

Ministerie van Economische Zaken
Directeur Dierlijke Agroketens en Dierenwelzijn

Postbus 20401
2500 EC DEN HAAG

Laan van Nieuw Oost-Indië 334
2593 CE Den Haag
Postbus 93245
2509 AE Den Haag
Telefoon 070 349 51 11
Fax 070 349 51 00
www.zonmw.nl
info@zonmw.nl

Dossiernummer
40-42600-20
Ons kenmerk
2016/13344/ZONMW

Onderwerp

ZonMw inventarisatie gebruik teenkootknip, oorknip

Datum

24 juni 2016

Naar aanleiding van uw opdrachtbrief dd. 30 januari 2015 (kenmerk DGA-AK/15009273) bied ik u hierbij de inventarisatie aan van de drie aanvullende acties ten aanzien van de teenkootknip die u aan ZonMw heeft gevraagd uit te werken.

In deze opdrachtbrief heeft u gevraagd om, naast de ontwikkeling van het programmavoorstel Meer Kennis met Minder Dieren 2015-2017, een aantal aanvullende opdrachten uit te voeren.

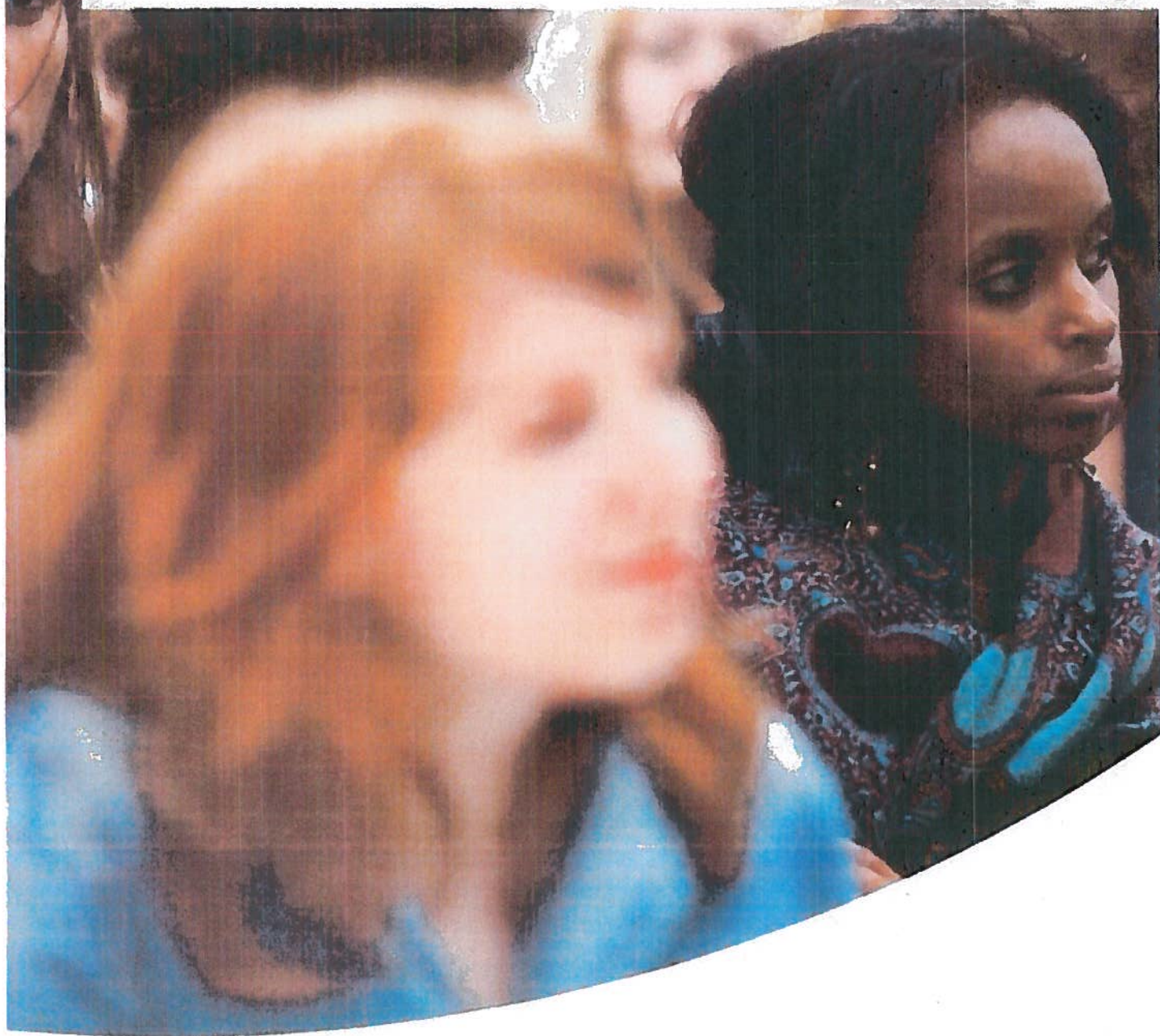
De eerste opdracht was gericht op het gebruik van non-humane primaten in onderzoek. Dit naar aanleiding van een aantal aanbevelingen uit het KNAW rapport 'Gebruik van niet humane primaten als proefdier – nut en noodzaak?'. Voor die opdracht heeft ZonMw op 19 mei 2015 een symposium georganiseerd met als onderwerp 'De nut en noodzaak van non-humane primaten in onderzoek'. Een verslag van deze dag met de belangrijkste conclusies is op 24 juni 2015 aan het Ministerie van Economische Zaken aangeboden.

In het tweede deel van de opdrachtbrief heeft u gevraagd om drie acties rondom de toepassing van de teenkootknip uit te werken, namelijk:

1. U wordt verzocht een zorgvuldige schatting te maken van de omvang van de toepassing van de teenknip;
2. U wordt verzocht de activiteiten uit te voeren zoals beschreven in de mail van 14-01-2015 (w.o. consensus protocol en implementatieplan);
3. Tot slot ontvang ik graag van u nog een aanvullend voorstel en begroting voor een separate (aanvullende) module waarin u een call uitzet om een alternatieve methode voor de teenknip te ontwikkelen.

Met het bijgevoegde document biedt ZonMw u de inventarisatie aan waarin deze drie punten worden behandeld.

Inventarisatie van gebruikte methoden voor karakterisatie en/of identificatie van knaagdieren



ZonMw

Inventarisatie van gebruikte methoden voor karakterisatie en/of identificatie van knaagdieren

23 juni 2016



Colofon

ZonMw stimuleert gezondheidsonderzoek en zorginnovatie

Vooruitgang vraagt om onderzoek en ontwikkeling. ZonMw financiert gezondheidsonderzoek én stimuleert het gebruik van de ontwikkelde kennis – om daarmee de zorg en gezondheid te verbeteren.

ZonMw heeft als hoofddopdrachtgevers het ministerie van VWS en NWO.

Voor meer informatie over het programma MKMD kunt u contact opnemen met het secretariaat via e-mail MKMD@zonmw.nl of telefoon 070 349 52 13.

Datum: 23 juni 2016

Oplagenummer: 1/23 juni 2016/MKMD

ZonMw

Laan van Nieuw Oost-Indië 334

Postbus 93245

2509 AE Den Haag

Tel. 070 349 51 11

Fax 070 349 53 58

www.zonmw.nl

info@zonmw.nl

Inhoud

Inleiding	5
1. Zorgvuldige schatting toepassing teenkootknip	5
2. en 3. Activiteiten voor 'code of conduct' en aanvullende module alternatieven voor de teenkootknip	7
Samenvatting	15
Referenties	17
Bijlage 1 enquête 2015	19
Bijlage 2 enquête IVD's mei/juni 2016	21
Bijlagen	22

Inleiding

In de opdrachtbrief van 30 januari 2015 heeft de staatssecretaris van Economische Zaken aan ZonMw gevraagd om, naast de ontwikkeling van het programmavoorstel Meer Kennis met Minder Dieren 2015-2017, een aantal aanvullende opdrachten uit te voeren. De staatssecretaris heeft drie verzoeken rondom de toepassing van de teenkootknip aan ZonMw voorgelegd:

1. U wordt verzocht een zorgvuldige schatting te maken van de omvang van de toepassing van de teenknip¹;
2. U wordt verzocht de activiteiten uit te voeren zoals beschreven in de mail van 14-01-2015 (consensusprotocol (nu 'Code of Conduct' genoemd) en implementatie van de 'Code of Conduct');
3. Tot slot ontvang ik graag van u nog een aanvullend voorstel en begroting voor een separate (aanvullende) module waarin u een call uitzet om een alternatieve methode voor de teenknip¹ te ontwikkelen.

Hieronder wordt nader toegelicht hoe ZonMw deze vraagstukken heeft geïnventariseerd.

1. Zorgvuldige schatting toepassing teenkootknip

De teenkootknip is een ingreep die in Europa en Nederland wordt toegepast bij knaagdieren, met name bij genetisch gemodificeerde muizen. Het is een methode om deze dieren op jonge leeftijd in één handeling individueel te kunnen onderscheiden van de rest (identificeren) en te kunnen bepalen (karakteriseren of genotyperen) wat de genetische achtergrond is van de dieren. Een andere ingreep voor identificatie en karakterisering in één handeling is de oorknip (of oorwig of oorpons). Deze twee methoden worden aanbevolen door de FELASA, the Federation of Laboratory Animal Science Association, in twee expert rapporten (zie pdfs in de bijlage: FELASA recommandation and FELASA report Dahlborn 2013). De verschillen tussen deze twee methoden worden verderop (paragrafen 2.3 en 2.4) uiteengezet. Daarnaast zijn er methoden voor alléén identificatie (bijvoorbeeld tatoeage) of alléén karakterisering (bijvoorbeeld staartknip, wangslijmvlies (zie voor een beschrijving paragraaf 2.5 en de literatuur verwijzingen).

De toepassing van de teenkootknip is niet eenvoudig te kwantificeren, omdat er geen wettelijke verplichting bestaat om het gebruik van deze techniek te registreren. Om ondanks deze beperking een beeld te krijgen van het huidige gebruik van de teenkootknip in Nederland, heeft ZonMw als eerste de NVWA (Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit) aangeschreven voor informatie uit Zodoende 2014. Dit betrof echter geen kwantitatieve informatie. Als tweede is er contact opgenomen met de vereniging van proefdierdeskundigen. Door de veranderingen in 2015, waaronder oprichting NCad, CCD en Instanties voor Dierenwelzijn (IVDs), was deze vereniging officieel niet meer actief en was er nog geen alternatief platform. Via dit contact is wel informatie verkregen uit een inventarisatie die de beroepsgroep in 2014 onder haar leden heeft uitgevoerd (zie 1.1). Als derde is in mei 2016 een ingang gevonden via het nog in oprichting zijnde overkoepelde nationale platform van IVD's. Via hen, is een door ZonMw opgestelde inventarisatie over het gebruik van de teenkootknip uitgestuurd. Deze inventarisatie is door het platform naar de daarvoor meest relevante IVDs gestuurd (24 totaal).

1.1 Inventarisatie vereniging van proefdierdeskundigen 2014

De vereniging van proefdierdeskundigen heeft in juni 2014 een inventarisatie uitgevoerd (16 respondenten van de in totaal circa 80 vergunninghouders) en deze informatie ter beschikking gesteld. Deze gegevens geven geen schatting van het totaal aantal dieren dat een teenkootknip ondergaat, maar geeft wel enig inzicht over hoeveel instanties de techniek op dat moment gebruikten (tabel 1).

¹ Teenknip = teenkootknip in dit document

Respondenten	Aantal respondenten	Teenkootknip toegestaan bij	Teenkootknip uitgevoerd bij	Teenkootknip niet uitgevoerd bij
Universiteiten, Nationale Instituten (o.a. KNAW), Bedrijven (incl. fokbedrijven)	16	13	10	6

Tabel 1: Inventarisatie hoeveel instituten de teenkootknip als methode toepassen (bron: vereniging van proefdierdeskundigen juni 2014). De inventarisatie is uitgestuurd naar alle vergunninghouders (circa 80). Voor maar een deel van de vergunninghouders zijn deze vragen relevant, omdat zij geregeld onderzoek en/of fok met knaagdieren uitvoeren.

1.2 Schatting aantallen via platform voor IVDs 2016

Het platform van IVDs heeft in mei 2016 op verzoek van ZonMw een enquête voorgelegd aan vergunninghouders via de lokale IVDs. In totaal zijn 24 IVDs (en evenzoveel vergunninghouders) aangeschreven door het platform, dit betroffen die vergunninghouders waarvoor deze vragen het meest relevant waren, van 17 vergunninghouders is een reactie ontvangen (14 IVDs). In de enquête is specifiek gevraagd een schatting te geven van het aantal dieren die een teenkootknip ondergaan (per vergunninghouder). In totaal hebben acht van de zeventien vergunninghouders aangegeven in meer of mindere mate de teenkootknip toe te passen. De resultaten zijn hieronder samengevat.

Instituutnummer/IVD	Gemiddelde aantal toegepaste teenkootknip (% van het totale aantal muizen)	Schatting mediaan**	Schatting bereik***
1	28228 (95%)		
2	45607 (97%)		
3a	*(1%)	261	240-456
3b	*(5%)	1308	1204-2280
4	24092 (50%)		
5	*(75%)	19620	18096-34205
7	*(70%)	18312	16864-31924
11	100 (2-3 % v/d pups)		
Totaal schatting muizen(pups):		137428*	134331- 166792

Tabel 2: Schatting van het aantal muizen waarvoor de teenkootknip wordt toegepast.

*Sommige IVDs hebben geen totaal aantal doorgegeven, maar alleen een percentage van het totale aantal muizen dat met de teenkootknip wordt gekarakteriseerd en geïdentificeerd. Vaak betreffen deze aantallen en percentages schattingen. Daar waar gegevens over 2014 en 2015 beschikbaar waren, is een gemiddelde over deze twee jaar in kolom 2 opgenomen.

** Op basis van de in kolom 2 beschikbare aantallen is een mediaan berekend. Deze mediaan is gebruikt om aantallen te schatten voor die instituten die alleen een percentage van het aantal muizen die de teenkootknip ondergaan hebben opgegeven.

*** Om de onzekerheidsmarge rondom de mediaan beter weer te geven is er ook een bereik berekend. Dit bereik is berekend door middel van het respectievelijk geschat totaal van een instituut met een hoog totaal aantal (instituut 2 als 100% genomen) en een instituut met een laag totaal aantal muizen (instituut 4 als 100% genomen).

1.3 Samenvatting schatting aantallen

Over een gemiddelde van 2 jaar berekend en met in acht name van veel ontbrekende en geschatte informatie, kan het aantal van (met name) genetisch gemodificeerde muizen dat jaarlijks in Nederland een teenkootknip ondergaat, ruwweg worden geschat tussen 134.000 - 167.000 dieren.

2. en 3. Activiteiten voor 'code of conduct' en aanvullende module alternatieven voor de teenkootknip

Onderdeel 2 van het verzoek van de staatssecretaris van Economische Zaken was een voorstel te doen gericht op het opstellen van een 'code of conduct' of 'best practice' voor het gebruik van methoden van karakterisering en identificatie van muizen.

Onderdeel 3 was gericht op de ontwikkeling van een (eventuele) aanvullende module voor alternatieven methoden voor de teenkootknip.

2.1 Systematisch literatuuronderzoek

Uit de literatuur en de inventarisaties (zie 2.1 t/m 2.4) blijkt dat er uiteenlopende bevindingen zijn over de mate van ongerief bij de oorknip en teenkootknip. In juli 2015 is daarom, in overleg met het ministerie van EZ, de opdracht gegeven aan SYRCLE (Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation) om de mate van ongerief bij de teenkootknip en oorknip te inventariseren. Deze opdracht is in twee delen uitgezet. Als eerste stap heeft SYRCLE een complete literatuur inventarisatie gedaan. Op basis van deze bevindingen is als tweede stap een systematisch literatuuronderzoek ('systematic review') uitgevoerd.

Verkenning beschikbare literatuur teenkootknip, oorknip en staartknip

De literatuurinventarisatie is verricht in drie databases. Op basis van samenvatting en titel leken er 189 relevante publicaties beschikbaar te zijn, over ongerief bij de teenkootknip, oorknip (of oorpunctie of oorwig) en staartknip. De gevonden literatuur is in twee categorieën op te delen, als eerste proefdierkundige literatuur met als doel het ongerief te onderzoeken, als tweede pijnmodellen om het effect van analgetica (pijnstillers) te bestuderen. Het aan elkaar koppelen van deze twee categorieën onderzoek, in een systematisch literatuuronderzoek en meta-analyse, leken een uitgelezen mogelijkheid om het ongerief van de diverse methoden te kunnen inventariseren. Deze bevindingen hebben vervolgens in september 2015 geresulteerd in een opdracht aan SYRCLE om een systematisch literatuuronderzoek uit te voeren naar de mate van ongerief bij de teenkootknip en oorknip. De staartknip is in het systematisch literatuuronderzoek buiten beschouwing gelaten, omdat deze methode alleen geschikt is voor karakterisatie en niet voor identificatie.

Systematisch literatuuronderzoek teenkootknip en oorknip

Het doel van dit systematische literatuuronderzoek was om een antwoord te geven op de hoofdvraag 'wat op basis van het nu beschikbare bewijs het ongerief is ten gevolge van gebruik van de teenkootknip en de oorknip bij proefdieren'. De resultaten van dit systematische literatuuronderzoek zijn eind februari 2016 door SYRCLE opgeleverd. De Nederlandse samenvatting van het systematisch literatuuronderzoek is als aparte bijlage toegevoegd (pdf). Hieronder worden de bevindingen ten aanzien van de hoofdvraag en de deelvragen uit het systematische literatuuronderzoek samengevat.

- *Hoofdvraag: wat is, op basis van het beschikbare bewijs, het ongerief ten gevolge van de teen(koot)knip en de oorknip bij proefdieren?*

Het systematisch literatuuronderzoek, uitgevoerd door SYRCLE, stelt dat - gebaseerd op het huidige bewijs – een effect van de teen(koot)knip of van de oorknip op het dierenwelzijn noch kan worden uitgesloten noch kan worden bevestigd.

- *Deelvraag 1: Welk bewijs is er beschikbaar met betrekking tot het ongerief ten gevolge van de teenknip en de oorknip?*

Studies naar de effecten van de teen- en oorknip op het dierenwelzijn zijn schaars en erg heterogeen. Deze heterogeniteit wordt voornamelijk veroorzaakt door verschillen in de populatie (geslacht, stam) en de interventie (leeftijd op het moment van knippen, aantal plaatsen geknipt), evenals het grote aantal verschillende uitkomstmaten dat gebruikt is.

- *Deelvraag 2: Wat is de kwaliteit van dit bewijs?*

De auteurs van het systematische literatuuronderzoek concluderen dat de kwaliteit van het bewijs op verschillende onderdelen ontoereikend is.

Volgens de auteurs is er een onduidelijk tot groot risico dat onderzoeksresultaten door bias zijn verstoord. Geen van de studies definieerde welke uitkomstmaat de primaire uitkomstmaat was en er werd in geen van de studies een power berekening gerapporteerd. Daardoor is het voor de auteurs onmogelijk om te bepalen of de steekproefgrootte in de primaire studies toereikend was om een verschil tussen de experimentele groepen aan te tonen. De auteurs stellen ook dat de gebruikte controlegroepen soms niet (optimaal) geschikt waren om het effect van teen- of oorknip op ongerief aan te kunnen tonen. Daarnaast tonen zij aan dat de data van verschillende uitkomstmaten onvolledig zijn gerapporteerd.

- *Deelvraag 3: Welke factoren beïnvloeden het ongerief ten gevolge van de teenknip en de oorknip?*

De auteurs van het systematisch literatuuronderzoek concluderen dat het bestaande bewijs te beperkt en te heterogeen is om betrouwbaar de invloed van bepaalde factoren op de ernst van het ongerief te beoordelen.

- *Deelvraag 4: Hoe verhouden de teenknip en de oorknip zich tot elkaar met betrekking tot het veroorzaakte ongerief?*

In het literatuuronderzoek geven de onderzoekers aan dat het bestaande bewijs te beperkt en te heterogeen is om een betrouwbare vergelijking te kunnen maken tussen de teen- en oorknip. De auteurs concluderen dat het moeilijk is om een uitkomstmaat te vinden die zowel bij de teenknip als bij de oorknip op het moment van knippen het ongerief meet. Dit omdat de teenknip over het algemeen niet wordt uitgevoerd in pups ouder dan 7 dagen, terwijl de oorknip pas na 14 dagen en vaak nog veel later wordt toegepast.

