intrinsiek ongerief bij een dier als het waarneembare afwijkende eigenschappen heeft als gevolg van een afwijking of ziekte veroorzaakt door een genetische wijziging. Dit wordt ook wel een aangetast fenotype genoemd.

Er zijn gevallen waarin, ten opzichte van de standaard huisvesting en verzorging van proefdieren, een aanpassing nodig is om te voorkomen dat dieren ongerief krijgen. Deze aangepaste huisvesting of speciale verzorging zal dan voorkomen dat het dier last heeft van de afwijking of ziekte. Dit is het geval bij bijvoorbeeld het huisvesten van immuun-gecompromiteerde dieren in een IVC-(individually ventilated cage) opstelling, naakte muizen voorzien van extra nestmateriaal of het doden van dieren voordat de afwijking tot uiting komt. Voor deze dieren is er binnen de Europese wetgeving een projectvergunning nodig. In de projectvergunning wordt de extra zorg of afwijkende huisvesting voor deze dieren geborgd. Dus ook als het fenotype pas op latere leeftijd tot uiting komt en de dieren voor die leeftijd gedood kunnen worden, is een projectvergunning nodig voor aanhouden van deze lijn. Voor de dieren die in een dierproef worden gebruikt is een vergunning voor het gebruik noodzakelijk waarbij het (risico op) fenotype is opgenomen.

### **Een nieuwe genetisch gewijzigde lijn**

Omdat bij een nieuwe lijn nog geen kennis is van het mogelijke ongerief dat bij de dieren optreedt, is het verplicht om het fenotype gestructureerd te monitoren. Dit gebeurt bij de generatie dieren die inmiddels een stabiel genotype hebben. Totdat de generatie met een stabiel genotype aanwezig is, is de verplichte monitoring van nieuwe lijnen nog niet gestart. Dan, wanneer het beoogde genotype bereikt is, worden minimaal de eerste twee generaties nakomelingen opgenomen in de projectvergunning om het fenotype gestructureerd in kaart te brengen (te monitoren). Dit geldt voor nieuwe lijnen die met een procedure gemaakt zijn maar ook voor nieuwe lijnen die doormiddel van het kruisen van twee bestaande lijnen tot stand is gekomen.

Voor het monitoren rekenen we voor muizen minimaal zeven mannen en zeven vrouwen met het beoogde genotype uit verschillende nestjes van minimaal twee generaties. De details van de monitoring worden bij elkaar gebundeld met de specificaties van de lijn, de statistieken van de lijn, de te verwachten aantallen dieren met de genetische aanpassing en informatie van verschillende leeftijden van de dieren [3]. Op basis hiervan besluit de IvD samen met de dierenarts, de onderzoeker en de dierverzorgers of de lijn wel of geen ongerief heeft. Er volgt ook een classificering van het ongerief (licht, matig of ernstig) [4]. We noemen dit de welzijnsbeoordeling van de lijn. Indien de lijn wel ongerief heeft, dan wordt beschreven wat het ongerief is en hoe het, waar mogelijk, vermeden of verfynd kan worden in de fokdieren en nakomelingen. Deze informatie moet al beschreven zijn in een bestaande projectvergunning waar deze dieren op komen te staan of dit moet middels een wijziging of nieuwe projectvergunning aangevraagd worden alvorens de fok doorgang kan vinden.

Een uitzondering op de regel is dat er geen projectvergunning nodig is als je kunt beargumenteren aan de IvD en de aangewezen dierenarts dat de nieuwe lijn geen ongerief zal hebben. Dit kan het geval zijn als er veel bekend is van de kruising van deze twee lijnen, vergelijkbare genetische lijnen of de nieuwe lijn. Een andere uitzondering zijn niet gekruiste Cre- of Lox-lijnen met een genotype zonder welzijnsaantasting en lijnen waarbij de mutagenese en daarmee het fenotype pas door een activatiestap (bijvoorbeeld door Tamoxifen of een temperatuurverhoging) tot uiting komt. De ouderdieren en de dieren die geboren worden in deze lijnen hebben dus geen ongerief. Voor het fokken van deze lijnen is geen projectvergunning nodig. Maar wanneer de mutagenese actief tot stand wordt gebracht in individuele dieren (bijvoorbeeld door een injectie tamoxifen) dan heb je voor deze procedure een projectvergunning nodig en wordt naast het ongerief van de injectie ook het effect op het fenotype van de dieren meegewogen in het ongerief.