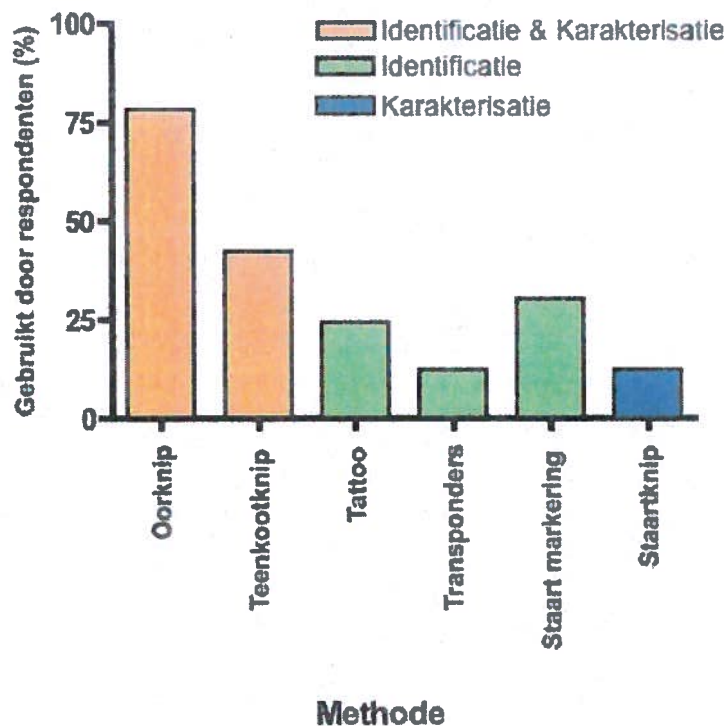
- *Deelvraag 5: Welke leeftijd van het proefdier, techniek, plaats van ingreep geeft voor de teenknip en oorknip de minste vorm van pijn en ongerief?*

Ook hier concluderen de auteurs dat het bestaande bewijs te beperkt en te heterogeen is om een betrouwbare uitspraak te doen over de optimale leeftijd of techniek van de ingreep. Zij geven aan dat het effect van leeftijd onduidelijk is en dat er verder onderzoek op dit gebied nodig is om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over de mate van ongerief bij beide technieken.

Tenslotte concluderen de onderzoekers dat de mogelijke effecten van pijnstillers of (lokale) anesthetica onvoldoende zijn onderzocht om hierover betrouwbare uitspraken te kunnen doen.

2.2 Internationale inventarisatie van gebruikte methoden en alternatieven

In de zomer van 2015 heeft ZonMw een enquête verstuurd om binnen en buiten Nederland zicht te krijgen op de toepassing van de verschillende methoden voor karakterisering en/of identificatie van knaagdieren en eventuele alternatieve methoden. De enquête is uitgestuurd naar diverse onderzoekers betrokken bij dierexperimenteel onderzoek, FELASA en auteurs van artikelen waarin een alternatieve karakterisatie methode werd beschreven. In totaal zijn er 33 reacties (response 9,3 %) ontvangen (van de 33 kwam 9% uit het buitenland). De relatief lage respons is waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat de vragen niet door alle geadresseerden beantwoord konden worden. Niet alle onderzoekers zijn op dat detail niveau bij het dierexperimenteel onderzoek betrokken, deze expertise ligt dan met name bij de proefdierdeskundigen en andere betrokkenen bij de dierexperimentele laboratoria. In grafiek 1 is weergegeven welke identificatie en/of karakterisatie methoden voor muizen worden gebruikt.



Grafiek 1: gebruikte methoden voor karakterisatie en/of identificatie in binnen- en buitenland.

Voor identificatie én karakterisatie wordt de oorknip genoemd door 78% en de teenkootknip door 42%. Daarnaast worden nog enkele methoden genoemd voor alleen identificatie (tatoeage 24%, transponder 12% en staartmarkering 30%). Voor alleen karakterisatie werd de staartknip in 12% van de gevallen genoemd.

2.3 Ervaringen van deskundigen toepassing teenkootknip

In de enquête onder de IVDs uit 2016 en uit persoonlijke gesprekken met deskundigen, geven de betrokkenen aan óf, hoe en waarom de teenkootknip wordt toegepast. De bevindingen van de deskundigen zijn hieronder samengevat.

Algemene samenvatting gerapporteerde ervaringen bij toepassing van de teenkootknip

Het knippen van een teenkoot vindt alleen plaats als dat voor het onderzoek een noodzakelijke procedure is. In de meeste gevallen gaat het hierbij om situaties waarbij het vaststellen van het genotype (en de identificatie) op jonge leeftijd vóór het spenen essentieel is. De uitkomsten van de karakterisatie komen dan tijdig ter beschikking.

- De teenkootknip vindt plaats tussen dag 5 tot 7 na geboorte;
- Het streven is om alleen het bovenste kootje te verwijderen, voor betrouwbare identificatie behoeft nooit meer dan één enkel teenkootje gemerkt te worden;
- Naar de mening van een aantal gebruikers zijn er wat meer mogelijkheden voor identificatie dan bij de oorknip;
- Er kunnen beperkingen zijn bij grijpkracht en zwemvermogen (niet opgemerkt door respondenten, maar beschikbaar uit de literatuur)
- Over het algemeen wordt er geen anesthesie toegepast.

Hierdoor worden niet aan te houden muizen (pups) afgevoerd voor speenleeftijd (21 dagen), hetgeen adaptatiestress na het spenen voorkomt (verfijning). Gebruikers van de teenkootknip geven aan dat op dit moment de teenkootknip de enige methode is waarbij voor speenleeftijd het genotype betrouwbaar geanalyseerd kan worden, waardoor de dieren met het juiste genotype voor speenleeftijd uitgezocht kunnen worden (vermindering, omdat de pups pas na speenleeftijd als proefdier worden meegeteld). Daarnaast zijn zij van mening dat de dieren duidelijk op een oorknip reageren en nagenoeg niet op de teenkootknip op jonge leeftijd.

Het betreft hier persoonlijke ervaringen en observaties van een aantal gebruikers. Op basis van het systematisch literatuuronderzoek kan een effect van de teen(koot)knip of de oorknip op het ongerief voor dieren noch worden uitgesloten noch worden bevestigd.

2.4 Ervaringen deskundigen toepassing oorknip

In de enquête onder de IVDs uit 2016 en uit persoonlijke gesprekken met deskundigen, geven de betrokkenen aan of, hoe en waarom de oorknip wordt toegepast. De bevindingen van de deskundigen zijn hieronder samengevat.

Algemene samenvatting gerapporteerde ervaringen bij toepassing van de oorknip (of punctie of wig)

De oorknip (pons of wig) is een methode die ook identificatie combineert met karakterisatie. De uitkomsten van karakterisatie zijn meestal na speenleeftijd beschikbaar.

- De toepassing ligt vlak voor of na het spenen. Er worden toepassingen beschreven op dag 14 en 21. Deze tijdstippen worden gekozen om een betrouwbare identificatie te combineren met voldoende materiaal voor karakterisatie.
- In sommige gevallen is meer dan één knip nodig voor de identificatie;
- Het aantal beschikbare posities bij oorknip is naar de mening van een aantal gebruikers beperkter dan bij de teenkootknip, maar vaak afdoende;
- De oren hebben een signaalfunctie in de onderlinge sociale interactie en bij gelaatsuitdrukkingen, een oorknip kan die functies beperken, verhoogde innervatie en pijnvezels in de oren op benoemde leeftijd kan ongerief veroorzaken;
- Anesthesie wordt soms toegepast (niet van iedereen informatie beschikbaar)

Deze methode toegepast bij dieren op jongere leeftijd kan leiden tot uitscheuren / vergroeien van het litteken) waardoor de identificatie onbetrouwbaar wordt. Een tweede identificatiemethode is dan noodzakelijk. Het toepassen van de oorknip na spenen betekent dat alle pups – ook de individuen die niet bruikbaar zijn voor het onderzoek/fok – adaptiestress van het spenen moeten doormaken. Indien de karakterisatie niet voor speenleeftijd bekend is tellen deze dieren mee in de registratie als proefdier.

De oorwig (i.p.v. oorknip of punctie) wordt door een instelling toegepast. Het identificatiemerkje kan gemakkelijk worden uitgelezen zonder dat de muizen gehanteerd hoeven te worden. Er wordt momenteel een pilot uitgevoerd waarin pups een oorwig krijgen op een leeftijd van 10 dagen. In dat geval zou de karakterisatie ook op speenleeftijd bekend kunnen zijn.

Het betreft hier persoonlijke ervaringen en observaties van gebruikers. Op basis van het systematisch literatuuronderzoek kan een effect van de teen(koot)knip of de oorknip op het ongerief voor dieren noch worden uitgesloten noch worden bevestigd.

Inventarisatie gebruik teenkootknip in het buitenland (Norecopa)

De Norecopa (Norway National Concensus Platform for the advancement of the 3Rs) heeft in 2008 een inventarisatie naar de teenkootknip uitgevoerd en deze studie is ook onderdeel van het door SYRCLE uitgevoerde systematisch literatuuronderzoek. Ook de Norecopa kon geen bewijs leveren dat amputatie van de teenkoot ten opzicht van in dit geval het staartpuntje, meer ongerief zou veroorzaken. Daarom heeft de Norecopa aangegeven dat deze techniek, indien er een noodzaak is om de dieren vroeg te karakteriseren (voor 14 dagen oud), of in geval van studies waarbij tatoeage of andere substanties verstrend kunnen werken (toxicologische studies, carcinogeniteit studies, immunologische studies), zou moeten worden toegestaan.

2.5 Overige methoden

In de literatuur en uit de inventarisaties zijn enkele alternatieve karakterisatie methoden naar voren gekomen. Al deze methoden dienen echter nog te worden gevolgd door een identificatiemethode (bijvoorbeeld tatoeage, transponders of staartmarkering).

Wangslijmvlies/rectaal slijmvlies

M. Meldgaard et al. (2004), beschrijft in een publicatie dat via wangslijmvlies samples en PCR de karakterisatie van genetisch gemodificeerde muizen kan plaats vinden. Er wordt niet duidelijk beschreven vanaf welke leeftijd dit mogelijk is. Lahm et al. (1998), maken gebruik van rectale slijmvlies samples. Er is daarnaast ook een commerciële kit beschikbaar die met wangslijmvlies samples als basis de karakterisatie beschrijft (Fischer M. et. al.).

Mondspoeling (oral washing)

Irwin et al. (1996), beschrijft een techniek waarbij de onderzoekers gebruik maken van een mondspoeling bij de muizen om speeksel te verzamelen. Vervolgens wordt door middel van een PCR de karakterisatie gedaan.

Ontlasting en haren

Broome et al. (1999), Seymonds (2013) gebruiken de ontlasting als basis voor de karakterisatie, Schmitteker et al. (1999), heeft als basis haren gebruikt, deze beide methoden geven potentieel wel een hogere kans op contaminatie tussen dieren.

2.6 Deskundigen over een Code of Conduct

Er zijn veel diverse reacties ontvangen naar aanleiding van de vraag aan de IVDs of er behoefte is vanuit het veld om een 'Code of Conduct' (CoC) op te stellen om een beter overzicht te krijgen van de verschillende mogelijkheden van karakterisering en identificatie en de bijbehorende voor- en nadelen. In tabel 3 zijn de verschillende reacties die via de IVDs zijn gerapporteerd weergegeven.

Gerapporteerde bevindingen van voorstanders 'Code of Conduct'	Gerapporteerde bevindingen van tegenstanders 'Code of Conduct'
- Bij meerdere instellingen loopt men tegen vragen en/of problemen aan betreffende dit vraagstuk, met FELASA als basis zou de CoC deze kunnen aanvullen of de richtlijn zelf vernieuwen.	- Merken van dieren is geen dierproef in de zin van de wet en daarmee geen onderdeel van de vergunning. - Het is aan de instelling om het beleid (aanpak en werkwijze) voor te leggen aan de IVD om verantwoord met dieren om te gaan, binnen de wettelijke kaders en met ambitie ten aanzien van dierenwelzijn. Het externe toezicht ligt bij de inspectie

- Een CoC zou kunnen bijdragen aan verantwoorde keuzes voor inzet van de juiste technieken bij specifieke vraagstellingen	- Kennis van zaken zou onvoldoende zijn voor een breed gedragen CoC. Eerst zou gedegen onderzoek naar de mate van ongerief van de verschillende methoden moeten plaatsvinden
- Een CoC zou heldere voorwaarden moeten beschrijven voor toepassing van een teenkootknip volgens 'nee tenzij' principe	- Er zijn al twee FELASA expert richtlijnen, een eventuele update zou op internationaal niveau moeten worden gedaan en niet in een nationaal CoC
- Een CoC kan voor iedereen uniforme en landelijke regels opleveren die de CCD zou moeten onderschrijven	- Eerst zou een gedegen internationaal overzicht van alle alternatieve methoden gemaakt moeten worden, pas dan een CoC
	- De mogelijkheden voor de analyse van biopten/monsters worden steeds meer verfijnd, waardoor er ook mogelijkheden ontstaan voor het op meer diervriendelijke wijze verzamelen van monsters/biopten. Deze informatie zou eerst duidelijk moeten zijn.
	- Het zou Europees advies en beleid moeten zijn om de FELASA richtlijn geregeld te vernieuwen (update). Bijvoorbeeld eens per 5 jaar

Tabel 3: Bevindingen uit de inventarisatie onder IVDs (mei 2016) t.a.v. een 'Code of Conduct' voor karakterisatie en identificatie methoden bij knaagdieren

2.7 Deskundigen over een 'Nee tenzij'- beleid ten aanzien van toepassing teenkootknip

In de enquête onder de vertegenwoordigers van de IVDs in mei 2016 is een zogenaamd 'Nee tenzij'-beleid ten aanzien van de toepassing van de teenkootknip als optie voorgelegd. Het idee hierachter is dat er alleen een teenkootknip wordt toegepast voor specifieke vraagstellingen. Indien die voorwaarden niet van toepassing zijn moet een andere methode worden gebruikt. De reacties hierop vanuit het veld zijn in tabel 4 weergegeven.

Tabel 4

Gerapporteerde voordelen 'Nee tenzij'-beleid	Neutrale positie	Gerapporteerde nadelen 'Nee tenzij'-beleid
Het 'Nee tenzij'-beleid wordt acceptabel gevonden	Het beleid zou uitgangspunt bij het opstellen van een <i>code of conduct</i> moeten zijn.	Men vindt dit onwenselijk beleid, het merken van dieren is geen dierproef in de zin van de wet.
Men vindt dit acceptabel indien het onderdeel is van een <i>code of conduct</i> en onderbouwd met onderzoek naar de mate van ongerief van de beschikbare methoden.	Er zou wel ruimte moeten blijven voor bijzondere situaties, waarbij op basis van argumentatie een uitspraak verkregen zou moeten worden door DEC en CCD	Kans op het ontstaan van over rapportage en het zou het verantwoorde kolonie management buiten dierproeven ernstig hinderen
Positief indien het in EU verband zou worden doorgevoerd	Men is niet direct positief, eerst zou meer bekend moeten zijn over het ongerief van de teenkootknip en ook over het	Dit zou alleen in EU verband moeten worden aangepakt Nederland als EU lidstaat mag geen 'nationale koppen' stellen

	ongerief en/of de nadelen van eventuele alternatieven	
Binnen de eigen instelling geldt al een 'Nee tenzij'-beleid. Het zou volstaan om de teenkootknip alleen in de periode p5-7 toe te staan	Men is niet tegen het principe van dit beleid, maar wijst op de negatieve consequenties wanneer dieren waarvoor nu door vroege genotypering geen projectvergunning nodig is, dit door late genotypering wel nodig zou zijn. Dit zou toename van regulering betekenen en zijn doel voorbijgeschieten	De taakverdeling zou moeten zijn: de instelling maakt beleid, legt het voor aan IvD, binnen wettelijke kaders en met ambitie voor dierenwelzijn. Externe toezichthouder toetst.
	Men wijst 'Nee tenzij'-benadering af omdat de teenkootknip bij die instelling helemaal wordt afgewezen	Het zou niet wenselijk zijn om een specifieke techniek een status aparte te geven
		Voor een 'Nee tenzij'-beleid vindt men het te vroeg, dit zou pas na invoering van een <i>code of conduct</i> mogelijk zijn. Er zou meer bekend moeten zijn over de mogelijke alternatieven
		Met de huidige kennis zou een 'Nee tenzij'-beleid ongewenst zijn, maar op de lange termijn wellicht wel een mogelijkheid
		De commissie IvD platform heeft de visie geformuleerd dat het op dit moment ongewenst zou zijn om maatregelen te nemen ter beperking van de teenkootknip (zie de volledige visie hieronder)

Tabel 4: Bevindingen vanuit de inventarisatie onder IVDs (mei 2016) t.a.v. het 'Nee tenzij'-beleid voor de teenkootknip

Visie van de Commissie IvD Platform

Op dit moment is het naar de mening van het platform ongewenst om maatregelen te nemen om de mogelijkheden voor het uitvoeren van de teenkootknip te beperken. Dit omdat:

- er momenteel geen alternatieven bestaan voor het tegelijkertijd genotyperen/karakteriseren en identificeren van jonge pups van knaagdieren;
- er onvoldoende bekend is over pijnperceptie bij dergelijke dieren op het moment van knippen (hetzelfde geldt overigens voor de toepassing van alternatieve methoden);
- er onvoldoende bekend is over een eventuele welzijnsaantasting t.g.v. de teenkootknip en alternatieve methoden op latere leeftijd;
- het opleggen van beperkende maatregelen in strijd zou zijn met de Richtlijn en de Wod (procedures voor identificatie zijn expliciet uitgesloten) en dus zou leiden tot een 'kop op de Richtlijn'.

2.8 Deskundigen over een eventuele module voor de ontwikkeling van alternatieven voor karakterisatie

De inventarisatie door middel van de in 2015 uitgestuurde (inter)nationale enquête gaf niet voldoende aanknopingspunten om de meest kansrijke alternatieven te identificeren voor het opzetten van een

dergelijke specifieke module. Vanuit de literatuur en gesprekken met deskundigen zijn er wel een
 aantal alternatieve karakterisatie methoden te identificeren (zie 2.5 overige methoden). Voor al deze
 alternatieve karakterisatie methoden geldt echter, dat er daarnaast nog een identificatiemethode moet
 worden toegepast. Ook hier is geen sluitende informatie beschikbaar over voor- en nadelen ten
 opzichte van de andere methoden en de mate van ongerief.

Samenvatting

Op basis van alle bovengenoemde onderdelen kunnen de volgende punten samengevat worden:

- De teenkootknip wordt in Nederland toegepast als een methode om genetisch gemodificeerde muizenpups te karakteriseren en te identificeren op een leeftijd van 5-7 dagen.
- Over een gemiddelde van 2 jaar berekend en met in acht name van veel ontbrekende informatie, kan het aantal genetisch gemodificeerde muizenpups dat jaarlijks een teenkootknip ondergaat ruwweg worden geschat tussen de 134.000 - 167.000 dieren.
- Het systematisch literatuuronderzoek, uitgevoerd door SYRCLE, stelt dat - gebaseerd op het huidige bewijs - een effect van de teen(koot)knip of van de oorknip op het dierenwelzijn noch kan worden uitgesloten noch kan worden bevestigd.
- Verschillende respondenten uit de (inter)nationale inventarisatie geven aan dat er gedegen onderzoek zou moeten plaatsvinden om de vraag naar de mate van ongerief bij de teenkootknip en oorknip te kunnen beantwoorden. Ook het systematisch literatuuronderzoek onderschrijft deze behoefte. Bij een dergelijk onderzoek is het aan te bevelen om met een breed veld de uitkomstmaten voor ongerief vast te stellen. Indien gewenst is ZonMw bereid een opdracht hiervoor uit te zetten.
- Acht van de veertien respondenten geven aan dat in de instelling gebruik wordt gemaakt van de teenkootknip voor karakterisatie en identificatie van muizenpups.
- Zes van de veertien respondenten geeft aan dat in de instelling de oorknip (oorwig/oorpons) wordt toegepast voor karakterisatie en identificatie van muizenpups. Voor beide methoden worden voor- en nadelen genoemd. Een belangrijk verschil is de leeftijd van de muizenpup waarop de methode kan worden toegepast. Bij de oorknip betekent dit doorgaans dat de karakterisatie na speenleeftijd bekend wordt en de muizen daardoor als proefdier moeten worden geregistreerd.
- Er zijn een aantal alternatieve karakterisatie methoden in de literatuur te vinden, zoals via wangslimvlies of rectale swaps, speeksel sampling, haarsamples en ontlasting. Voor al deze toepassingen geldt, dat er daarnaast nog een identificatiemethode moet worden toegepast. Ook hier is geen sluitende informatie beschikbaar over voor- en nadelen ten opzichte van de andere methoden en de mate van ongerief. Indien gewenst is ZonMw bereid om de module naar alternatieve methoden te realiseren. Daarbij zou een studie naar deze voor- en nadelen en de mate van ongerief onderdeel van het plan moeten uitmaken.
- De inventarisatie laat zien dat de respondenten uit het veld in Nederland verdeeld zijn ten aanzien van een '*code of conduct*'. Indien gewenst is ZonMw bereid een opdracht hiervoor uit te zetten.
- Het 'Nee tenzij' principe ten aanzien van de teenkootknip is aan de IVDs voorgelegd en de reacties laten geen unaniem 'voor' of 'tegen' zien. Sommige respondenten geven aan dat dit onderdeel van een op te stellen '*code of conduct*' zou moeten zijn, andere geven aan dat er eerst meer onderzoek zou moeten worden gedaan naar het ongerief van de verschillende methoden voordat een dergelijk principe van kracht zou worden.