Er is geen projectvergunning nodig voor een lijn wanneer er bijvoorbeeld door een spontane mutatie in een generatie opeens afwijkingen optreden die ongerief geven. Op dat moment zal de fok met deze dieren moeten worden opgeschort en zal er uitgezocht worden wat er nodig is om nieuwe nakomelingen met ongerief te voorkomen. Maar wanneer het ongerief in een lijn niet voorkomen kan worden door de fokstrategie te wijzigen en er zijn wel nieuwe dieren nodig van de lijn, dan wordt dit als een fok met ongerief beschouwd en is er wel een projectvergunning nodig. In alle gevallen zullen de onderzoeker, de fokcoördinator, de dierversorger en de dierenarts nauw samenwerken met de IvD om te bepalen of de nieuwe gewijzigde lijn een projectvergunning nodig heeft.

### Rederiveren en cryopreservatie

Als laatste zijn er nog het rederiveren (opschonen) en cryopreserveren (invriezen) van lijnen. Het opschonen van lijnen gebeurt om er voor te zorgen dat pathogenen en onschadelijke gastkiemen (commensalen) worden verwijderd. Wanneer dit gebeurt ten behoeve van onderzoek en de kwaliteit van de experimenten dan is hier een projectvergunning voor nodig. Wanneer het opschonen gebeurt in opdracht van de aangewezen dierenarts ten behoeve van gezondheid van de kolonie, dan is hier geen projectvergunning voor nodig. De beslissing wordt formeel vastgelegd. Cryopreservatie (bijvoorbeeld handelingen als superovulatie, het invriezen van embryo's of het afnemen van sperma) wordt gedaan om een lijn te behouden voor een wetenschappelijk doel. Er is een projectvergunning nodig voor de experimentele handelingen die nodig zijn voor cryopreservatie en in Nederland ook voor het doden van dieren voor het verkrijgen van sperma.

## 2. Hoe moeten we de dieren opnemen in de registratie?

Er wordt bij het registreren van dieren in Nederland onderscheid gemaakt tussen de term proefdieren en dierproeven. Ieder dierenlaboratorium heeft een eigen administratiesysteem, en hiermee houdt de instelling het aantal dieren bij. Daarin wordt ook bijgehouden welke dieren als proefdier worden geregistreerd en dieren die specifiek als dierproef worden geregistreerd. In dierproeven gebruiken we (proef)dieren voor onderzoek. Niet alle proefdieren zijn voor een dierproef gebruikt.

### Proefdieren en dierproeven

Proefdieren zijn gehuisvest bij een vergunninghouder, de instelling die dieren fokt en of gebruikt voor onderzoek. De proefdieren zijn dieren gedood in of na de fok (ouderdieren of ongebruikte nakomelingen) of (voorraad)dieren die niet zijn gebruikt in een dierproef. Proefdieren vallen niet onder een projectvergunning. Deze getallen worden door de vergunninghouder jaarlijks opgestuurd naar de NVWA (Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit) in formulier 'NL-informatie jaarlijks'. De NVWA combineert alle cijfers van de vergunninghouders in Nederland. Je kunt deze dieren terugvinden in Zo doende, het jaaroverzicht van de NVWA, waarin gerapporteerd wordt over proefdieren en dierproeven in Nederland [5].



# Zorgen voor dieren, streven naar betere wetenschap.

EU-ADVIES VOOR DE IMPLEMENTATIE VAN DIRECTIVE 2010/63/EU BETREFFENDE DE BESCHERMING VAN DIEREN DIE VOOR WETENSCHAPPELIJKE DOELEINDEN WORDEN GEBRUIKT.

## HET FOKKEN EN MAKEN VAN GENETISCH GEWIJZIGDE DIEREN (GGW).

### WANNEER HEB JE EEN PROJECTVERGUNNING NODIG?

HET MAKEN EN HET AANHOUDEN VAN GENETISCH GEWIJZIGDE (GGW) LIJNEN



(\*) Het kruisen/terugkruisen van twee lijnen zonder ongerief waarbij het niet te verwachten is dat de nieuwe lijn een fenotype met ongerief zal hebben.