Referenties

1. **Bonaparte, D., P. Cinelli, E. Douni, Y. Herault, A. Maas, P. Pakarinen, M. Poutanen, M. S. Lafuente, and F. Scavizzi.** 2013. FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: a report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group. *Lab Anim* 47:134-145.
<http://www.felasa.eu/recommendations/guidelines/felasa-guidelines-for-the-refinement-of-methods-for-genotyping-genetically-/>
2. **Dahlborn, K., P. Bugnon, T. Nevalainen, M. Raspa, P. Verbost, and E. Spangenberg.** 2013. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Lab Anim* 47:2-11.
<http://www.felasa.eu/recommendations/reports/report-of-the-felasa-working-group-on-animal-identification-2013/>
3. **Fischer M., Dobrowolski P., Naumann R., Winkler S., Gelsen O.** Snooplex FastPrep. Genolytic GmbH R&D, Leipzig, Deutschland; 2GVG Genetic Monitoring Technology and Innovation, Leipzig, Deutschland; Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Deutschland
4. **M. Meldgaard, P. J. A. Bollen & B. Finsen;** Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR; Department of Anatomy and Neurobiology, Institute of Medical Biology, University of Southern Denmark, Odense, Denmark and Biomedical Laboratory, University of Southern Denmark, Odense, Denmark
5. **Irwin MH, Moffatt RJ, Pinkert CA (1996)** Identification of transgenic mice by PCR analysis of saliva. Nature Biotechnology 14, 1146–8
6. **Lahm H, Hoefflich A, Rieger N, Wanke R, Wolf E (1998)** Identification of transgenic mice by direct PCR analysis of lysates of epithelial cells obtained from the inner surface of the rectum Transgenic Research 7, 131–4
7. **Broome RL, Feng L, Zhou Q, Smith A, Hahn N, Matsui SM, Omary MB (1999)** Non-invasive transgenic mouse genotyping using stool analysis. FEBS Letters 462, 159–60
8. **Erin L. Symonds.** Fecal DNA Genotyping: A Non-invasive Approach to Characterize Mouse Models for Nutrigenomics Cancer Chemoprevention Studies Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine, 2013, 11, 12-21 Feature Article
9. **Schmitteckert EM, Prokop CM, Hedrich HJ (1999)** DNA detection in hair of transgenic mice—a simple technique minimizing the distress on the animals. Laboratory Animals 33, 385

Bijlage 1 enquête 2015

At the request of the Dutch Ministry of Economic Affairs, The Netherlands Institute of Health Research and Development (ZonMw), researches the current development of innovative methods to identify and/or genotype rodents for animal experimentation. Currently, toe clipping and ear punching are generally used for both genotyping and identification of the rodents. Besides these two, a variety of different methods can be used for either identification (e.g. tattoo, chip) or genotyping (e.g. tail clip)

With your help in completing this survey, ZonMw attempts to estimate whether other innovative methods for identification and/or genotyping are presently available or in development. Furthermore, we are very interested in whether these methods -in time- have the potential for implementation on a broad scale and in what the requirements are to achieve that goal.

The survey can be found below.

Survey

Identification of rodents

1. Which method(s) do you use or are used by your institute to identify rodents? Please specify whether this method is used for mice, rats or other rodents and the age of these animals.

2. In your opinion, what are the most significant advantages and disadvantages of these methods?

If you described the toe clip and/or ear-punching technique as the only method for identification, please continue with question 4.

3. If you described an alternative method to toe clipping or ear punching for identification, please indicate to what extent this method causes pain and/or discomfort in practice? Is the pain in your opinion severe, moderate or light and/or how would you describe the discomfort (e.g. stress)?

Genotyping of rodents

4. With what genotyping method(s) are you familiar other than ear punching, toe clipping and tail clipping? Please specify whether this method is used for mice, rats or other rodents and the age of these animals.

If you are not familiar with other genotyping methods, please continue with question 14.

5. Are the method(s) as described in question 4 published? If so, we would appreciate receiving a reference or the article if possible.

6. If you described an alternative method to toe clipping, ear punching or tail clipping for genotyping, please indicate to what extent this alternative method causes pain and/or discomfort? Is the pain in your opinion severe, moderate or light and/or how would you describe the discomfort (e.g. stress)?

7. Are the method(s) as described in question 4 already in use (small or large scale) or are they still being developed?

8. If these method(s) are not yet applicable on a broad/broader scale, what is preventing a broad implementation?

9. Do you expect that this/these method(s) will become implemented in less than 5 years, between 5 - 10 years or later than 10 years from now? Can you describe why this period of time is anticipated?

10. If extra funding would be available, would this accelerate the development and implementation of the method (methods)?

11. Are you aware of any other requirements that are needed to achieve a broad implementation of this method?

12. Could this method, in time, replace toe clipping, ear punching or tail clipping for genotyping rodents?

13. If extra funding would become available to develop the method for broad implementation, what amount would be needed? Can you specify, in general terms, what this amount is based on?

14. If you know of any person who has knowledge on identification and/or genotyping of rodents among your acquaintances, we would appreciate you forwarding this e-mail to your contacts. Alternatively, you can provide us with the names and e-mail addresses, so we can invite your contacts personally.

Thank you very much for your contribution. All the information you provide us is treated as strictly *confidential* and will not be provided to other parties.

Bijlage 2 enquête IVD's mei/juni 2016

In opdracht van het Ministerie van Economische Zaken, voert ZonMw een inventarisatie uit naar het gebruik van de teenkootknip en eventuele beschikbare alternatieve methoden. Dit naar aanleiding van vragen tijdens o.a. het AO van december 2014. Zoals u misschien weet heeft ZonMw vorig jaar o.a. een enquête uitgestuurd ten aanzien van de huidige gangbare karakteriserings- en identificatie methoden bij knaagdieren en eventuele alternatieve methoden (swaps, tatoeage, oorknip/punctie/wig). Helaas was de response op de enquête laag. Om de inventarisatie zo compleet mogelijk te krijgen en de verschillende ervaringen zo breed mogelijk mee te kunnen nemen, hopen wij dat u de volgende vragen uiterlijk dinsdag 31 mei zou willen beantwoorden:

1. Wordt binnen uw instituut de teenkootknip toegepast? Zo nee, beantwoord dan deze vraag met een toelichting en ga door naar vraag 4.

a. Zo ja, wat is een reële schatting van het aantal en de leeftijd van de dieren waarbij deze methode wordt toegepast (over de afgelopen 2 jaar)?

b. Om welk percentage van de in totaal te karakteriseren en te identificeren knaagdieren gaat dit ongeveer?

c. Wordt de teenkootknip ook wel alleen voor identificatie toegepast?

d. Zo ja, wat is een reële schatting van deze aantallen en de leeftijd van de dieren over de afgelopen 2 jaar?

2. Is de oorpunctie/wig/knip een methode die de teenkootknip geheel of deels zou kunnen vervangen?

a. Zo ja, graag een toelichting welk percentage van de teenkootknip zou kunnen worden vervangen?

. Heeft u suggesties voor gebruik van een andere methode of combinatie van methodes? Graag een toelichting ten aanzien van de voor- en nadelen.

3. Kunt u nader toelichten bij welke specifieke toepassing(en)/vraagstelling(en) er naar uw mening geen vervangende methode(n) beschikbaar is/zijn?

a. Kunt u ook aangeven om welke aantallen en leeftijd van de dieren (over 2 jaar bezien) dit gaat?

4. Is er behoefte vanuit het veld om een soort 'code of conduct' op te stellen om een beter overzicht te krijgen van de verschillende mogelijkheden van karakterisering en identificatie en de bijbehorende voor- en nadelen afhankelijk van de vraagstelling?

a. Hoe staat u tegenover de invoering van een 'nee, tenzij' benadering? Het beargumenteerd toepassen van de teenkootknip zou dan alleen met formele toestemming (bijv. van de CCD) mogelijk zijn.

Bijlagen

- FELASA richtlijnen zie bijgevoegde pdfs
- Nederlandse samenvatting systematisch literatuuronderzoek pdf
- Norecopa-toeclip pdf

Working Party Report

Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification

K Dahlborn¹, P Bugnon², T Nevalainen³, M Raspa⁴, P Verboost⁵ and E Spangenberg⁶

¹Department of Anatomy, Physiology and Biochemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7011, SE-75007 Uppsala, Sweden; ²Institute for Laboratory Animal Science, University Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH 8057 Zürich, Switzerland; ³Hevossaarentie 21, 37800 Akaa, Finland; ⁴Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), European Mouse Mutant Archive (EMMA), Campus "Adriano Buzzati-Traverso", Via E. Ramarini 32, I-00015 Monterotondo Scalo (Roma), Italy; ⁵UMCN, University of Nijmegen, Geert Grooteplein Zuid 10, 6526 GA, Nijmegen, the Netherlands; ⁶Department of Animal Environment and Health, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7068, SE-75007 Uppsala, Sweden
Corresponding author: K Dahlborn, Department of Anatomy, Physiology and Biochemistry, Box 7011, SLU, SE-75007 Uppsala, Sweden.
Email: kristina.dahlborn@slu.se

Abstract

The primary aim of this report is to assist scientists in selecting more reliable/suitable identification (ID) methods for their studies. This is especially true for genetically altered (GA) animals where individual identification is strictly necessary to link samples, research design and genotype. The aim of this Federation of European Laboratory Animal Science Associations working group was to provide an update of the methods used to identify rodents in different situations and to assess their implications for animal welfare. ID procedures are an indispensable prerequisite for conducting good science but the degree of invasiveness differs between the different methods; therefore, one needs to make a good ethical evaluation of the method chosen. Based on the scientific literature the advantages and disadvantages of various methods have been presented comprehensively and this report is intended as a practical guide for researchers. New upcoming methods have been included next to the traditional techniques. Ideally, an ID method should provide reliable identification, be technically easy to apply and not inflict adverse effects on animals while taking into account the type of research. There is no gold standard method because each situation is unique; however, more studies are needed to better evaluate ID systems and the desirable introduction of new and modern approaches will need to be assessed by detailed scientific evaluation.

Keywords: Animal welfare, biopsy, refinement, rodent identification, toe clipping

Laboratory Animals 2013; 47: 2–11. DOI: 10.1177/002367712473290

Rodent identification and animal welfare

The aim of this Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group was to identify best practices for rodent identification in different situations and assess their implications for animal welfare. In general, the new EU Directive does not apply to practices undertaken for the primary purpose of identification of an animal (2010/63/EU). This means that it is left to the national authorities to decide what methods are acceptable or not. The overall aim of this report is to assist scientists in choosing the best identification method for their studies, and to enlighten legislators in the decision-making process.

Early individual identification is a prerequisite for valid and reliable research using animals; this is especially true in the case of genetically altered (GA) animals. Identification is necessary to link samples, research data

and genotype to the individual animal. Loss of identification can render the animal unusable for further breeding and research. Data can also become unusable, which can result in compensatory use of additional animals. Reliable identification is therefore a prerequisite for good science and has important Reduction aspects. Although, identification methods are considered routine procedures, there is often a lack of scientific evidence related to their impacts on animal welfare and research outcome. Therefore, this report is based on best practice and, when available, on the scientific literature.

A wide variety of identification (ID) methods are used, each with different implications on animal welfare. Concomitantly, new and improved methods are being developed. The method of choice generally depends on tradition, study-based reasons and costs. A survey was performed in 2007 on the web-based forum Comparative

Medicine list (COMP MED), and it showed that the most commonly used methods are ear notching/clipping and ear tagging, both in the USA/Canada (ear notch/clip; 10 out of 23 answers, ear tag 11 out of 23) and in Europe (ear notch/clip; 10 out of 19 answers, ear tag 4 out of 19).¹ The least widely used methods were toe clipping and ear tattooing.

All identification methods are brief procedures, involving restraining the animals and result in some degree of discomfort and/or pain. Since these procedures are carried out on a vast number of animals, even minor improvements for the individual animal can lead to a considerable overall Refinement effect. A more expanded version, with practical details on how to perform different methods, will be published on the FELASA homepage.

Animal welfare is generally assessed with a combination of physiological and behavioural parameters. There are reliable parameters to be used for assessment of both acute and chronic effects on animal welfare. However, the identification procedure is often the first restraint to which animals will have been subjected, e.g. at weaning or even before, and therefore the assessment of acute effects of the identification procedure can be difficult to distinguish from the effects of the handling and/or restraint itself.^{2,3} Reported long-term negative consequences of identification are increased mortality, systemic diseases, tissue irritation or damage, inflammation and tumours.⁴⁻⁷ Therefore, a valid assessment of a specific identification method should include both immediate and chronic effects associated with the procedure. In addition, the ease with which the procedure can be performed, as well as the readability and sustainability of the marking over time, should be taken into account when evaluating the different methods. If genotyping is necessary, it can be considered as a true Refinement if the chosen identification method also generates a tissue sample, thus avoiding repeated (invasive) procedures on the same animal.

Acute effects are not only an animal welfare concern, but also a research quality concern. Invasive identification methods necessitate a recovery period before the animals can be used in the study. For example, the expected outcomes of tattooing are oedema and bleeding through puncture holes made by the tattooing instrument. This will temporarily affect the animals' physiology and behaviour which in turn may affect specific experimental parameters.

Analgesia and anaesthesia can be useful because they shorten the recovery period after invasive and painful procedures, e.g. surgery. The small size of the body parts used for identification makes it very difficult to apply local analgesics/anaesthetics. Inhalation anaesthesia must be considered in order to alleviate acute pain during the identification procedure. To eliminate postoperative pain, inhalation anaesthesia must be combined with analgesia. More studies are required to assess if the methodology could be refined to such a level that it would really alleviate the stress to which the animals are subjected during and after the identification procedure. In addition, the success of any method depends on the training and manual skills of the person performing the procedure and care of the instruments used.

In this report, the identification methods are grouped according to whether or not they are

- (1) Permanent
- (2) Invasive
- (3) Generating tissue sample for genotyping.

Rodents are the largest group of mammalian species used in research and testing in the European Union (95%).⁸ Therefore, the methods described here focus on rats and mice. However, most methods are also applicable to guinea pigs, hamsters, gerbils and chinchillas.

Non-invasive temporary identification methods

Shaving or cutting the fur

Cutting the fur is one of the simplest methods for identifying laboratory rodents. An area on the body, mainly on the back (for visibility without handling), is cut or shaved. The most evident advantages are the ease of application and reading, along with the low cost. On the other hand, this type of ID can only be used to distinguish a limited number of animals.

The only necessary equipment is a fur shaving machine or a pair of scissors. The ease of reading the marking depends on the growth of the fur and the length of hairs that are removed. This method can be used after approximately two weeks of age, when pups have acquired a full coat of fur. The stress associated with this identification method mainly stems from the restraint of the animal. If properly performed, the procedure should not cause any pain to the animal.

Felt tip marker or alcohol-based pens for skin marking and coat dyeing

If one uses a felt-tip pen or similar markers, it is possible to identify mice or rats by writing marks or numbers on hairless parts of the body, e.g. ears and tail, but also on the skin (back skin, belly, limbs, armpits), especially in neonates or hairless mutants. The numbering or coding options can be increased by using different colours. The method is applicable to all ages, including neonates.

Commonly used dyes for colouring the fur are human hair colours or marking sprays meant for farm animals, but also a felt-tip pen can be used. Fur colouring is not suitable for a large number of animals. The marks are readable from a distance and without handling the animal. However, if neonates are marked on the armpits, handling is necessary in order to identify the animal. Coat dyeing is applicable as soon as the animals have fur, i.e. after approximately two weeks of age. Both skin marking and coat dyeing as such are painless but require restraint for application and renewing which can cause a temporary stress in the animal. This increased handling can also have positive effects.⁹ These are low-cost but time-consuming methods, permitting identification of a limited number of animals only.

One major problem when using dyes or discolouring substances is their potential toxicity or untoward chemical

burden. These substances can enter the body by ingestion (e.g. grooming) or by diffusion through the skin which can lead to interference with research results.

Invasive temporary identification methods

Subcutaneous injection of ink

The subcutaneous injection of ink differs from tattooing because the ink is injected under the skin instead of into the skin layers. Like all subcutaneous depots of substances, ink also fades after some time (a few hours to a few days). The method provides limited numbering possibilities, although this can be increased by using different colours.

This procedure has two painful components; the insertion of the needle through the skin and thereafter the irritation due to the substance and/or the expansion of a body part as a result of the volume injected. In order to reduce the pain one should avoid using toxic or irritant substances. The footpad or the tail is the most common sites of injection. Leclercq and Rozenfeld reported a local swelling after footpad injection which may have been associated with pain.¹⁰ This procedure requires restraining the animal and training the personnel. Handling is necessary to read markings on the tail and restraint is necessary to read the markings on the footpads.

This method can be used in animals of all ages, including newborns. It does however have a limited use since it only lasts for a short time (days at best). The Working Group does not recommend using this method since it is invasive and painful and only temporary.

Ear tag

Ear tags are available in metal or plastic; these are applied to the ear with special pliers. Tags are available in different sizes, to be used on different species, are pre-numbered and thus allow identification of a very large number of animals.



Figure 1 Tag placed correctly on the lower edge of the pinna



Figure 2 Tag placed in the upper edge of the pinna (incorrect)

The pliers are loaded with a tag and placed in the visible ear (*pinna*). Tags should be placed on the lower edge of the pinna so that they do not bend it (Figure 1). Ears should be checked regularly and in cases of tissue damage or inflammation, the tags need to be removed. Restraint is necessary for proper attachment of the tag and for its subsequent reading when identifying the animal.

This ID method is inexpensive and quick and easy to perform. There is some risk that the animal will lose the tag. The pinna is not developed before two weeks of age and to ensure that the ear is big enough to hold the tag, one needs to wait until weaning. Furthermore, in experiments using magnetic resonance imaging (MRI) systems, the metal tags will need to be removed because they will interfere with the magnetic field. The method is painful and requires proper restraining of the animals and therefore they will temporarily suffer for a brief period from a combination of pain and discomfort.

How the tag is placed in the pinna is important, with placement in the lower edge being recommended (Figure 1).¹¹ If the tag is placed on the dorsal side of the pinna, the ear might fold (Figure 2) and this could cause irritation and suffering to the animal.

Metal ear tags (commonly made from a nickel-copper alloy) have been associated with inflammatory and proliferative reactions and neoplasia in mice and rats following months of carrying the tags.^{6,7} Similarly, a remarkably high incidence (8.8%) of squamous cell carcinomas has been reported.⁴ The appearance of auricular chondritis, in C57BL/6 mice, was claimed to be an autoimmune response to reactive compounds released from the metal tag.¹² In that study, tagged ears contained higher levels of copper and cytokines, compared with non-tagged ears. When different tags were compared in guinea pigs, the loss of tags decreased from 45% for metal tags down to 10% with nylon tags.¹³ Hence, the risk of irritation and inflammation

seems to be related to the metal in the tags and to the duration for which the animals have to carry them.

Invasive permanent identification methods that do not yield a tissue sample for DNA analyses

Tattoo methods

Several body parts can be used for tattoo identification in rodents, e.g. ears, tail, footpads or toes. The procedure includes penetration of the skin with specific instruments in order to load tattoo ink or paste intradermally. The sensitivity of the body part where the marking is being applied will vary, and this has consequences on the extent of the pain sensation experienced by the animal in connection to the procedure.¹⁴

The ink must be loaded in the dermis, under the epidermis (the upper layer of the skin) to create a permanent marking. Hence, the skin barrier is disrupted and chemical compounds in the ink can spread via the circulation to the entire body. This poses two types of hazards: those associated with toxicity and those that may interfere with the study. Tattooing needles should always be clean (aseptic), kept sharp and replaced on a regular basis. Tattoo pigments are usually minerals, organic (industrial) or plastic-based pigments. Substances that are toxic or which may interfere with research results should not be used. In MRI studies, there is a specific problem with some tattoo inks.

Tattooing is a permanent method, but the ink may fade and become illegible with time. The number of possible unique identification marks possible varies depending on which method is used, but it can generally be increased by using different colours or by combining different locations. In general, tattooing procedures require training before they can be performed properly.

Ear tattoo

This method requires fully developed ears and a good restraint that fixes the head of the animal is necessary to avoid lateral movement and unnecessary tissue damage during the application. Restraint may be needed to read the tattoo.

One of the two methods for tattooing rodent ears is to use tailor made instruments, typically pliers with revolving heads. The second method available for tattooing rodent ears is the microtattoo system. This involves a pair of forceps with a disposable hypodermic needle on one side and a container with ink paste on the other, and the procedure is monitored through a magnifying glass (Figure 3). The identification consists of combinations of dots which allow for creation of a large numbering system. Generally, only handling is needed to read the ear tattoo.

Ears are considered to be very sensitive organs,¹⁴ and hence tattooing must be considered to be at least moderately painful. Adult rats, instrumented with telemetric cardiovascular transmitters, were marked with three different



Figure 3 Identification in ear with microtattoo equipment (photograph by Richard and Anne Boutet, Québec, Canada; reproduced with permission)

methods; ear tattoo, ear notching and micro (toe) tattoo, using a crossover design. During the 1–4 h period and the following dark period, the mean arterial pressure was highest in the ear notching group indicating that the pain evoked was still present during 1–16 h after the marking procedure.¹⁵

Tail tattoo

Tattooing on the tail can be performed in two different ways: the microtattoo system or the electric tattoo equipment (similar to that used in humans). Tail tattooing with the microtattoo system should only be applied in young animals before the ossification of the tail (tail ossification occurs between 2 and 3 weeks of age)¹⁶ since it is inserted completely through the tail. Tail tattooing with an electric machine can be performed on adult mice, and rats of all ages if one wishes to write digits or letters. It can also be used in young mice to imprint dots or stripes on the tail. First the ink is applied on the skin and the tattoo needles transfer the ink into the skin layers and the remaining ink is then removed. This method allows for an infinite amount of numbers but needs some prior training in order to apply readable digits/letters. An alternative to the electric tattoo machine is the use of a lancet. It is done manually and produces only coloured dots, which results in a limited amount of numbers. As for the other tattoo methods, good restraint is necessary when tattooing the tail. In general, only handling is necessary to read the tattoo.

The pain, the necessity to restrain and the long duration of the tattooing procedure with the electric tattoo machine (noise, vibrations) cause discomfort to the animals. The manual method using the lancet also causes pain, the extent of which will obviously depend on the skill of the person performing the procedure.

Guillod and Johnson (1990)¹⁷ found that ink tail tattoos caused mild fibrosis in tattooed areas and uptake of ink in regional lymph nodes, but no effects of tail tattooing on food consumption in a long-term study in adult rats. As a result of licking the tattoo, Sørensen *et al.*¹⁸ found ink



Figure 4 Site of insertion (gray circle) of the needle (microtattoo) for toe marking

colour in the faeces of 20-day-old mouse pups after tail tattooing.

Toe tattoo or footpad tattoo

The microtattoo system can also be used to mark a toe or footpad by inserting the needle through the skin of these extremities. The needle should not be inserted through the whole toe or foot, only the pads are marked.

An important advantage of this method is the possibility to identify animals of all ages. Even when the toes of newborns are not yet separated, it is possible to perform toe tattooing. The microtattoo is inserted through the toe pad (Figure 4) or through the footpad.

A lancet can also be used to mark the pads of the toes or of the foot, employing the same method for tail tattoos and a lancet.

All toe or footpad tattoo methods described are considered to be painful, but the use of the microtattoo can be considered as acceptable because the needle used can be adapted to the size of the animal.

Microchip transponder

Electronic radio frequency ID transponders, commonly called microchips, are an effective way to identify laboratory animals. A microchip is inserted subcutaneously, in order for the animal to be identified with a transponder reader. The transponder responds to a low-energy radio signal emitted by a compatible reader, which displays the information (number) from the transponder. The microchip is implanted in the neck or further back, via a special syringe. The microchip system is a permanent ID method and allows for identification of an infinite number of animals.

Most readers can be connected to a computer which make it possible to collect a variety of data from a specific animal and transfer these directly to databases. Although the application is initially time consuming, the microchip has the advantage over other methods in that identification errors (except for incidental chip loss) are excluded. While it is



Figure 5 Size of microchips suited to mice (1×6 mm) and rats (2×12 mm) (top picture) and the size of the needles (12G, to the left and 18G, to the right) in relation to a fully grown C57BL mouse (bottom picture)

true that microchips can disappear, relocate or break, this risk appears to be relatively low. Rao and Edmondson (1990)¹⁹ monitored 140 implanted mice for two years and found that 2% of the mice lost their chips, and 2.8% of the chips failed to transmit data.

The suitable time for microchip insertion depends on the size and body weight of the animal rather than age. The larger chip (12×2 mm) (Figure 5, top picture) is most suitable for animals ≥ 50 g and should not be used before adulthood in mice – if at all. The smaller chips (6×1 mm) are more suitable for mice (Figure 5, top picture). The manufacturer of the smallest microchip (6×1 mm) claims that it can be used in mice from five days of age, but according to Castelhamo-Carlos *et al.*,²⁰ this is not recommended. Inhalation-anaesthesia is appropriate for the microchip implantation in all rodents.²¹ It is recommended to close the wound, after insertion.

For proper application and correct positioning of the chip, some training is recommended. In general, handling, but not restraint, of the animal is sufficient to read the ID. For the small microchips, the reading distance is very short and thus it is necessary to touch the animal with the reader to collect the signal.

A recent study on five-day-old mouse pups showed that microchip (size 6×1 mm) injection resulted in a stronger reaction (sudden movements, urination and vocalization), compared with distal phalanx removal or toe tattooing performed at the same age.²⁰ None of the methods exhibited any postnatal effects. The authors recommended the use of toe clipping in young pups and microchips only after weaning.

In the long-term microchips can cause inflammation and fibrous tissue growth. Since they are implanted via injection, this is a procedure known to increase tumour risk. A causal link between microchips and cancer has been postulated to exist in rats and mice. Five out of eight articles reported that 0.8–4.1% of laboratory mice and rats developed malignant tumours around or adjacent to the implanted microchips.²² In one of these eight studies, the investigators used a genetically modified line (p53+/- mice) that was prone to develop cancer, and 10.2% of the mice developed tumours⁵ and in several cases these tumours also metastasized. The tumours generally occurred in the second year of the studies, in middle aged or older animals. However, in the Blanchard study, the heterozygous p53+/- mice developed fast-growing cancers before six months of age.⁵ Taken together, microchip implantation appears to increase the risk of developing tumours. This is important to bear in mind when undertaking long-duration cancer research studies in rats or mice. One needs to consider also whether a foreign body like a microchip can affect immunological and skin studies (because of inflammation) or disturb image analysing techniques.

This is likely to be the most expensive identification method (costs for reader and transponders), and anaesthesia equipment may be necessary as well. Finally, the different types of transponders often transmit at different wavelengths and thus require different readers. This may need to be considered before transporting chipped animals between laboratories.

Invasive permanent methods of identification yielding tissue for DNA analyses

Ear notching

Ear notching as an identification method is generally considered to be easy to carry out and read and the necessary trauma to the animal is minimal in a properly executed procedure. The procedure can be applied on mice and rats. Punching or 'notching' holes in the ears requires a specific instrument. The choice of puncher is extremely important; there are punchers (mostly cheap ones), which pinch rather than cut and they should not be used.

The location of the holes must be accurate and done according to a chart/system in order to ensure a valid identification. The withdrawn tissue remnant(s) can be used for genotyping. The punchers must be completely cleaned between animals to avoid any DNA cross-contamination. The marking can be read from a distance but it may be necessary to pick up the animal from the cage. Metal ear punchers allow identification of the laboratory rodents by notching one or several holes in the pinna of the ear, at the edges of the pinna and/or in the middle. The numbering system of ear notching/punching allows identification of maximally a few hundred animals.²³

In general, this can be considered a permanent method but there have been reports that the pinna can heal after several months depending on the size of the hole. Ear notching is painful and requires proper restraint of the animals

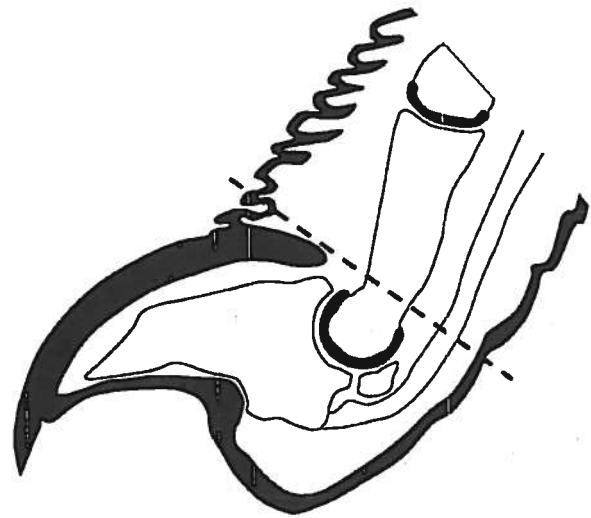


Figure 6 Schematic picture of the site of distal phalanx removal

and therefore they will briefly suffer from a combination of pain and discomfort. In order to read the ID it is necessary to pick up the animal, but generally restraint will not be needed. Training is required to learn the proper notching technique.

Cinelli *et al.* (2007)³ showed that different methods for biopsy collection in mice (tail biopsy, ear punch, mouth swab, rectum swab, hair collection) had the same effects on telemetrically recorded heart rate, motor activity and core body temperature as restraint alone. These parameters returned to normal levels one hour after the biopsy collection. In rats, during the first hour after the marking procedure, ear notching resulted in a higher blood pressure and heart rate responses than toe tattoo, which may simply be due to the fact that less restraint was needed for the latter procedure.¹⁵ Using ultrasonic vocalization as a measure of pain, there was no difference in the response to ear notching and tail snip in mice.²⁴

Distal phalanx removal

In distal phalanx removal, the entire distal phalanx of a toe is removed with sharp scissors from mouse pups around seven days of age. The cut is placed at the very distal part of the second phalanx (Figure 6) to remove the entire nail bed. In adult animals the identification is detected as a missing nail or tip of a toe on a paw. The method has been used in rats but is not recommended due to its long-term effects, e.g. impaired grip strength at weaning.²⁵ Therefore, the method will only be described for mice in this report. A similar, non-refined method generally known as 'toe clipping', where a larger part of the toe is removed, is sometimes used (because it makes the identification easier). However, the use of this non-refined method is strongly discouraged by the Working Group. National legislation within some European countries may actually prohibit the use of this method.

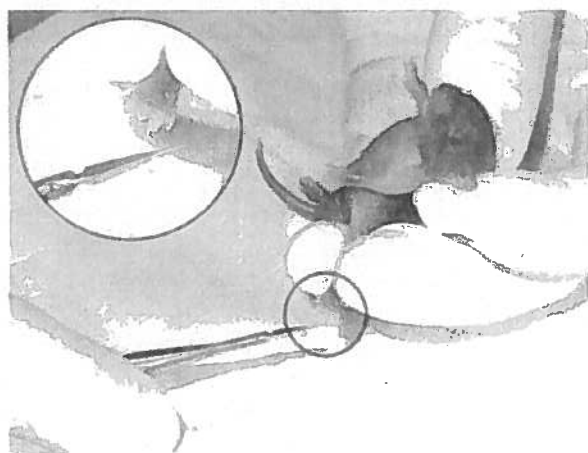


Figure 7 Restraining and cutting of the distal phalanx of a seven-day-old mouse pup (photograph by Dagmar Schaefer, Zürich, reproduced with permission)

The young pups are picked up and held by the nape of the neck in very much the same manner as the mother carries the pups. In addition, it is necessary to restrain the leg (Figure 7) to avoid sudden movements that might result in an incorrect cut. The scissors are opened and placed against the toe from below, in order to make it easier to see and cut the correct amount, which is 2–3 mm in a seven-day old pup (D Schaefer, personal communication). The removed phalanx biopsy can be used for DNA analysis (enough tissue for polymerase chain reaction).

The scissors used for this procedure should be small and sharp, e.g. ocular microsurgical scissors (Figure 7). The Working Group recommends a maximum of one toe per paw, i.e. four toes per animal, to be cut. However, since pups are marked while still in their native litter, males and females within the same litter can be given the same identification since they can be distinguished by sex. This can reduce the number of digits that need to be removed. The reading of the marking (a missing nail or tip of a toe on a paw) requires that the animal is picked up from the cage and held on a surface, such as the arm, to examine the paws. Sometimes restraint may be necessary.

This is a permanent method, if performed correctly, and it will not become illegible over time, which is a risk with some other permanent methods (e.g. tattooing and ear notching). The distal phalanx removal should only be performed on very young animals, Schaefer *et al.* (2010)²⁶ found that phalanx removal at day 7 was preferred over day 3 because at the younger age it was difficult to cut the correct amount since the toes were so small. Castelhana-Carlos *et al.*²⁰ successfully performed distal phalanx removal at five days of age and Spangenberg *et al.*¹¹ at six days of age. Already at 12 days of age the pups are very active and it becomes difficult to perform the phalanx removal with precision. An incomplete removal of the distal phalanx can lead to the regrowth of

the digit.^{27–30} It seems to be important to remove the entire nail bed to avoid regrowth. By around day 18, the phalanges have become ossified³¹ which would make the procedure significantly more painful. Hence, the current knowledge shows that the age of 5–7 days (counting the day of birth as day 0) is a preferable time frame for removing phalanges for identification and genotyping of mice. There is no scientific support for successfully, and without inflicting more pain, performing the phalanx removal at later ages.

If the phalanx is removed correctly, the young pups display little or no reaction; mainly paw withdrawal, during or after the procedure.^{20,26} The restraint mimics the mother's handling of the pups and might therefore be less stressful than the common techniques of restraining adult animals. There is usually a drop of blood on the cut tip but no further bleeding.²⁶ If further bleeding should occur, it can be stopped with a styptic or a haemostatic pencil. Schaefer *et al.*²⁶ found no effect of phalanx removal on grip strength nor did it cause hyperalgesia (tested at 12 weeks of age) when phalanges had been removed on day 7, but grip strength was impaired when the phalanges were removed on day 3. It is likely that too much of the toe was cut on day 3 due to the small size.²⁶ No effects on climbing abilities at weaning,¹¹ or as adults,²⁰ were found in mice with distal phalanx removal.

Today this method is in fact the only permanent identification of a pup with a simultaneous tissue sampling for genotyping. Because of the early genotyping, a rapid and early selection of animals needed for studies or further breeding is possible which eliminates the costs of housing redundant animals. The recommendation of the Working Group is to use this method only in combination with genotyping and exclusively for young pups. Other methods are options only for marking to only mark young animals when no biopsy is needed.

New methods

The first method described below has recently become commercially available (2010) and is a modification of the classical ear tag. The second method is also commercial available. The final two methods described use completely new approaches to identifying rodents. However, they are not yet commercially available.

Mini-ID Ear tags (<http://www.zonotid.com/>)

A recent alternative to traditional ear tags is a lightweight plastic tag (0.07 g) that has a 2D barcode etched onto a titanium plate attached to the plastic tag. It is read using a barcode reader similar to the microchips. Its application to the pinna is similar to that done with the traditional tags. This tag type is lighter and should therefore reduce the risks of infections or inflammation in the ear caused by irritation from a heavy tag. It does not have the loop shape of a metal ear tag which minimizes the risk of it becoming entangled. Further, the plastic material reduces the risk of an allergic reaction to the tag. Like other ear tags, this

Table 1 Overview of available identification methods for rodents; issues related to both techniques and the animals

Identification method	Concerning the technique							Concerning the animal	
	Permanent/ Temporary	Specific skills/ training	Number of codes	Age for application (from)	Anaesthesia*	Aseptic measures†	Sample for DNA	Pain/ Discomfort at application	Handling/ restraint at reading
Shaving/cutting the fur	T	No	5	2 weeks	No	No	No	D	None
Skin marking	T	No	10/colour	All	No	No	No	D	None/H
Coat dyeing	T	No	5/colour	2 weeks	No	No	No	D	None
Subcutaneous ink injections	T	Yes	~8/colour	All	No	Yes	No	P	H/R
Ear tag	T	Yes	Infinite	Weaning	No	Preferable	No	P	R
Ear tattoo	P	Yes	Hundreds	Weaning	No	Yes	No	P	H/R
Tail tattoo	P	Yes	Hundreds	Weaning	No	Yes	No	P	H
Tail microtattoo	P	Yes	Infinite	~2 weeks	No	Yes	No	P	H
Toe/foot pad tattoo	P	Yes	Hundreds	All	No	Yes	No	P	R
Microchip transponder	P	Yes	Infinite	Depends on body size	Yes	Yes	No	P	H/R
Ear notching/ punching	P/T	Yes	Hundreds	2 weeks	No	Preferable	Yes	P	H
Distal phalange removal	P	Yes	Hundreds	4–8 days	No	Preferable	Yes	P	H

For detailed information see corresponding section in the report

The first three methods mentioned in the table are non-invasive

*Analgesia explained in welfare paragraph

†Depending on body part, see tattoo paragraph

method can be used from weaning and allows identification of an infinite number of animals. Other types of ear tags are also becoming available on the market.

Microtransponder p-Chip

This is a new method with a radiofrequency identification tagging that uses 500- μ m, light-activated microtransponders implanted subcutaneously into the ear or tail of mice. According to Gruda *et al.* (2010)³² the preferred location for implanting is in the side of the tail, because implantation at this site was reported to be simple to perform and was associated with shorter implantation times and a higher success rate compared with the ear. They claim that the main benefits of using light-activated microtransponders over other identification methods are their small size which minimizes stress to the animals during implantation.

A biometric approach to laboratory rodent identification

This new technique uses the blood vessel pattern of the pinna of an animal as biometric identification. Each animal has an individual blood vessel pattern, like a fingerprint. Images of the ears of all animals that are to be identified are taken. Later when an animal has to be identified, a new picture is taken of the ear and this is compared with the information stored in the database to identify that individual.³³ It can likely be used from weaning, when the ears are large enough. Since the blood vessel patterns are unique for each individual, this technique should allow identification of an infinite number of animals.

Luminescent Micro Tattooing LMT

With this method, very small luminescent pigments are applied to the skin of the animal, such as on the tail base or the ear, in the form of dot writing (like Braille). It is called 'Luminescent Micro Tattooing LMT'. It applies the code by means of micro-needle arrays coded with pigments for one-time use. Each array represents exactly one code, as in Braille. The code is applied simply by putting manual pressure on all needles. The needles penetrate the skin of the animal, but only certain needles contain pigment, thus producing the code on the skin of the animal. The dot writing (data matrix code) can be read and decoded in a scanner.

Conclusions and recommendations

The working group strongly believes that it is important that the choice of identification method is based on scientific evidence rather than personal opinions and local traditions. Undoubtedly, more studies are needed to thoroughly evaluate identification methods and the introduction of a new method should be preceded by detailed scientific evaluation.

According to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) 'toe clipping as a method of identification should be used only when no other individual identification method is feasible and should be performed only on altricial neonates'.³⁴ When the Working group of Rodent identification began its work, distal phalanx removal was identified as a method with potential problems and therefore recommended as an area for further research.

Spangenberg *et al.*¹¹ initiated and performed one study and the study by Castelhana-Carlos *et al.*²⁰ was also performed after contact with members of the working group. In addition a third study has recently been published.²⁶ In summary, these recent studies have demonstrated that distal phalanx removal does not have any negative effects on growth and physical and behavioural development in young mouse pups.^{11,20,26}

General recommendations:

- The ideal identification method should provide reliable individual identification, have no adverse effects on the animal or the animal model and be technically easy to apply;
- The choice of method depends on the age and size of the animal, whether or not a tissue sample is necessary, whether every animal needs a unique number, the duration of the study and whether the identification method can interfere with the research results or their interpretation;
- We recommend that proven permanent methods should be used for long-term identification and non-invasive temporary methods should be used when appropriate;
- Key points to consider while choosing an ID-method are summarized in Table 1.