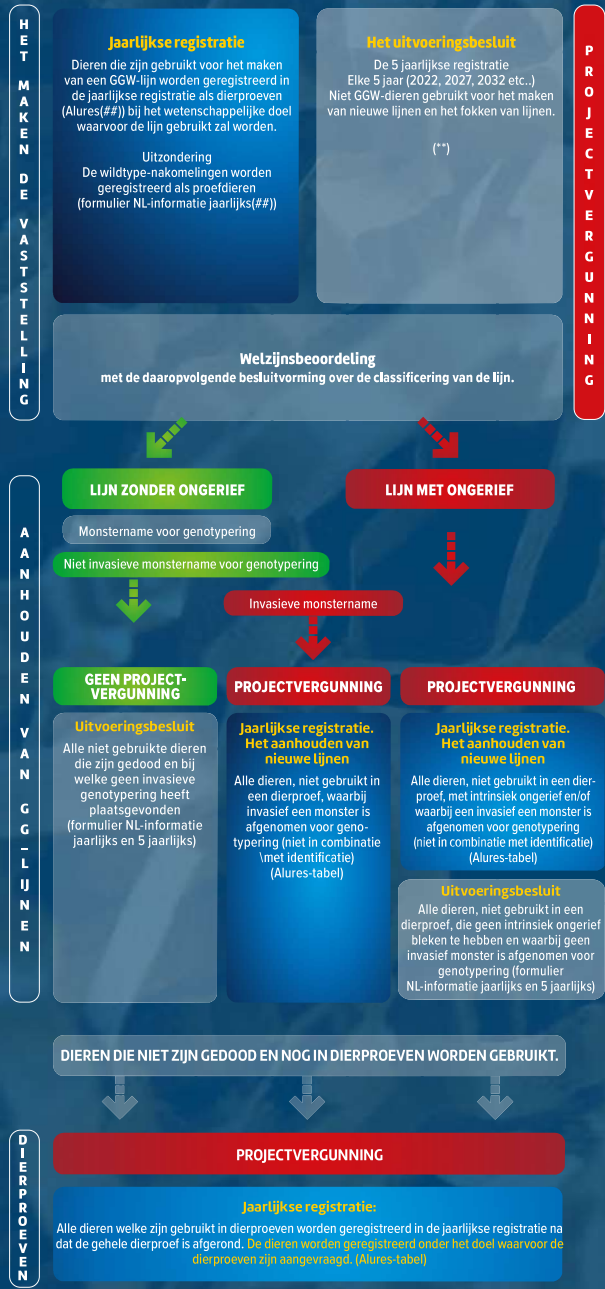
(\*\*) Door de jaarlijkse registratie van proefdieren in Nederland is de Engelse tekst hier ingekort om verwarring te voorkomen.

(#) Dit is een officieuze Nederlandse weergave van deze publicatie: DG\_ENV\_A1\_poster\_laboratory\_animal\_Vertical\_GA\_Arey\_241020\_1102253705.pdf (europa.eu)

(##) De Alures-tabel en formulier NL-informatie jaarlijks. Proefdieren staan in het formulier NL-informatie jaarlijks. Dierproeven staan in Alures-tabel en de dieren komen ook als gebruikt in een dierproef terug in het formulier NL-informatie jaarlijks. Dieren zonder voorafgaande handeling gedood komen niet in het formulier NL-informatie jaarlijks.

### HOE MOET JE DE DIEREN REGISTREREN?

HET MAKEN EN HET AANHOUDEN EN HET GEBRUIK VAN GENETISCH GEWIJZIGDE GGW-LIJNEN EN DIEREN



Dierproeven vallen altijd onder een projectvergunning. De dierproeven zijn in Nederland altijd onderdeel van een werkprotocol (studieplan, experimenteel protocol, werkplan, onderzoeksplan, onderwijsprotocol, fok met ongerief protocol etc.). De IvD beoordeelt en controleert of deze werkprotocollen passen binnen de kaders van een projectvergunning. Dierproeven registreren we bij de beëindiging van het gebruik van of het doden van een dier in een dierproef. De getallen worden door de vergunninghouder jaarlijks opgestuurd naar de NVWA in het Alures-formulier; dit is het Europese registratieformulier [6].