If unique numbers are needed for every animal, tail tattooing, (non-metal) ear tags or microchips are the only methods possible. For long-term studies (> 3 months), tail tattooing is the safest method of these, since ear tags may be lost and microchips might induce tumours. Metal ear tags are the worst choice of an ID method because of the associated pain and distress as well as the risk of ear infections, tumours and allergic reactions. Moreover, subcutaneous ink injection is an invasive, painful but non-permanent method and is therefore not recommended as a method of identification.

All the new methods have advantages in terms of animal welfare and are recommended although their availability (and applicability) may still be limited. It is hoped that scientific studies will be conducted comparing these new methods with the most commonly used methods available today. So far, the microchip is the only method available supporting 'online' data transfer to a computer. It is notable that all four new identification methods described do provide a computer ID as well.

An important area for future research is the use of analgesia/anaesthesia during and after identification procedures. Inhalation anaesthesia does not in general alleviate post-operative pain. Therefore a special treatment for pain alleviation should be combined with this anaesthetic method. However, long-term pain is likely to have a more adverse effect on animal welfare than any acute pain experienced during and identification procedure. Local analgesia could be applied but this need to be administered in advance before it will have any effect. However, the body parts where it needs to be applied are very small and the animals can lick off any ointment used. Sometimes anaesthetics are aversive, which means that the degree of aversion from the anaesthetic could actually be greater than the

transient pain of, e.g. ear notching (P Flecknell, personal communication). In addition, the restraining necessary for performing identification procedures has been shown to be as aversive to the animals as the identification procedure itself.³

In summary, the choice of identification method should be determined so as to minimize the adverse effects on the animals, while at the same time taking into consideration the type of research to which the animals will be subjected. There is no gold standard method because each situation is different (see above). Here too, good science and animal welfare go hand in hand.

REFERENCES

- 1 Dahlborn K. *Animal Identification for Rodents*. Proceedings of the 37th Scand-LAS Symposium. Tromsø, Norway, 2007s:84
- 2 Baturaitė Z, Voipio H, Ruksenas O, *et al.* Comparison of and habituation to four common methods of handling and lifting of rats with cardiovascular telemetry. *Scand J Lab Anim Sci* 2005;32:137–48
- 3 Cinelli P, Rettich A, Seifert B, *et al.* Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Lab Anim* 2007;41:174–84
- 4 Baron BW, Langan C, Huo D, *et al.* Squamous cell carcinomas of the skin at ear tag sites in aged FVB/N mice. *Comp Med* 2005;35:231–5
- 5 Blanchard KT, Barthel C, French JE, *et al.* Transponder-induced sarcoma in the heterozygous p53+/- mouse. *Toxicol Pathol* 1999;27:519–27
- 6 Cover CE, Keenan CM, Bettinger GE. Ear tag induced *Staphylococcus* infection in mice. *Lab Anim* 1989;23:229–33
- 7 Waalkes MP, Rehm S, Kasprzak KS, *et al.* Inflammatory, proliferative, and neoplastic lesions at the site of metallic identification ear tags in Wistar [CrI:(WI)BR] rats. *Cancer Res* 1987;47:2445–50
- 8 European Commission. See http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/sec_2010_1107.pdf. Brussels 2010 (cited 2011-01-15)
- 9 Burn CC, Deacon RM, Mason CJ. Marked for life? Effects of early cage-cleaning frequency, delivery batch, and identification tail-marking on rat anxiety profiles. *Dev Psychobiol* 2008;50:266–77
- 10 Leclercq GC, Rozenfeld FM. A permanent marking method to identify individual small rodents from birth to sexual maturity. *J Zool Lond* 2001;254:203–6
- 11 Spangenberg E. *Evaluation of identification methods for mice*. In: Lidfors L, Blokhuis H, Keeling L, eds. *Proceedings of the 44th Congress of the International Society for Applied Ethology (ISAE)*. Sweden: Wageningen Academic Publishers, 2010:223
- 12 Kitagaki M, Hirota M. Auricular chondritis caused by metal ear tagging in C57BL/6 mice. *Vet Pathol* 2007;44:458–66
- 13 Kitagaki M, Shibuya K. Nylon ear tags for individual identification of guinea pigs. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2004;43:16–20
- 14 Hawkins P, Morton DB, Bevan R, *et al.* Husbandry refinements for rats, mice, dogs and non-human primates used in telemetry procedures. Seventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFPAW Joint Working Group on Refinement, Part B. *Lab Anim* 2004;38:1–10
- 15 Kananen IHE, Voipio H-M, Mauranen K, *et al.* Comparison of ear tattoo, ear notching and micro-tattoo in rats undergoing cardiovascular telemetry. *Lab Anim* 2011;45(3):154–9
- 16 Hankenson FC, Garzel LM, Fischer DD, *et al.* Evaluation of tail biopsy collection in laboratory mice (*Mus musculus*): vertebral ossification, DNA quantity, and acute behavioral responses. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008;47:10–8
- 17 Guillod NB, Johnson AN. Albino rodent tail tattooing: two years of experimental data and observations. *Lab Anim Mag* 1990;19:36–7
- 18 Sørensen DB, Stub C, Jensen HE, *et al.* The impact of tail tip amputation and ink tattoo on C57BL/6J BomTac mice. *Lab Anim* 2007;41:19–29
- 19 Rao GN, Edmondson J. Tissue reaction to an implantable identification device in mice. *Toxicol Pathol* 1990;18:412–6
- 20 Castelhana-Carlos MJ, Sousa N, Ohi F, *et al.* Identification methods in newborn C57BL/6 mice: a developmental and behavioural evaluation. *Lab Anim* 2010;44:88–103
- 21 The Jackson Laboratory. <http://jaxmice.jax.org/support/husbandry/identification.html>. (accessed, 9 January 2013)

- 22 Albrecht K. *Microchip-Induced Tumors in Laboratory Rodents and Dogs: A Review of the Literature 1990–2006*. See <http://www.antichips.com/cancer/>; 2007 (cited 2010-01-28)
- 23 Hawkins P, Felton ML, van Loo P, et al. Report of the 2005 RSPCA/UFAW Rodent Welfare Group meeting. *Lab Anim* 2006;35: 29–38
- 24 Williams WO, Riskin DK, Mott AK. Ultrasonic sound as an indicator of acute pain in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008; 47:8–10
- 25 Iwaki S, Matsuo A, Kast A. Identification of newborn rats by tattooing. *Lab Anim* 1989;23:361–4
- 26 Schaefer DC, Asner IN, Seifert B, et al. Analysis of physiological and behavioural parameters in mice after toe clipping as newborns. *Lab Anim* 2010;44:7–13
- 27 Borgens RB. Mice regrow the tips of their foretoes. *Science* 1982;217: 747–50
- 28 Neufeld DA, Zhao W. Phalangeal regrowth in rodents: postamputational bone regrowth depends upon the level of amputation. *Prog Clin Biol Res* 1993;383A:243–52
- 29 Neufeld DA, Zhao W. Bone regrowth after digit tip amputation in mice is equivalent in adults and neonates. *Wound Repair Regen* 1995;3:461–6
- 30 Zhao W, Neufeld DA. Bone regrowth in young mice stimulated by nail organ. *J Exp Zool* 1995;271:155–9
- 31 Vachon P. Anatomical and histological observations of fore- and hind limb toes in adult mice after amputations performed at the age of two weeks. *Can J Vet Res* 1998;62:311–3
- 32 Gruda MC, Pinto A, Craelius A, et al. A system for implanting laboratory mice with light-activated microtransponders. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010;49:826–31
- 33 Cameron J, Jacobson C, Nilsson K, et al. Identifying laboratory rodents using earprints. NC3Rs #11 *Identifying laboratory rodents using earprints June 2007*. <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=570&page=675&skin=0>. (accessed 9 January 2013)
- 34 National Research Council. *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington: The National Academies Press, 1996

(Accepted 29 November 2012)

Working Party Report

Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification

K Dahlborn¹, P Bugnon², T Nevalainen³, M Raspa⁴, P Verboost⁵ and E Spangenberg⁶

¹Department of Anatomy, Physiology and Biochemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7011, SE-75007 Uppsala, Sweden; ²Institute for Laboratory Animal Science, University Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH 8057 Zürich, Switzerland; ³Hevossaarentie 21, 37800 Akaa, Finland; ⁴Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), European Mouse Mutant Archive (EMMA), Campus "Adriano Buzzati-Traverso", Via E. Ramarini 32, I-00015 Monterotondo Scalo (Roma), Italy; ⁵UMCN, University of Nijmegen, Geert Grooteplein Zuid 10, 6526 GA, Nijmegen, the Netherlands; ⁶Department of Animal Environment and Health, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7068, SE-75007 Uppsala, Sweden
Corresponding author: K Dahlborn, Department of Anatomy, Physiology and Biochemistry, Box 7011, SLU, SE-75007 Uppsala, Sweden.
Email: kristina.dahlborn@slu.se

Abstract

The primary aim of this report is to assist scientists in selecting more reliable/suitable identification (ID) methods for their studies. This is especially true for genetically altered (GA) animals where individual identification is strictly necessary to link samples, research design and genotype. The aim of this Federation of European Laboratory Animal Science Associations working group was to provide an update of the methods used to identify rodents in different situations and to assess their implications for animal welfare. ID procedures are an indispensable prerequisite for conducting good science but the degree of invasiveness differs between the different methods; therefore, one needs to make a good ethical evaluation of the method chosen. Based on the scientific literature the advantages and disadvantages of various methods have been presented comprehensively and this report is intended as a practical guide for researchers. New upcoming methods have been included next to the traditional techniques. Ideally, an ID method should provide reliable identification, be technically easy to apply and not inflict adverse effects on animals while taking into account the type of research. There is no gold standard method because each situation is unique; however, more studies are needed to better evaluate ID systems and the desirable introduction of new and modern approaches will need to be assessed by detailed scientific evaluation.

Keywords: Animal welfare, biopsy, refinement, rodent identification, toe clipping

Laboratory Animals 2013; 47: 2–11. DOI: 10.1177/002367712473290

Rodent identification and animal welfare

The aim of this Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group was to identify best practices for rodent identification in different situations and assess their implications for animal welfare. In general, the new EU Directive does not apply to practices undertaken for the primary purpose of identification of an animal (2010/63/EU). This means that it is left to the national authorities to decide what methods are acceptable or not. The overall aim of this report is to assist scientists in choosing the best identification method for their studies, and to enlighten legislators in the decision-making process.

Early individual identification is a prerequisite for valid and reliable research using animals; this is especially true in the case of genetically altered (GA) animals. Identification is necessary to link samples, research data

and genotype to the individual animal. Loss of identification can render the animal unusable for further breeding and research. Data can also become unusable, which can result in compensatory use of additional animals. Reliable identification is therefore a prerequisite for good science and has important Reduction aspects. Although, identification methods are considered routine procedures, there is often a lack of scientific evidence related to their impacts on animal welfare and research outcome. Therefore, this report is based on best practice and, when available, on the scientific literature.

A wide variety of identification (ID) methods are used, each with different implications on animal welfare. Concomitantly, new and improved methods are being developed. The method of choice generally depends on tradition, study-based reasons and costs. A survey was performed in 2007 on the web-based forum Comparative

Medicine list (COMP MED), and it showed that the most commonly used methods are ear notching/clipping and ear tagging, both in the USA/Canada (ear notch/clip; 10 out of 23 answers, ear tag 11 out of 23) and in Europe (ear notch/clip; 10 out of 19 answers, ear tag 4 out of 19).¹ The least widely used methods were toe clipping and ear tattooing.

All identification methods are brief procedures, involving restraining the animals and result in some degree of discomfort and/or pain. Since these procedures are carried out on a vast number of animals, even minor improvements for the individual animal can lead to a considerable overall Refinement effect. A more expanded version, with practical details on how to perform different methods, will be published on the FELASA homepage.

Animal welfare is generally assessed with a combination of physiological and behavioural parameters. There are reliable parameters to be used for assessment of both acute and chronic effects on animal welfare. However, the identification procedure is often the first restraint to which animals will have been subjected, e.g. at weaning or even before, and therefore the assessment of acute effects of the identification procedure can be difficult to distinguish from the effects of the handling and/or restraint itself.^{2,3} Reported long-term negative consequences of identification are increased mortality, systemic diseases, tissue irritation or damage, inflammation and tumours.⁴⁻⁷ Therefore, a valid assessment of a specific identification method should include both immediate and chronic effects associated with the procedure. In addition, the ease with which the procedure can be performed, as well as the readability and sustainability of the marking over time, should be taken into account when evaluating the different methods. If genotyping is necessary, it can be considered as a true Refinement if the chosen identification method also generates a tissue sample, thus avoiding repeated (invasive) procedures on the same animal.

Acute effects are not only an animal welfare concern, but also a research quality concern. Invasive identification methods necessitate a recovery period before the animals can be used in the study. For example, the expected outcomes of tattooing are oedema and bleeding through puncture holes made by the tattooing instrument. This will temporarily affect the animals' physiology and behaviour which in turn may affect specific experimental parameters.

Analgesia and anaesthesia can be useful because they shorten the recovery period after invasive and painful procedures, e.g. surgery. The small size of the body parts used for identification makes it very difficult to apply local analgesics/anaesthetics. Inhalation anaesthesia must be considered in order to alleviate acute pain during the identification procedure. To eliminate postoperative pain, inhalation anaesthesia must be combined with analgesia. More studies are required to assess if the methodology could be refined to such a level that it would really alleviate the stress to which the animals are subjected during and after the identification procedure. In addition, the success of any method depends on the training and manual skills of the person performing the procedure and care of the instruments used.

In this report, the identification methods are grouped according to whether or not they are

- (1) Permanent
- (2) Invasive
- (3) Generating tissue sample for genotyping.

Rodents are the largest group of mammalian species used in research and testing in the European Union (95%).⁸ Therefore, the methods described here focus on rats and mice. However, most methods are also applicable to guinea pigs, hamsters, gerbils and chinchillas.

Non-invasive temporary identification methods

Shaving or cutting the fur

Cutting the fur is one of the simplest methods for identifying laboratory rodents. An area on the body, mainly on the back (for visibility without handling), is cut or shaved. The most evident advantages are the ease of application and reading, along with the low cost. On the other hand, this type of ID can only be used to distinguish a limited number of animals.

The only necessary equipment is a fur shaving machine or a pair of scissors. The ease of reading the marking depends on the growth of the fur and the length of hairs that are removed. This method can be used after approximately two weeks of age, when pups have acquired a full coat of fur. The stress associated with this identification method mainly stems from the restraint of the animal. If properly performed, the procedure should not cause any pain to the animal.

Felt tip marker or alcohol-based pens for skin marking and coat dyeing

If one uses a felt-tip pen or similar markers, it is possible to identify mice or rats by writing marks or numbers on hairless parts of the body, e.g. ears and tail, but also on the skin (back skin, belly, limbs, armpits), especially in neonates or hairless mutants. The numbering or coding options can be increased by using different colours. The method is applicable to all ages, including neonates.

Commonly used dyes for colouring the fur are human hair colours or marking sprays meant for farm animals, but also a felt-tip pen can be used. Fur colouring is not suitable for a large number of animals. The marks are readable from a distance and without handling the animal. However, if neonates are marked on the armpits, handling is necessary in order to identify the animal. Coat dyeing is applicable as soon as the animals have fur, i.e. after approximately two weeks of age. Both skin marking and coat dyeing as such are painless but require restraint for application and renewing which can cause a temporary stress in the animal. This increased handling can also have positive effects.⁹ These are low-cost but time-consuming methods, permitting identification of a limited number of animals only.

One major problem when using dyes or discolouring substances is their potential toxicity or untoward chemical

burden. These substances can enter the body by ingestion (e.g. grooming) or by diffusion through the skin which can lead to interference with research results.

Invasive temporary identification methods

Subcutaneous injection of ink

The subcutaneous injection of ink differs from tattooing because the ink is injected under the skin instead of into the skin layers. Like all subcutaneous depots of substances, ink also fades after some time (a few hours to a few days). The method provides limited numbering possibilities, although this can be increased by using different colours.

This procedure has two painful components; the insertion of the needle through the skin and thereafter the irritation due to the substance and/or the expansion of a body part as a result of the volume injected. In order to reduce the pain one should avoid using toxic or irritant substances. The footpad or the tail is the most common sites of injection. Leclercq and Rozenfeld reported a local swelling after footpad injection which may have been associated with pain.¹⁰ This procedure requires restraining the animal and training the personnel. Handling is necessary to read markings on the tail and restraint is necessary to read the markings on the footpads.

This method can be used in animals of all ages, including newborns. It does however have a limited use since it only lasts for a short time (days at best). The Working Group does not recommend using this method since it is invasive and painful and only temporary.

Ear tag

Ear tags are available in metal or plastic; these are applied to the ear with special pliers. Tags are available in different sizes, to be used on different species, are pre-numbered and thus allow identification of a very large number of animals.

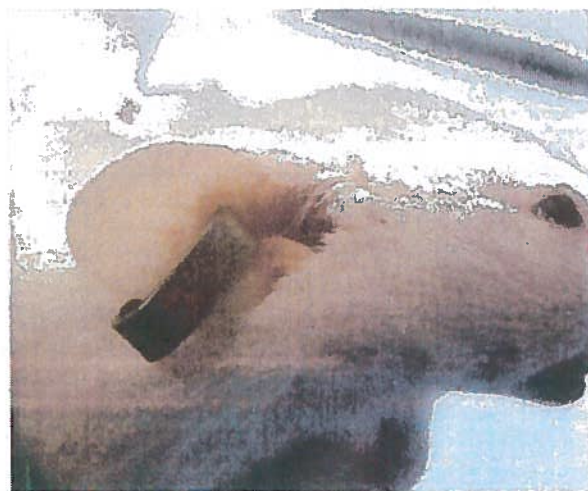


Figure 1 Tag placed correctly on the lower edge of the pinna



Figure 2 Tag placed in the upper edge of the pinna (incorrect)

The pliers are loaded with a tag and placed in the visible ear (pinna). Tags should be placed on the lower edge of the pinna so that they do not bend it (Figure 1). Ears should be checked regularly and in cases of tissue damage or inflammation, the tags need to be removed. Restraint is necessary for proper attachment of the tag and for its subsequent reading when identifying the animal.

This ID method is inexpensive and quick and easy to perform. There is some risk that the animal will lose the tag. The pinna is not developed before two weeks of age and to ensure that the ear is big enough to hold the tag, one needs to wait until weaning. Furthermore, in experiments using magnetic resonance imaging (MRI) systems, the metal tags will need to be removed because they will interfere with the magnetic field. The method is painful and requires proper restraining of the animals and therefore they will temporarily suffer for a brief period from a combination of pain and discomfort.

How the tag is placed in the pinna is important, with placement in the lower edge being recommended (Figure 1).¹¹ If the tag is placed on the dorsal side of the pinna, the ear might fold (Figure 2) and this could cause irritation and suffering to the animal.

Metal ear tags (commonly made from a nickel-copper alloy) have been associated with inflammatory and proliferative reactions and neoplasia in mice and rats following months of carrying the tags.^{6,7} Similarly, a remarkably high incidence (8.8%) of squamous cell carcinomas has been reported.⁴ The appearance of auricular chondritis, in C57BL/6 mice, was claimed to be an autoimmune response to reactive compounds released from the metal tag.¹² In that study, tagged ears contained higher levels of copper and cytokines, compared with non-tagged ears. When different tags were compared in guinea pigs, the loss of tags decreased from 45% for metal tags down to 10% with nylon tags.¹³ Hence, the risk of irritation and inflammation

seems to be related to the metal in the tags and to the duration for which the animals have to carry them.

Invasive permanent identification methods that do not yield a tissue sample for DNA analyses

Tattoo methods

Several body parts can be used for tattoo identification in rodents, e.g. ears, tail, footpads or toes. The procedure includes penetration of the skin with specific instruments in order to load tattoo ink or paste intradermally. The sensitivity of the body part where the marking is being applied will vary, and this has consequences on the extent of the pain sensation experienced by the animal in connection to the procedure.¹⁴

The ink must be loaded in the dermis, under the epidermis (the upper layer of the skin) to create a permanent marking. Hence, the skin barrier is disrupted and chemical compounds in the ink can spread via the circulation to the entire body. This poses two types of hazards: those associated with toxicity and those that may interfere with the study. Tattooing needles should always be clean (aseptic), kept sharp and replaced on a regular basis. Tattoo pigments are usually minerals, organic (industrial) or plastic-based pigments. Substances that are toxic or which may interfere with research results should not be used. In MRI studies, there is a specific problem with some tattoo inks.

Tattooing is a permanent method, but the ink may fade and become illegible with time. The number of possible unique identification marks possible varies depending on which method is used, but it can generally be increased by using different colours or by combining different locations. In general, tattooing procedures require training before they can be performed properly.

Ear tattoo

This method requires fully developed ears and a good restraint that fixes the head of the animal is necessary to avoid lateral movement and unnecessary tissue damage during the application. Restraint may be needed to read the tattoo.

One of the two methods for tattooing rodent ears is to use tailor made instruments, typically pliers with revolving heads. The second method available for tattooing rodent ears is the microtattoo system. This involves a pair of forceps with a disposable hypodermic needle on one side and a container with ink paste on the other, and the procedure is monitored through a magnifying glass (Figure 3). The identification consists of combinations of dots which allow for creation of a large numbering system. Generally, only handling is needed to read the ear tattoo.

Ears are considered to be very sensitive organs,¹⁴ and hence tattooing must be considered to be at least moderately painful. Adult rats, instrumented with telemetric cardiovascular transmitters, were marked with three different



Figure 3 Identification in ear with microtattoo equipment (photograph by Richard and Anne Boutet, Québec, Canada; reproduced with permission)

methods; ear tattoo, ear notching and micro (toe) tattoo, using a crossover design. During the 1–4 h period and the following dark period, the mean arterial pressure was highest in the ear notching group indicating that the pain evoked was still present during 1–16 h after the marking procedure.¹⁵

Tail tattoo

Tattooing on the tail can be performed in two different ways: the microtattoo system or the electric tattoo equipment (similar to that used in humans). Tail tattooing with the microtattoo system should only be applied in young animals before the ossification of the tail (tail ossification occurs between 2 and 3 weeks of age)¹⁶ since it is inserted completely through the tail. Tail tattooing with an electric machine can be performed on adult mice, and rats of all ages if one wishes to write digits or letters. It can also be used in young mice to imprint dots or stripes on the tail. First the ink is applied on the skin and the tattoo needles transfer the ink into the skin layers and the remaining ink is then removed. This method allows for an infinite amount of numbers but needs some prior training in order to apply readable digits/letters. An alternative to the electric tattoo machine is the use of a lancet. It is done manually and produces only coloured dots, which results in a limited amount of numbers. As for the other tattoo methods, good restraint is necessary when tattooing the tail. In general, only handling is necessary to read the tattoo.

The pain, the necessity to restrain and the long duration of the tattooing procedure with the electric tattoo machine (noise, vibrations) cause discomfort to the animals. The manual method using the lancet also causes pain, the extent of which will obviously depend on the skill of the person performing the procedure.

Guilod and Johnson (1990)¹⁷ found that ink tail tattoos caused mild fibrosis in tattooed areas and uptake of ink in regional lymph nodes, but no effects of tail tattooing on food consumption in a long-term study in adult rats. As a result of licking the tattoo, Sørensen et al.¹⁸ found ink



Figure 4 Site of insertion (gray circle) of the needle (microtattoo) for toe marking

colour in the faeces of 20-day-old mouse pups after tail tattooing.

Toe tattoo or footpad tattoo

The microtattoo system can also be used to mark a toe or footpad by inserting the needle through the skin of these extremities. The needle should not be inserted through the whole toe or foot, only the pads are marked.

An important advantage of this method is the possibility to identify animals of all ages. Even when the toes of newborns are not yet separated, it is possible to perform toe tattooing. The microtattoo is inserted through the toe pad (Figure 4) or through the footpad.

A lancet can also be used to mark the pads of the toes or of the foot, employing the same method for tail tattoos and a lancet.

All toe or footpad tattoo methods described are considered to be painful, but the use of the microtattoo can be considered as acceptable because the needle used can be adapted to the size of the animal.

Microchip transponder

Electronic radio frequency ID transponders, commonly called microchips, are an effective way to identify laboratory animals. A microchip is inserted subcutaneously, in order for the animal to be identified with a transponder reader. The transponder responds to a low-energy radio signal emitted by a compatible reader, which displays the information (number) from the transponder. The microchip is implanted in the neck or further back, via a special syringe. The microchip system is a permanent ID method and allows for identification of an infinite number of animals.

Most readers can be connected to a computer which make it possible to collect a variety of data from a specific animal and transfer these directly to databases. Although the application is initially time consuming, the microchip has the advantage over other methods in that identification errors (except for incidental chip loss) are excluded. While it is



Figure 5 Size of microchips suited to mice (1×6 mm) and rats (2×12 mm) (top picture) and the size of the needles (12G, to the left and 18G, to the right) in relation to a fully grown C57BL mouse (bottom picture)

true that microchips can disappear, relocate or break, this risk appears to be relatively low. Rao and Edmondson (1990)¹⁹ monitored 140 implanted mice for two years and found that 2% of the mice lost their chips, and 2.8% of the chips failed to transmit data.

The suitable time for microchip insertion depends on the size and body weight of the animal rather than age. The larger chip (12×2 mm) (Figure 5, top picture) is most suitable for animals ≥ 50 g and should not be used before adulthood in mice - if at all. The smaller chips (6×1 mm) are more suitable for mice (Figure 5, top picture). The manufacturer of the smallest microchip (6×1 mm) claims that it can be used in mice from five days of age, but according to Castelano-Carlos *et al.*,²⁰ this is not recommended. Inhalation-anaesthesia is appropriate for the microchip implantation in all rodents.²¹ It is recommended to close the wound, after insertion.

For proper application and correct positioning of the chip, some training is recommended. In general, handling, but not restraint, of the animal is sufficient to read the ID. For the small microchips, the reading distance is very short and thus it is necessary to touch the animal with the reader to collect the signal.

A recent study on five-day-old mouse pups showed that microchip (size 6×1 mm) injection resulted in a stronger reaction (sudden movements, urination and vocalization), compared with distal phalanx removal or toe tattooing performed at the same age.²⁰ None of the methods exhibited any postnatal effects. The authors recommended the use of toe clipping in young pups and microchips only after weaning.

In the long-term microchips can cause inflammation and fibrous tissue growth. Since they are implanted via injection, this is a procedure known to increase tumour risk. A causal link between microchips and cancer has been postulated to exist in rats and mice. Five out of eight articles reported that 0.8–4.1% of laboratory mice and rats developed malignant tumours around or adjacent to the implanted microchips.²² In one of these eight studies, the investigators used a genetically modified line (p53+/- mice) that was prone to develop cancer, and 10.2% of the mice developed tumours⁵ and in several cases these tumours also metastasized. The tumours generally occurred in the second year of the studies, in middle aged or older animals. However, in the Blanchard study, the heterozygous p53+/- mice developed fast-growing cancers before six months of age.⁵ Taken together, microchip implantation appears to increase the risk of developing tumours. This is important to bear in mind when undertaking long-duration cancer research studies in rats or mice. One needs to consider also whether a foreign body like a microchip can affect immunological and skin studies (because of inflammation) or disturb image analysing techniques.

This is likely to be the most expensive identification method (costs for reader and transponders), and anaesthesia equipment may be necessary as well. Finally, the different types of transponders often transmit at different wavelengths and thus require different readers. This may need to be considered before transporting chipped animals between laboratories.

Invasive permanent methods of identification yielding tissue for DNA analyses

Ear notching

Ear notching as an identification method is generally considered to be easy to carry out and read and the necessary trauma to the animal is minimal in a properly executed procedure. The procedure can be applied on mice and rats. Punching or 'notching' holes in the ears requires a specific instrument. The choice of puncher is extremely important; there are punchers (mostly cheap ones), which pinch rather than cut and they should not be used.

The location of the holes must be accurate and done according to a chart/system in order to ensure a valid identification. The withdrawn tissue remnant(s) can be used for genotyping. The punchers must be completely cleaned between animals to avoid any DNA cross-contamination. The marking can be read from a distance but it may be necessary to pick up the animal from the cage. Metal ear punchers allow identification of the laboratory rodents by notching one or several holes in the pinna of the ear, at the edges of the pinna and/or in the middle. The numbering system of ear notching/punching allows identification of maximally a few hundred animals.²³

In general, this can be considered a permanent method but there have been reports that the pinna can heal after several months depending on the size of the hole. Ear notching is painful and requires proper restraint of the animals

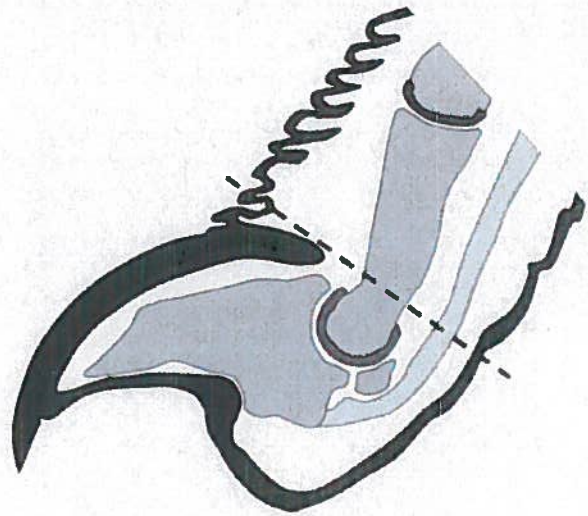


Figure 6 Schematic picture of the site of distal phalanx removal

and therefore they will briefly suffer from a combination of pain and discomfort. In order to read the ID it is necessary to pick up the animal, but generally restraint will not be needed. Training is required to learn the proper notching technique.

Cinelli *et al.* (2007)¹ showed that different methods for biopsy collection in mice (tail biopsy, ear punch, mouth swab, rectum swab, hair collection) had the same effects on telemetrically recorded heart rate, motor activity and core body temperature as restraint alone. These parameters returned to normal levels one hour after the biopsy collection. In rats, during the first hour after the marking procedure, ear notching resulted in a higher blood pressure and heart rate responses than toe tattoo, which may simply be due to the fact that less restraint was needed for the latter procedure.¹⁵ Using ultrasonic vocalization as a measure of pain, there was no difference in the response to ear notching and tail snip in mice.²⁴

Distal phalanx removal

In distal phalanx removal, the entire distal phalanx of a toe is removed with sharp scissors from mouse pups around seven days of age. The cut is placed at the very distal part of the second phalanx (Figure 6) to remove the entire nail bed. In adult animals the identification is detected as a missing nail or tip of a toe on a paw. The method has been used in rats but is not recommended due to its long-term effects, e.g. impaired grip strength at weaning.²⁵ Therefore, the method will only be described for mice in this report. A similar, non-refined method generally known as 'toe clipping', where a larger part of the toe is removed, is sometimes used (because it makes the identification easier). However, the use of this non-refined method is strongly discouraged by the Working Group. National legislation within some European countries may actually prohibit the use of this method.



Figure 7 Restraining and cutting of the distal phalanx of a seven-day-old mouse pup (photograph by Dagmar Schaefer, Zürich, reproduced with permission)

The young pups are picked up and held by the nape of the neck in very much the same manner as the mother carries the pups. In addition, it is necessary to restrain the leg (Figure 7) to avoid sudden movements that might result in an incorrect cut. The scissors are opened and placed against the toe from below, in order to make it easier to see and cut the correct amount, which is 2–3 mm in a seven-day old pup (D Schaefer, personal communication). The removed phalanx biopsy can be used for DNA analysis (enough tissue for polymerase chain reaction).

The scissors used for this procedure should be small and sharp, e.g. ocular microsurgical scissors (Figure 7). The Working Group recommends a maximum of one toe per paw, i.e. four toes per animal, to be cut. However, since pups are marked while still in their native litter, males and females within the same litter can be given the same identification since they can be distinguished by sex. This can reduce the number of digits that need to be removed. The reading of the marking (a missing nail or tip of a toe on a paw) requires that the animal is picked up from the cage and held on a surface, such as the arm, to examine the paws. Sometimes restraint may be necessary.

This is a permanent method, if performed correctly, and it will not become illegible over time, which is a risk with some other permanent methods (e.g. tattooing and ear notching). The distal phalanx removal should only be performed on very young animals, Schaefer *et al.* (2010)²⁶ found that phalanx removal at day 7 was preferred over day 3 because at the younger age it was difficult to cut the correct amount since the toes were so small. Castelano-Carlos *et al.*²⁰ successfully performed distal phalanx removal at five days of age and Spangenberg *et al.*¹¹ at six days of age. Already at 12 days of age the pups are very active and it becomes difficult to perform the phalanx removal with precision. An incomplete removal of the distal phalanx can lead to the regrowth of

the digit.^{27–30} It seems to be important to remove the entire nail bed to avoid regrowth. By around day 18, the phalanges have become ossified³¹ which would make the procedure significantly more painful. Hence, the current knowledge shows that the age of 5–7 days (counting the day of birth as day 0) is a preferable time frame for removing phalanges for identification and genotyping of mice. There is no scientific support for successfully, and without inflicting more pain, performing the phalanx removal at later ages.

If the phalanx is removed correctly, the young pups display little or no reaction, mainly paw withdrawal, during or after the procedure.^{20,26} The restraint mimics the mother's handling of the pups and might therefore be less stressful than the common techniques of restraining adult animals. There is usually a drop of blood on the cut tip but no further bleeding.²⁶ If further bleeding should occur, it can be stopped with a styptic or a haemostatic pencil. Schaefer *et al.*²⁶ found no effect of phalanx removal on grip strength nor did it cause hyperalgesia (tested at 12 weeks of age) when phalanges had been removed on day 7, but grip strength was impaired when the phalanges were removed on day 3. It is likely that too much of the toe was cut on day 3 due to the small size.²⁶ No effects on climbing abilities at weaning,¹¹ or as adults,²⁰ were found in mice with distal phalanx removal.

Today this method is in fact the only permanent identification of a pup with a simultaneous tissue sampling for genotyping. Because of the early genotyping, a rapid and early selection of animals needed for studies or further breeding is possible which eliminates the costs of housing redundant animals. The recommendation of the Working Group is to use this method only in combination with genotyping and exclusively for young pups. Other methods are options only for marking to only mark young animals when no biopsy is needed.

New methods

The first method described below has recently become commercially available (2010) and is a modification of the classical ear tag. The second method is also commercial available. The final two methods described use completely new approaches to identifying rodents. However, they are not yet commercially available.

Mini-ID Ear tags (<http://www.zonotid.com/>)

A recent alternative to traditional ear tags is a lightweight plastic tag (0.07 g) that has a 2D barcode etched onto a titanium plate attached to the plastic tag. It is read using a barcode reader similar to the microchips. Its application to the pinna is similar to that done with the traditional tags. This tag type is lighter and should therefore reduce the risks of infections or inflammation in the ear caused by irritation from a heavy tag. It does not have the loop shape of a metal ear tag which minimizes the risk of it becoming entangled. Further, the plastic material reduces the risk of an allergic reaction to the tag. Like other ear tags, this

Table 1 Overview of available identification methods for rodents; issues related to both techniques and the animals

Identification method	Concerning the technique							Concerning the animal	
	Permanent/ Temporary	Specific skills/ training	Number of codes	Age for application (from)	Anaesthesia*	Aseptic measures†	Sample for DNA	Pain/ Discomfort at application	Handling/ restraint at reading
Shaving/cutting the fur	T	No	5	2 weeks	No	No	No	D	None
Skin marking	T	No	10/colour	All	No	No	No	D	None/H
Coat dying	T	No	5/colour	2 weeks	No	No	No	D	None
Subcutaneous ink injections	T	Yes	~8/colour	All	No	Yes	No	P	H/R
Ear tag	T	Yes	Infinite	Weaning	No	Preferable	No	P	R
Ear tattoo	P	Yes	Hundreds	Weaning	No	Yes	No	P	H/R
Tail tattoo	P	Yes	Hundreds	Weaning	No	Yes	No	P	H
Tail microtattoo	P	Yes	Infinite	~2 weeks	No	Yes	No	P	H
Toe/foot pad tattoo	P	Yes	Hundreds	All	No	Yes	No	P	R
Microchip transponder	P	Yes	Infinite	Depends on body size	Yes	Yes	No	P	H/R
Ear notching/ punching	P/T	Yes	Hundreds	2 weeks	No	Preferable	Yes	P	H
Distal phalange removal	P	Yes	Hundreds	4–8 days	No	Preferable	Yes	P	H

For detailed information see corresponding section in the report

The first three methods mentioned in the table are non-invasive

*Analgesia explained in welfare paragraph

†Depending on body part, see tattoo paragraph

method can be used from weaning and allows identification of an infinite number of animals. Other types of ear tags are also becoming available on the market.

Microtransponder p-Chip

This is a new method with a radiofrequency identification tagging that uses 500-µm, light-activated microtransponders implanted subcutaneously into the ear or tail of mice. According to Gruda *et al.* (2010)³² the preferred location for implanting is in the side of the tail, because implantation at this site was reported to be simple to perform and was associated with shorter implantation times and a higher success rate compared with the ear. They claim that the main benefits of using light-activated microtransponders over other identification methods are their small size which minimizes stress to the animals during implantation.

A biometric approach to laboratory rodent identification

This new technique uses the blood vessel pattern of the pinna of an animal as biometric identification. Each animal has an individual blood vessel pattern, like a fingerprint. Images of the ears of all animals that are to be identified are taken. Later when an animal has to be identified, a new picture is taken of the ear and this is compared with the information stored in the database to identify that individual.³³ It can likely be used from weaning, when the ears are large enough. Since the blood vessel patterns are unique for each individual, this technique should allow identification of an infinite number of animals.

Luminescent Micro Tattooing LMT

With this method, very small luminescent pigments are applied to the skin of the animal, such as on the tail base or the ear, in the form of dot writing (like Braille). It is called 'Luminescent Micro Tattooing LMT'. It applies the code by means of micro-needle arrays coded with pigments for one-time use. Each array represents exactly one code, as in Braille. The code is applied simply by putting manual pressure on all needles. The needles penetrate the skin of the animal, but only certain needles contain pigment, thus producing the code on the skin of the animal. The dot writing (data matrix code) can be read and decoded in a scanner.

Conclusions and recommendations

The working group strongly believes that it is important that the choice of identification method is based on scientific evidence rather than personal opinions and local traditions. Undoubtedly, more studies are needed to thoroughly evaluate identification methods and the introduction of a new method should be preceded by detailed scientific evaluation.

According to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) 'toe clipping as a method of identification should be used only when no other individual identification method is feasible and should be performed only on altricial neonates'.³⁴ When the Working group of Rodent identification began its work, distal phalanx removal was identified as a method with potential problems and therefore recommended as an area for further research.

Spangenberg *et al.*¹¹ initiated and performed one study and the study by Castelhana-Carlos *et al.*²⁰ was also performed after contact with members of the working group. In addition a third study has recently been published.²⁶ In summary, these recent studies have demonstrated that distal phalanx removal does not have any negative effects on growth and physical and behavioural development in young mouse pups.^{11,20,26}

General recommendations:

- The ideal identification method should provide reliable individual identification, have no adverse effects on the animal or the animal model and be technically easy to apply;
- The choice of method depends on the age and size of the animal, whether or not a tissue sample is necessary, whether every animal needs a unique number, the duration of the study and whether the identification method can interfere with the research results or their interpretation;
- We recommend that proven permanent methods should be used for long-term identification and non-invasive temporary methods should be used when appropriate;
- Key points to consider while choosing an ID-method are summarized in Table 1.

If unique numbers are needed for every animal, tail tattooing, (non-metal) ear tags or microchips are the only methods possible. For long-term studies (> 3 months), tail tattooing is the safest method of these, since ear tags may be lost and microchips might induce tumours. Metal ear tags are the worst choice of an ID method because of the associated pain and distress as well as the risk of ear infections, tumours and allergic reactions. Moreover, subcutaneous ink injection is an invasive, painful but non-permanent method and is therefore not recommended as a method of identification.

All the new methods have advantages in terms of animal welfare and are recommended although their availability (and applicability) may still be limited. It is hoped that scientific studies will be conducted comparing these new methods with the most commonly used methods available today. So far, the microchip is the only method available supporting 'online' data transfer to a computer. It is notable that all four new identification methods described do provide a computer ID as well.

An important area for future research is the use of analgesia/anaesthesia during and after identification procedures. Inhalation anaesthesia does not in general alleviate post-operative pain. Therefore a special treatment for pain alleviation should be combined with this anaesthetic method. However, long-term pain is likely to have a more adverse effect on animal welfare than any acute pain experienced during and identification procedure. Local analgesia could be applied but this need to be administered in advance before it will have any effect. However, the body parts where it needs to be applied are very small and the animals can lick off any ointment used. Sometimes anaesthetics are aversive, which means that the degree of aversion from the anaesthetic could actually be greater than the

transient pain of, e.g. ear notching (P Flecknell, personal communication). In addition, the restraining necessary for performing identification procedures has been shown to be as aversive to the animals as the identification procedure itself.³

In summary, the choice of identification method should be determined so as to minimize the adverse effects on the animals, while at the same time taking into consideration the type of research to which the animals will be subjected. There is no gold standard method because each situation is different (see above). Here too, good science and animal welfare go hand in hand.