### **Invasieve handeling**

Wanneer je invasieve handelingen aan dieren hebt gedaan die nodig waren voor het maken of het in stand houden van een genetisch gewijzigde lijn dan worden deze dieren geregistreerd als dierproef. Dit geldt voor handelingen bij dieren als een vasectomie, een superovulatie, de transplantatie van embryo's, maar ook voor een invasieve monstername zoals de vinknip. Dit zijn allemaal dierproeven. Wanneer de enige handeling aan het dier een invasieve monstername was, die direct samen ging met identificatie (oorknip of teenknip) van dit dier en het dier is vervolgens niet gebruikt in een dierproef dan wordt dit dier geregistreerd als proefdier. Maar wanneer het dier bijvoorbeeld al eerder een oorknip heeft gehad ter identificatie en er opnieuw een oorknip genomen moet worden voor het vaststellen van de genetische achtergrond, dan wordt het dier geregistreerd als een dierproef.

### **Intrinsiek ongerief**

Voor het fokken en houden van genetisch gewijzigde dieren met intrinsiek ongerief moet je altijd een projectvergunning hebben. Er is sprake van intrinsiek ongerief bij een dier als het waarneembare eigenschappen heeft als gevolg van een afwijking of ziekte die nadelig zijn voor welzijn/gezondheid. De dieren met het ongerief worden altijd geregistreerd als een dierproef. Wanneer ze zijn gebruikt in een experiment dan worden de dieren geregistreerd op het experimentele protocol (dierproeven). Dieren die niet gebruikt worden in een wetenschappelijke proefopzet worden dan geregistreerd op het 'fok met ongerief'-protocol (daarmee toch een dierproef). De dieren in deze fok die het aangedane genotype niet hebben (bijvoorbeeld de wildtype (WT)-dieren of de heterozygote dieren) worden alleen geregistreerd als proefdieren. Wanneer de dieren zonder ongerief worden gebruikt in een experiment met ongerief (gelijk of meer dan het inbrengen van de naald) dan worden ze geregistreerd als dierproef. Wanneer je door de huisvesting/verzorging hebt weten te voorkomen dat de dieren ongerief hadden (bijvoorbeeld het huisvesten van immuun-gecompromiteerde dieren in een IVC-opstelling of extra nestmateriaal voor naakte muizen) en de dieren zijn niet gebruikt in een experimenteel protocol dan registreer je deze dieren als proefdieren.

### **Een nieuwe genetisch gewijzigde lijn**

Nieuwe lijnen met dieren met een gewijzigd genotype worden gemonitord. De dieren met het nieuwe genotype (dus niet de WT-dieren) die worden gemonitord komen als dierproeven in de registratie (Alures). We gebruiken minimaal twee generaties in een projectvergunning om het fenotype in de gaten te houden. Voor muizen zijn dat minimaal zeven mannen en zeven vrouwen met het beoogde genotype uit verschillende nestjes van twee generaties. Deze (minimaal) 28 dieren met het nieuwe genotype, die je extra in de gaten hebt gehouden, worden geregistreerd als dierproeven. Ook wanneer er geen ongerief is signaleerd in deze dieren. Op basis van de welzijnsbeoordeling van de lijn worden de andere dieren als proefdier (geen ongerief) of als dierproef (wel intrinsiek ongerief, 'fok met ongerief'-protocol) in de registratie vermeld. Soms komt er spontaan ongerief voor in een lijn. Dit is dan geen beoogd fenotype en wordt dit door het wijzigen van fokstrategie direct aangepakt. De dieren met dit spontane ongerief (bijvoorbeeld waterhoofden) worden direct gedood en geregistreerd als proefdieren. Wanneer het ongerief structureel en substantieel aanwezig blijft in verschillende generaties in een

genetische lijn (meer dan 5% van de nakomelingen), ongeacht de acties om het ongerief te voorkomen, dan wordt de conclusie anders: het ongerief wordt dan beschouwd als intrinsiek horend bij het genotype van de lijn. Deze dieren worden dan direct op een projectvergunning geregistreerd (door het schrijven van een 'fok met ongerief'-protocol) en de dieren met het aangedane fenotype worden geregistreerd als dierproeven.

Bij het ongerief inschatten neem je het intrinsieke ongerief bij het dier, het afnemen van materiaal voor de genotypering, en de eventuele handelingen aan de dieren mee (bijvoorbeeld vasectomie) in je inschatting. Wanneer een dier na de fok op een experimenteel protocol wordt gezet, dan worden de experiment-gerelateerde handelingen aan het dier ook meegenomen bij het inschatten van ongerief. Wanneer het dier is gegenotypeerd (zonder identificatie, bijvoorbeeld vinknip) en het dier blijkt niet geschikt voor de experimentele procedure, maar het dier wordt wel gebruikt voor een ander doel (bijvoorbeeld op een onderwijsprotocol) dan moet je dit registreren als hergebruik. Dit ene dier wordt dus voor twee verschillende dierproeven geregistreerd.

Elke vijf jaar zal iedere instelling ook nog extra gegevens moeten verzamelen (zo ook over 2022) over dieren die zijn gedood voor de organen, WT-dieren van nieuwe lijnen en WT-dieren van lijnen met intrinsiek ongerief. Ook komt daar informatie te staan over de manier waarop monsters worden genomen voor genotypering en de verfijningen die zijn toegepast. Anders dan in andere lidstaten van de EU registreren we in NL jaarlijks proefdieren en registreren we dieren gedood voor organen zonder voorafgaande handelingen als dierproeven. Hierdoor is er overlap tussen de jaarlijkse registraties proefdieren en dierproeven en de vijf jaarlijkse registratie voor Europa.

### Rederiveren en cryopreserveren

Als laatste zijn er nog het rederiveren (opschonen) en cryopreserveren (invriezen) van lijnen. Wanneer het opschonen van lijnen gebeurt in opdracht van onderzoek om er zo voor te zorgen dat pathogenen en onschadelijke gastkiemen (commensalen) geen invloed kunnen hebben op de kwaliteit van de experimenten, dan worden de dieren geregistreerd als dierproeven (Alures). Wanneer het opschonen gebeurt in opdracht van de aangewezen dierenarts ten behoeve van gezondheid/welzijn van de kolonie, dan is er geen projectvergunning vereist en worden de dieren, ongeacht of er handelingen aan de dieren zijn gedaan, geregistreerd als proefdieren (formulier NL-informatie jaarlijks). Cryopreservatie (bijvoorbeeld handelingen als superovulatie, het invriezen van embryo's of het afnemen van sperma) wordt gedaan om een lijn te behouden voor een wetenschappelijk doel. De experimentele handelingen die nodig zijn voor cryopreservatie en het doden van dieren voor het verkrijgen van sperma wordt daarmee in Nederland altijd geregistreerd als dierproeven (Alures).

### Bronnen

1. Uitvoeringsbesluit (EU) 2020/569 tot vaststelling van een gemeenschappelijk format en gemeenschappelijke inhoud voor de indiening van de informatie die door de lidstaten moet worden gerapporteerd overeenkomstig Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt en tot intrekking van Uitvoeringsbesluit 2012/707/EU van de Commissie
2. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020D0569&from=EN>
3. Richtlijn 2010/63/EU betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt, Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt voor de EER relevante tekst (europa.eu)
4. Genetically altered animals. Framework for the Genetically Altered Animals under Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. A working document on Genetically Altered Animals to fulfil the requirements under the Directive - Replacing consensus document of 22-23 March 2012 - Brussels, 25-26 November 2021 (geen NL-vertaling beschikbaar) Endorsed GAA.pdf (europa.eu)
5. Severity Assessment (2012) EC Working Document for the purpose of implementation of Directive 2010/63/EU. The severity assessment framework from project planning, monitoring and assessing the severity through to final assignment of actual severity. Illustrative examples of practical application of the severity assessment process were added in 2013.
6. NVWA-jaaroverzicht dierproeven en proefdieren: Zo doende Zoeken | NVWA
7. Alures-registratie van alle dierproeven in de EU [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/alures\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/alures_en.htm)