REFERENCES

- 1 Dahlborn K. *Animal Identification for Rodents*. Proceedings of the 37th Scand-LAS Symposium, Trondheim, Norway, 2007:84.
- 2 Baturaitė Z, Voipio H, Ruksenas O, *et al.* Comparison of and habituation to four common methods of handling and lifting of rats with cardiovascular telemetry. *Scand J Lab Anim Sci* 2005;32:137-48.
- 3 Cinelli P, Rettich A, Seifert B, *et al.* Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Lab Anim* 2007;41:174-84.
- 4 Baron BW, Langan C, Huo D, *et al.* Squamous cell carcinomas of the skin at ear tag sites in aged FVB/N mice. *Comp Med* 2005;55:231-5.
- 5 Blanchard KT, Barthel C, French JE, *et al.* Transponder-induced sarcoma in the heterozygous p53^{+/+} mouse. *Toxicol Pathol* 1999;27:519-27.
- 6 Cover CE, Keenan CM, Bettinger GE. Ear tag induced *Staphylococcus* infection in mice. *Lab Anim* 1989;23:229-33.
- 7 Waalkes MP, Rehm S, Kasprzak KS, *et al.* Inflammatory, proliferative, and neoplastic lesions at the site of metallic identification ear tags in Wistar [CrI:(WI)BR] rats. *Cancer Res* 1987;47:2445-50.
- 8 European Commission. See http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/sec_2010_1107.pdf. Brussels 2010 (cited 2011-01-15).
- 9 Burn CC, Deacon RM, Mason GJ. Marked for life? Effects of early cage-cleaning frequency, delivery batch, and identification tail-marking on rat anxiety profiles. *Dev Psychobiol* 2008;50:266-77.
- 10 Leclercq GC, Rozenfeld FM. A permanent marking method to identify individual small rodents from birth to sexual maturity. *J Zool Lond* 2001;254:203-6.
- 11 Spangenberg E. Evaluation of identification methods for mice. In: Lidfors L, Blokhuis H, Keeling L, eds. *Proceedings of the 44th Congress of the International Society for Applied Ethology (ISAE)*. Sweden: Wageningen Academic Publishers, 2010:223.
- 12 Kitagaki M, Hirota M. Auricular chondritis caused by metal ear tagging in C57BL/6 mice. *Vet Pathol* 2007;44:458-66.
- 13 Kitagaki M, Shibuya K. Nylon ear tags for individual identification of guinea pigs. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2004;43:16-20.
- 14 Hawkins P, Morton DB, Bevan R, *et al.* Husbandry refinements for rats, mice, dogs and non-human primates used in telemetry procedures. Seventh report of the BVAAWF, FRAME, RSPCA/UFPAW Joint Working Group on Refinement. Part B. *Lab Anim* 2004;38:1-10.
- 15 Kasanen II-E, Voipio H-M, Mauranen K, *et al.* Comparison of ear tattoo, ear notching and micro-tattoo in rats undergoing cardiovascular telemetry. *Lab Anim* 2011;45(3):154-9.
- 16 Hankenson FC, Garzel LM, Fischer DD, *et al.* Evaluation of tail biopsy collection in laboratory mice (*Mus musculus*): vertebral ossification, DNA quantity, and acute behavioral responses. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008;47:10-8.
- 17 Guillo N, Johnson AN. Albino rodent tail tattooing: two years of experimental data and observations. *Lab Anim Mag* 1991;19:36-7.
- 18 Sorensen DB, Stub C, Jensen HE, *et al.* The impact of tail tip amputation and ink tattoo on C57BL/6J BomTac mice. *Lab Anim* 2007;41:19-29.
- 19 Rao GN, Edmondson J. Tissue reaction to an implantable identification device in mice. *Toxicol Pathol* 1991;18:412-6.
- 20 Castelhana-Carlos MJ, Sousa N, Ohl F, *et al.* Identification methods in newborn C57BL/6 mice: a developmental and behavioural evaluation. *Lab Anim* 2010;44:88-103.
- 21 The Jackson Laboratory. <http://jaxmice.jax.org/support/husbandry/identification.html>. (accessed, 9 January 2013)

- 22 Albrecht K. Microchip-Induced Tumors in Laboratory Rodents and Dogs: A Review of the Literature 1990–2006. See <http://www.antichips.com/cancer/>, 2007 (cited 2010-01-28)
- 23 Hawkins P, Felton ML, van Loo P, et al. Report of the 2005 RSPCA/UFAW Rodent Welfare Group meeting. *Lab Anim* 2006;**35**:29–38
- 24 Williams WO, Riskin DK, Mott AK. Ultrasonic sound as an indicator of acute pain in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008;**47**:8–10
- 25 Iwaki S, Matsuo A, Kast A. Identification of newborn rats by tattooing. *Lab Anim* 1989;**23**:361–4
- 26 Schaefer DC, Asner IN, Seifert B, et al. Analysis of physiological and behavioural parameters in mice after toe clipping as newborns. *Lab Anim* 2010;**44**:7–13
- 27 Borgens RB. Mice regrow the tips of their foretoes. *Science* 1982;**217**:747–50
- 28 Neufeld DA, Zhao W. Phalangeal regrowth in rodents: postamputational bone regrowth depends upon the level of amputation. *Prog Clin Biol Res* 1993;**383A**:243–52
- 29 Neufeld DA, Zhao W. Bone regrowth after digit tip amputation in mice is equivalent in adults and neonates. *Wound Repair Regen* 1995;**3**:461–6
- 30 Zhao W, Neufeld DA. Bone regrowth in young mice stimulated by nail organ. *J Exp Zool* 1995;**271**:155–9
- 31 Vachon P. Anatomical and histological observations of fore- and hind limb toes in adult mice after amputations performed at the age of two weeks. *Can J Vet Res* 1998;**62**:311–3
- 32 Gruda MC, Pinto A, Chaelius A, et al. A system for implanting laboratory mice with light-activated microtransponders. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010;**49**:826–31
- 33 Cameron J, Jacobson C, Nilsson K, et al. Identifying laboratory rodents using earprints. NC3Rs #11 *Identifying laboratory rodents using earprints* June 2007. <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=570&page=675&skin=0> (accessed 9 January 2013)
- 34 National Research Council. *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington: The National Academies Press, 1996

(Accepted 29 November 2012)

Een systematisch review naar ongerief veroorzaakt door teenknip of oorknip in knaagdieren.

Kimberley E Wever¹, Florentine J Geessink¹, Michelle Brouwer¹, Alice Tillema² and Merel Ritskes-Hoitinga¹

¹Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE) and ²Medical Library, Radboud university medical center, Nijmegen, The Netherlands

Samenvatting

Betrouwbare identificatie van afzonderlijke proefdieren is vereiste in veel dierproeven. Identificatiemethoden moeten doeltreffend en praktisch zijn, en daarnaast zo min mogelijk ongerief voor het dier te weeg brengen, zodat er geen ongewenste variabiliteit in het experiment optreedt. De teenknip en oorknip worden vaak gebruikt voor de individuele identificatie en genotypering van muizen en ratten. Er wordt verondersteld dat deze ingrepen negatieve effecten op het dierenwelzijn hebben, echter, tot nu toe is het beschikbare wetenschappelijk bewijs over dit onderwerp nog niet eerder middels een systematisch review onderzocht. We voerden een systematische review uit van het bewijs voor het ongerief als gevolg van de teenknip en oorknip, om de dierexperimenteel onderzoekers en andere belanghebbenden die betrokken zijn bij de keuze van de identificatiemethoden voor knaagdieren beter te informeren.

Door middel van een systematische zoekstrategie in drie databases identificeerden we zeven studies naar het effect van de oorknip en vijf studies naar het effect van de teenknip op dierenwelzijn. Twee van deze studies zijn uitgevoerd in ratten, de anderen in muizen. De studiekarakteristieken waren zeer heterogeen in termen van leeftijd, ras en geslacht van de dieren, de timing van de interventie en het aantal uitgevoerde teen- of oorknippen. Onze analyse van het risico op bias toonde aan dat de rapportage van de studiemethoden en maatregelen om bias te voorkomen ontoereikend was, wat leidt tot een onduidelijk of hoog risico op bias in alle studies. Geen van de studies rapporteerde een powerberekening om de gekozen steekproefomvang te rechtvaardigen. Daarnaast is een zeer groot aantal uitkomstmaten met betrekking tot het welzijn van dieren gerapporteerd (bijna vijftig verschillende uitkomstmaten in teenknip studies en vijftien verschillende uitkomsten in oorknip studies). Tussen al deze uitkomstmaten vonden we bewijs voor ongerief als gevolg van de oorknip in de vorm van een toename in ademvolume, vocalisatie (piepen) en bloeddruk. Voor de teenknip werd in pups een toename in vocalisatie en een verminderde motorische activiteit gevonden, en op lange termijn een afname in grijpkracht en zwemvermogen in volwassen dieren.

We concluderen dat er te weinig bewijs is om het ongerief als gevolg van de teenknip of oorknip betrouwbaar te kunnen vaststellen en dat de kwaliteit van het beschikbare bewijsmateriaal onduidelijk is. Adequaat onderbouwde, kwalitatief hoogwaardige studies met betrouwbare, relevante uitkomstmaten zijn nodig om de impact van deze identificatiemethoden nauwkeurig te kunnen beoordelen. Totdat er meer betrouwbare gegevens beschikbaar zijn kan een effect van teenknip of oorknip op het dierenwelzijn en de onderzoeksresultaten niet worden uitgesloten of bevestigd.

Beantwoording hoofdvraag en deelvragen van dit review

- *Hoofdvraag: wat is, op basis van het beschikbare bewijs, het ongerief ten gevolge van de teenknip en de oorknip bij proefdieren?*

De meeste uitkomstmaten toonden geen effect van teen- of oorknip op ongerief aan. Aan de andere kant zijn er ook uitkomstmaten die wel bewijs voor ongerief aantonen, voor zowel de oorknip (verhoogd ademvolume, vocalisatie en bloeddruk) als voor de teenknip (meer vocalisatie, minder activiteit in pups en minder grijpkracht en zwemvermogen in volwassenen). Totdat er meer betrouwbare gegevens beschikbaar zijn kan een effect van teenknip of oorknip op het dierenwelzijn en de onderzoeksresultaten niet worden uitgesloten of bevestigd.

- *Deelvraag 1: welk bewijs is er beschikbaar met betrekking tot het ongerief ten gevolge van de teenknip en de oorknip?*

Studies die onderzoek doen naar de effecten van de teen- en oorknip op het welzijn van knaagdieren zijn schaars en erg heterogeen. Deze heterogeniteit wordt voornamelijk veroorzaakt door verschillen in de populatie (geslacht, stam) en de interventie (leeftijd op moment van knippen, aantal plaatsen geknipt), evenals het grote aantal verschillende uitkomstmaten dat gemeten is.

- *Deelvraag 2: Wat is de kwaliteit van dit bewijs?*

De kwaliteit is laag en meerdere beperkingen van de primaire studies verminderen de betrouwbaarheid van zowel het bewijs vóór als tegen een effect op ongerief. Onze kwaliteitsbeoordeling laat zien dat de rapportage van de dierstudies ontoereikend is. Daardoor werd het risico op de meeste vormen van bias als onduidelijk gescoord en is er een onduidelijk tot groot risico dat onderzoeksresultaten door bias zijn verstoord. Het specificeren van een primaire uitkomstmaat voorkomt het aanpassen van de uitkomstmaat op basis van de studieresultaten en daarmee het risico op bias. Echter, geen van de studies definieerde welke uitkomstmaat de primaire uitkomstmaat was. Ook werd er in geen van de studies een power berekening gerapporteerd, terwijl een onderbouwing van het aantal dieren per groep door veel ethische commissies verplicht wordt gesteld. Op dit moment is het onmogelijk om te bepalen of de steekproefgrootte in een van de studies toereikend was om een verschil tussen te experimentele groepen aan te tonen. De gebruikte controlegroepen waren soms niet (optimaal) geschikt om het effect van teen- of oorknip op ongerief aan te kunnen tonen. Daarnaast tonen we aan dat de data van verschillende uitkomstmaten onvolledig zijn gerapporteerd.

- *Deelvraag 3: welke factoren beïnvloeden het ongerief ten gevolge van de teenknip en de oorknip?*

Het bestaande bewijs is te beperkt en te heterogeen om betrouwbaar de invloed van bijvoorbeeld diersoort, leeftijd, geslacht, ras, of de methode van knippen op de ernst van het ongerief te beoordelen. Drie studies deden afzonderlijke analyses voor mannen en vrouwen, maar de effecten verschilden niet tussen de verschillende sexen.

- *Deelvraag 4: hoe verhouden de teenknip en de oorknip zich tot elkaar met betrekking tot het veroorzaakte ongerief?*

Het bestaande bewijs is te beperkt en te heterogeen om een betrouwbare vergelijking te kunnen maken tussen de teen- en oorknip. De gerapporteerde uitkomstmaten zijn erg verschillend tussen de teen- en oorknip, en daardoor niet te vergelijken. Het is moeilijk om een uitkomstmaat te vinden die bij zowel teen- als oorknippen op het moment van knippen gemeten kan worden, omdat de teenknip over het algemeen niet wordt uitgevoerd in pups ouder dan 7 dagen, terwijl oorknip pas na 14 dagen en vaak nog veel later wordt toegepast.

- *Deelvraag 5: welke leeftijd van het proefdier, techniek, plaats van ingreep geeft voor de teenknip en oorknip de minste vorm van pijn en ongerief?*

Ook hier is het bestaande bewijs te beperkt en te heterogeen om een betrouwbare uitspraak te doen over de optimale leeftijd of techniek van de ingreep. Schaeffer et al. vonden dat 3 dagen oude pups die een teenknip ondergingen een lagere grijpkracht hadden dan 7 dagen oude pups. Dit werd toegeschreven aan het feit dat de tenen op dag 3 nog deels vergroeid zijn en te klein zijn om nauwkeurig te knippen, waardoor er een te groot deel van de teen verwijderd wordt. Op basis hiervan zou het knippen van de teen voor dag 3 niet aan te raden zijn, maar replicatie van dit onderzoek is nodig om dit te bevestigen. Studies waarin de teenknip uitgevoerd werd op dag 4 en dag 5 rapporteerden dat de procedure snel en eenvoudig toe te passen was, terwijl onze heranalyse van de data van Paluch et al. suggereert dat er ongerief optreedt in zeven dagen oude pups (toename vocalisatie, verminderde motorische activiteit), maar niet in zeventien dagen oude pups. Hieruit concluderen we dat het effect van leeftijd onduidelijk is en dat er verder onderzoek op dit gebied nodig is.

Eén studie onderzocht het toepassen van pijnstillende vapocoolant spray tijdens de teenknip, maar rapporteerde dat deze spray tenen aan elkaar plakte waardoor het risico op onjuist knippen toenam en er een toename was van ongerief en stress door het langduriger hanteren van de dieren. Ook verstoorde de spray de bloedstolling na het knippen. Op basis hiervan is het toepassen van deze pijnstillende spray niet te adviseren, maar verder onderzoek naar mogelijke andere pijnstillers of (lokale) anesthetica kunnen de moeite waard zijn.

Introductie

Knaagdieren, met name muizen en ratten, zijn de meest gebruikte proefdieren in biomedisch onderzoek. Ze zijn meestal identiek qua uiterlijk en gehuisvest in groepen. Individuele identificatie van de dieren is vaak noodzakelijk tijdens de fokkerij, de dagelijkse zorg of experimentele procedures. Een aantal identificatiemethoden zijn hiervoor in gebruik. Selectie van de optimale methode voor individuele identificatie is afhankelijk van verschillende factoren, waaronder diersoort, leeftijd, huidpigmentatie, onderzoeksduur en de beschikbare technische deskundigheid. De ideale identificatiemethode is doeltreffend en doelmatig, maar geeft ook zo min mogelijk pijn en / of ongerief voor het dier, omdat dit kan interfereren met het welzijn van de dieren en als gevolg daarvan de experimentele resultaten kan verstoren. Het is daarom belangrijk om het effect van identificatiemethoden op het dierenwelzijn te beoordelen.

De teenknip is een individuele identificatiemethode, meestal gebruikt in muizen, die in pasgeboren en zeer jonge dieren kan worden toegepast. Het meest distale deel van de tweede falanx, of een groter deel van de teen, wordt verwijderd. Het verwijderde weefsel kan worden gebruikt voor genotypering. De oorknip wordt gebruikt om volwassen knaagdieren (muizen en ratten) te identificeren. Met een speciale perforator worden gaten of inkepingen in het oor geknipt, volgens een schema corresponderend met een nummertabel. Ook hier kan het weggeknipte weefsel worden gebruikt voor genotypering.

De ethische rechtvaardiging om deze methoden uit te voeren is een onderwerp van debat, omdat beide methodes waarschijnlijk pijn en / of ongerief veroorzaken. Beide methoden vereisen het fixeren van de dieren en kunnen het welzijn van de dieren permanent beïnvloeden. Zo kan de teenknip het vermogen om te lopen, grijpen, wassen en voeden aantasten. Echter, het in de literatuur beschikbare wetenschappelijk bewijs voor ongerief veroorzaakt door de teen- en oorknip is nog nooit middels een systematisch review onderzocht. We zullen daarom een systematisch review uitvoeren van het bewijs over ongerief ten gevolge van de oor- of teenknip, om dieronderzoekers, welzijn medewerkers, beleidsmakers en andere betrokkenen beter te informeren bij het maken van beslissingen over de keuze van de identificatiemethode voor knaagdieren.

Materiaal en Methoden

Review protocol en amendementen

De methodologie van het review is vooraf vastgelegd in een review protocol (zie bijlage). Naast de daarin beschreven methodologie hebben we 1) gezocht naar grijze literatuur in Google, OpenGrey.eu en WorldWideScience.org met behulp van alle mogelijke combinaties van de zoektermen 'muis', 'rat' of 'knaagdieren' met 'teen', 'oor', 'falanx' of 'clip' en 2) studies waarin een oorlabel werd aangebracht geïnccludeerd, omdat ook dit een relevante identificatiemethode is. Vanwege de aanwezigheid van een oorlabel, kunnen deze resultaten niet worden gepooled met de studies zonder oorlabel.

Zoeken en studie selectie

We doorzochten de databases Pubmed, EMBASE en Web of Science met een zoekstrategie bestaande uit de volgende componenten: 'teen, staart of oor', 'ongerief' en 'dier' (zie bijlage voor volledige zoekstrategie). We controleerden de referentie-lijsten van alle geïnccludeerde studies en relevante reviews voor extra referenties die mogelijk relevant waren. Daarnaast hebben we grijze literatuur doorzocht (zie protocol en amendement) en we hebben contact opgenomen met de Nederlandse vertegenwoordigers van de Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA),

de vakgroep van proefdierdeskundigen en professoren in de proefdierkunde in Nederland met een verzoek om ons te informeren over al dan niet gepubliceerde gegevens over dit onderwerp.

Data-extractie

De gegevens werden geëxtraheerd door één reviewer (MB of FG) en gecontroleerd door een tweede reviewer (KW). We hebben geprobeerd om contact op te nemen met de auteurs van acht studies om aanvullende informatie over studie kenmerken en / of het resultaat gegevens te verstrekken. We kregen reacties van drie auteurs, die (gedeeltelijk) verduidelijking gaven m.b.t. studie kenmerken. Aanvullende data werden verstrekt door één van deze auteurs.

Risico op bias en kwaliteitsbeoordeling

Voor studies met een aparte controle groep beoordeelden twee onafhankelijke reviewers (KW en MB) het risico op bias en de studiekwaliteit, met behulp van SYRCLE's risk of bias tool. In geval van discrepanties werd consensus bereikt door discussie. Selectieve uitkomst rapportage (item # 9) werd niet beoordeeld, aangezien geen van de geïncludeerde studies refereerden aan een vooropgezet studieprotocol waarin de primaire en secundaire uitkomsten waren vastgelegd. Bij de beoordeling van selectie bias (item # 3), werden groepen binnen een studie bij aanvang vergelijkbaar beschouwd als het geslacht, de stam, en de leeftijd en / of het gewicht van de dieren niet significant verschilde tussen de groepen. Voor de teenknip studies waren een vergelijkbaar gewicht én leeftijd nodig, omdat de snelle ontwikkeling van pups grote verschillen tussen dieren van verschillende leeftijden kan veroorzaken en het gewicht van de pups invloed heeft op de nauwkeurigheid waarmee de teenknip kan worden uitgevoerd. Voor de oorknip studies was een vergelijkbaar gewicht óf leeftijd voldoende. Ook hebben we gekeken naar het rapporteren van enige vorm van randomisatie, blinding en een sample size berekening als aanvullende kwaliteitsindicatoren.

Omdat de risk of bias tool is ontwikkeld voor studies met aparte controle en experimentele groepen, konden vier studies niet worden gescoord vanwege incompatibele studie designs (dat wil zeggen cross-over design, of het gebruik van interne controles).

Her-analyse van de uitkomst data

Wanneer volledige uitkomst data konden worden geëxtraheerd of verkregen (d.w.z. gemiddelde, variantie en het aantal dieren per groep voor continue uitkomstmaten, of het aantal events en non-events voor dichotome uitkomstmaten) berekenden we de effect size als een standardised mean difference (SMD) of risico ratio (RR), voor respectievelijk continue en dichotome uitkomstmaten. Ons doel was een gecombineerd effect te berekenen bij drie of meer studies. Echter, geen enkele uitkomstmaat werd door meer dan twee studies gerapporteerd, en de resultaten en de studie kenmerken waren te heterogeen om verschillende uitkomstmaten te poolen. Daarom worden alleen de SMD en RR met bijbehorende 95% betrouwbaarheidsintervallen voor elke uitkomstmaat weergegeven zonder een gepoolde effectschatter. De SMDs en RRs werden berekend met een random effects model.

Resultaten

Studie selectie

We identificeerden in totaal 2040 referenties, waarvan er uiteindelijk twaalf voldeden aan de inclusiecriteria. Twee *conference abstracts* voldeden aan de inclusiecriteria, maar werden uitgesloten omdat de gepresenteerde gegevens vrijwel geheel overeenkwamen met volledige artikelen van dezelfde auteurs (we kregen geen respons op onze poging dit bij de auteurs te verifiëren). Daarbij werden de referentielijsten van 48 potentieel relevante referenties handmatig doorzocht en beoordeeld op relevantie. Geen van deze referenties voldeden aan de inclusiecriteria. Een conference abstract leek relevant te zijn, maar bevatte niet genoeg informatie om te beoordelen of er een geschikte controlegroep werd gebruikt. We ontvingen helaas geen reactie toen we de auteurs benaderden voor aanvullende gegevens.

Studie karakteristieken

De karakteristieken van de studies zijn samengevat in tabel 1. Van de twaalf geïncludeerde studies onderzochten er vijf (42%) een oorknip zonder oorlabel, twee (17%) een oorknip met oorlabel en vijf (42%) een teenknip. Tien studies (83%) werden uitgevoerd in verschillende muisstammen, en twee in ratten (één oorknip en één teenknip). De meeste studies (58%) gebruikten zowel mannelijke als vrouwelijke muizen, en een aantal van deze studies presenteerde deze gegevens afzonderlijk voor beide seksen. In drie onderzoeken werd het geslacht van de dieren niet gemeld. In de oorknip (inclusief oorlabel) studies waren de dieren adolescent of volwassen op het moment van de interventie (3-12 weken voor muizen en 25 weken voor ratten). In de teenknip studies varieerde de leeftijd van postnatale dag (PND) 3 tot PND17 (mediaan PND7). De studies overlappen elkaar dus niet wat betreft de leeftijd van de dieren.

De meeste studies vergeleken uitkomstmaten in de geknipte groep met een controlegroep waarbij de dieren alleen gefixeerd werden. Drie studies gebruikten het ongeknippte, contralaterale oor of de ongeknippte teen als interne controle. Een studie beschreef de controlegroep als "onbehandeld", maar of de dieren hierbij wel of niet werden gehanteerd of gefixeerd werd niet gespecificeerd. In twee studies vond een secundaire interventie in de controlegroep plaats naast het fixeren van de dieren (namelijk subcutane punctie en micro-tattoo van het pootje), zodat de controlegroep beter overeenkomt met andere experimentele groepen in de studie. Deze extra interventies kunnen de mate van ongerief in de controlegroep hebben verhoogd, waardoor ze interfereren met de vergelijking tussen controle en oor- en teenknip. De plaats van het knippen is redelijk goed beschreven in alle studies, maar heterogeen: het pootje dat werd gekozen voor de teenknip verschilde tussen de studies. In alle oorknip studies werd de oorschelp geperforeerd, behalve in één studie waarin 2mm werd afgeknipt van de rand van het oor. Het aantal oren dat geknipt werd was 1-2. Het aantal tenen 1-3.

Uitkomstdata

De geïncludeerde studies beschrijven een grote verscheidenheid aan uitkomstmaten gerelateerd aan dierenwelzijn en ongerief. In tabel 1 staan deze uitkomstmaten genoemd en de richting van hun effect zoals beschreven door de auteurs. In veel studies werd een groot aantal uitkomstmaten bepaald, maar de precieze uitkomstdata werden vaak niet gerapporteerd of enkel beschrijvend weergegeven (ND in tabel 1).

Als een uitkomstmaat verschillende keren gemeten werd in hetzelfde dier, hebben we bij de heranalyse de meting met het maximale effect bepaald en weergegeven. De figuren 3-7 bevatten daarom de volgende data uit studies met herhaalde metingen: 1) Castelhana-Carlos2010: gewicht op PND21 (voor het spenen), gewicht in week 4 voor mannen en week 12 voor vrouwen (na het spenen); 2) Paluch2014: gewicht in week 9 voor mannen geknipt op PND7 en PND17, week 7 voor vrouwen geknipt op PND7 en week 10 voor vrouwen geknipt op PND17; 3) Castelhana-Carlos2010: rotarod test bij snelheid van 15rpm; 5) Vachon1998: lengte van de 3^e teen en breedte van de 4^e teen; 6) Kitagaki2007: oordikte na 26 weken en 7) Kasanen2011: hartslag op 16-24 uur en bloeddruk 4 tot 16 uur na oorknip.

Oorknip studies

In de oorknip studies werden vijftien verschillende uitkomstmaten (gemeten bij volwassenen dieren) beschreven, waarvan de meeste fysiologische parameters zijn voor ongerief zijn (bijvoorbeeld verhoogde hartslag en ontsteking). Twee gedragsparameters welke kunnen wijzen op ongerief of pijn werden beschreven (de *mouse grimace scale* en vocalisatie (piepen) tijdens behandeling). Muizen piepten vaker tijdens de oorknip dan tijdens enkel fixeren en hun respiratoir minuut volume steeg. Er werden geen verschillen in de hartslag, bloeddruk, lichaamstemperatuur en scores op de *mouse grimace scale* gezien. Het oormerken met metalen labels bleek het metaalgehalte van het oor te verhogen wat ontsteking van het oorkraakbeen veroorzaakte, zoals aangetoond door een toename van de oordikte en een verhoogd cytokine niveau. Er werd geen effect op tumorvorming gezien. Bij ratten werd de bloeddruk en hartslag vergeleken tussen de oorknip en de microtattoo, met wisselende resultaten: de bloeddruk nam toe na de oorknip op verschillende tijdstippen, terwijl de hartslag hoger was in de microtattoo groep.

Bij de her-analyse van de data en het daarbij berekenen van de standardised mean difference (SMD; figuur 2) of het risico ratio (RR; figuur 3), vonden we geen extra effecten van de oorknip.

Teenknip studies

In de teenknip studies werden in totaal bijna vijftig verschillende uitkomstmaten beschreven (tabel 1). Uitkomstmaten gemeten in pups zijn onder te verdelen in parameters voor fysieke ontwikkeling (bijvoorbeeld lichaamsgewicht en ontwikkeling van vacht), neurologische ontwikkeling (bijvoorbeeld houdings- en grijpreflexen), tekenen van stress in pups of hun moeder (bijvoorbeeld vocalisatie tijdens behandeling en verstoting door de moeder) en fysiologische parameters die kunnen wijzen op ongerief (bijvoorbeeld een verhoogd corticosteroïd niveau en bloeding). Uitkomstmaten gemeten bij volwassen dieren betreffen voornamelijk neurologische testen en gedragstesten (bijvoorbeeld balanstest en open veld tests).

Het merendeel van de uitkomstmaten verschilt niet tussen teenknip en controles (tabel 1). Bij rattenpups geknipt op PND4 waren de prestaties in de wire suspension test op PND21 verminderd, wat een lagere grijpkracht indiceert. Een verminderde grijpkracht werd ook waargenomen in volwassen muizen die werden geknipt als pups op PND3, maar niet in muizen geknipt op PND7. Er werd geen teruggroei van tenen gezien en de dikte van het bot in de teen was toegenomen in de teenstompjes.

Bij her-analyse van de primaire data van de geïncludeerde studies (berekend als SMD of RR), vonden we vijf extra significante effecten van de teenknip, namelijk: toename vocalisatie, verminderde motorische activiteit en zwelling na het knippen op PND7 bij muizen, verminderd zwemvermogen als volwassen dier bij ratten geknipt op PND4 (zie figuur 5), alsmede een significante afname van het gewicht (na spenen) voor vrouwelijke pups geknipt op PND7 (figuur 4).

Kwaliteitsbeoordeling

Het risico op bias en de kwaliteit scores van de acht studies met aparte controlegroepen zijn weergegeven in tabel 2 (individuele scores) en figuur 6 (totaalscores). Hoewel randomisatie van toewijzing van dieren aan de experimentele groepen in zeven van deze studies (87,5%; figuur 6A) werd genoemd, werd de methode van randomisatie in geen enkele studie gespecificeerd. In drie van de acht studies (37,5%; figuur 6A) werd vermeld dat de uitvoerder van de experimenten (deels) geblindeerd was voor de behandeling, of dat hij/zij de uitkomstmetingen verrichtte alvorens te controleren tot welke experimentele groep het dier behoorde. In de overige studies werd blinding in geen enkele fase van het experiment genoemd. Géén van de twaalf geïncludeerde studies rapporteerde een onderbouwing van de steekproefgrootte of een powerberekening.

Vanwege de summiere rapportage van maatregelen om bias te verminderen, werden de meeste onderdelen van de risk of bias tool beoordeeld als een onduidelijk risico op bias (figuur 6B). Onvolledige rapportage van randomisering en/of de gebruikte methode leidt tot een onduidelijke risico op selectie, performance en detectie bias (items # 1, 4 en 6). De eigenschappen van de dieren aan het begin van de studie werden adequaat vermeld in twee studies, waarin we de kans op selectie bias als laag hebben geschat (item # 2). In de overige studies werden één of meer eigenschappen niet gemeld, wat leidt tot een onduidelijke risico op bias. Het risico op performance bias (item #5) was in alle studies hoog, omdat oor- en teenknippen in de praktijk onmogelijk te verbergen zijn bij zowel het uitvoeren van de ingreep als het hanteren van het dier daarna. Om deze reden hebben we ook het risico op detectie bias (item #7) hoog gescoord in alle studies, met uitzondering van die studies waarin de dieren niet per definitie werden gehanteerd voor bepaling van de uitkomstmaat. In deze laatste studies was echter onduidelijk of de uitkomstmaat daadwerkelijk geblindeerd was, daarom werden hier een onduidelijk risico op bias gescoord. Attrition bias (item #8) was hoog in één studie, waar het aantal dieren beschreven in de materiaal en methoden niet overeenkwam met dat in sommige van de analyses. Twee studies rapporteerden de uitval van dieren op juiste wijze, waardoor een laag risico op attrition bias werd gescoord. In de resterende vijf studies was het risico op attrition bias onduidelijk. Het risico op andere soorten bias (item # 9) werd laag gescoord in alle studies.

Discussie

Vanwege het verwachte effect op het welzijn van dieren worden de teen- en oorknip over het algemeen beschouwd als controversiële technieken en is hun toepassing beperkt of zelfs afgeschaft in veel dierenlaboratoria. Een overvloed aan richtlijnen is beschikbaar over de teen- en oorknip, alsmede andere methoden voor identificatie en genotypering (e.g. 13-17). Echter, deze richtlijnen zijn tot nu toe niet gebaseerd op een systematisch review van al het beschikbare wetenschappelijke bewijs. Wij voerden het eerste systematische review uit van het bewijs naar het effect van de teen- en oorknip op het welzijn van knaagdieren.

Beschikbaar bewijs en kwaliteit

Studies die onderzoek doen naar de effecten van de teen- en oorknip op het welzijn van knaagdieren zijn schaars en erg heterogeen. Deze heterogeniteit wordt voornamelijk veroorzaakt door verschillen in de populatie (geslacht, stam) en de interventie (leeftijd op moment van knippen, aantal plaatsen geknipt), evenals het grote aantal verschillende uitkomstmaten dat gemeten is. De meeste uitkomstmaten toonden geen effect van teen- of oorknip op ongerief aan. Aan de andere kant zijn er ook uitkomstmaten die wel bewijs voor ongerief aantonen, voor zowel de oorknip (verhoogd ademvolume, vocalisatie en bloeddruk) als voor de teenknip (meer vocalisatie, minder activiteit in pups en minder grijpkracht en zwemvermogen in volwassenen). Echter, meerdere beperkingen van de primaire studies verminderen de betrouwbaarheid van zowel het bewijs vóór als tegen een effect op ongerief en bemoeilijken de interpretatie ervan.

Allereerst is adequate rapportage van de experimentele methode cruciaal om het risico op bias en de kwaliteit van de studies te bepalen. Onze kwaliteitsbeoordeling laat zien dat de rapportage van de dierstudies ontoereikend is. Daardoor werd het risico op de meeste vormen van bias als onduidelijk gescoord. Dit is een punt van zorg, omdat is aangetoond dat het ontbreken van (rapportage van) methoden om bias te verminderen de studieresultaten ernstig kan beïnvloeden. In alle geïnccludeerde studies was sprake van een hoog risico op performance en detection bias, waarmee rekening gehouden moet worden bij het interpreteren van de resultaten.

Het specificeren van een primaire uitkomstmaat voorkomt het aanpassen van de uitkomstmaat op basis van de studieresultaten en daarmee het risico op bias. Echter, geen van de studies definieerde welke uitkomstmaat de primaire uitkomstmaat was. Ook werd er in geen van de studies een power berekening gerapporteerd, terwijl een onderbouwing van het aantal dieren per groep door veel ethische commissies verplicht wordt gesteld. In de powerberekening moeten de primaire uitkomstmaat, het verwachte gemiddelde en de variatie, en het effect dat de auteurs willen detecteren gespecificeerd zijn. Dit voorkomt het onnodig en daarmee onethisch gebruik van te veel of te weinig dieren. Ook kan de lezer de powerberekening gebruiken om te beoordelen of de uitval van dieren op de juiste wijze is gerapporteerd en wat het risico op attrition bias is. Op dit moment is het onmogelijk om te bepalen of de steekproefgrootte in een van de studies toereikend was om een verschil tussen te experimentele groepen aan te tonen.

In één studie was het onduidelijk welke interventie in de controle groep werd toegepast, wat de interpretatie van de resultaten van deze studie bemoeilijkt. In twee andere studies werd een tweede interventie in de controle groep toegepast, die mogelijk meer ongerief bij de dieren gaf en daarmee het effect van de teen- of oorknip kan hebben gemaskeerd. Eén studie gebruikte een cross-over design, waar bij *carry-over* effecten kunnen optreden die interfereren met de onderzochte interventie. Daarnaast tonen we aan dat de data van verschillende uitkomstmaten onvolledig zijn gerapporteerd. Al deze tekortkomingen worden waarschijnlijk (mede) veroorzaakt worden door het feit dat sommige studies niet specifiek ontworpen waren om het effect van de teen- of oorknip te vergelijken met een controlegroep. Echter, dit illustreert nogmaals aan dat studies specifiek ontworpen om het effect van teenknip of oorknip op dierenwelzijn erg schaars zijn.

Als gevolg van bovengenoemde kanttekeningen zijn de resultaten van de verschillende studies niet direct vergelijkbaar met elkaar, en kunnen de resultaten niet geëxtrapoleerd worden naar knaagdieren

In het algemeen. Totdat er meer betrouwbare gegevens beschikbaar zijn kan een effect van teenknip of oorknip op het dierenwelzijn en de onderzoeksresultaten niet worden uitgesloten of bevestigd.

Mogelijkheden voor verfijning

Het bestaande bewijs is te beperkt en te heterogeen om betrouwbaar de invloed van bijvoorbeeld diersoort, leeftijd, geslacht, ras, of de methode van knippen op de ernst van het ongerief te beoordelen. Drie studies deden afzonderlijke analyses voor mannen en vrouwen, maar de effecten verschilden niet tussen de verschillende sexen. Schaeffer et al. vonden dat pups die een teenknip ondergingen op PND3 een lagere grijpkracht hadden dan pups geknipt op PND7. Dit werd toegeschreven aan het feit dat de tenen op PND3 nog deels vergroeid zijn en te klein zijn om nauwkeurig te knippen, waardoor er een te groot deel van de teen verwijderd wordt. Op basis hiervan zou het knippen van de teen voor PND3 niet aan te raden zijn, maar replicatie van dit onderzoek is nodig om dit te bevestigen. Studies waarin de teenknip uitgevoerd werd op PND4 en PND5 rapporteerden dat de procedure snel en eenvoudig toe te passen was, terwijl onze heranalyse van de data van Paluch et al. suggereert dat er ongerief optreedt in zeven dagen oude pups (toename vocalisatie, verminderde motorische activiteit), maar niet in zeventien dagen oude pups. Hieruit concluderen we dat het effect van leeftijd onduidelijk is en dat er verder onderzoek op dit gebied nodig is.

Eén studie onderzocht het toepassen van pijnstillende vapocoolant spray tijdens de teenknip, maar rapporteerde dat deze spray tenen aan elkaar plakte waardoor het risico op onjuist knippen toenam en er een toename was van ongerief en stress door het langduriger hanteren van de dieren. Ook verstoorde de spray de bloedstolling na het knippen. Op basis hiervan is het toepassen van deze pijnstillende spray niet te adviseren, maar verder onderzoek naar mogelijke andere pijnstillers of lokale anesthetica kunnen de moeite waard zijn.

Implicaties voor de praktijk

De voor- en nadelen van de teen- en oorknip en diverse andere identificatiemethoden zijn uitvoerig beschreven door verschillende specialistische onderzoeks- en werkgroepen zoals de FELASA, het Noorse Consensus Platform voor vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven (Norecopa) en de gezamenlijke BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW werkgroep. In het rapport van Norecopa uit 2008 wordt gemeld dat ze geen studies hebben gevonden met fysiologisch of histologisch bewijs waarop beoordeeld zou kunnen worden of pups pijn kunnen ervaren op de leeftijd waarop de teenknip wordt toegepast. Dergelijke studies vonden wij ook niet middels onze systematische zoekstrategie.

Op basis van de beschikbare richtlijnen is er consensus dat de teenknip niet uitgevoerd moet worden na PND7, omdat pups naarmate ze ouder worden steeds actiever worden waardoor het risico op het onjuist knippen en de noodzaak tot fixeren van het dier toeneemt. Dit staat los van de observatie dat botvorming in de teenkootjes voltooid is rond PND18, waarvan verondersteld wordt dat het knippen daarna pijnlijker zal zijn. We vonden echter geen data die deze theorie ondersteunt. Daarentegen wordt het toepassen van de oorknip juist afgeraden vóór PND14, omdat het oor voor die tijd nog te klein is. De oor- en teenknip kunnen dus niet op dezelfde leeftijd worden toegepast en de leeftijd waarop de identificatie nodig is, is dus een essentiële factor bij de keuze voor oor- of teenknip. Dit geldt ook voor de verschillende onderzochte alternatieven, zoals tattoo of microchip voor identificatie en haar of slijmvlies biopoten voor genotypering. De meeste van deze technieken kunnen niet worden gebruikt bij pasgeboren of zeer jonge dieren en kunnen daarom de teenknip niet vervangen. Bovendien lijken sommige van deze technieken meer ongerief te veroorzaken dan de oor- of teenknip. Een andere factor die de identificatiemethode bepaalt is of (en hoeveel) DNA nodig is voor (kwantitatieve of kwalitatieve) genotypering, en of de identificatie permanent of tijdelijk moet zijn.

Toekomstig onderzoek

Dit review toont een aantal belangrijke tekortkomingen van het beschikbare wetenschappelijk bewijs aan die de interpretatie ervan belemmeren: 1) het geringe aantal studies dat specifiek de invloed van de oor- of teenknip op ongerief heeft onderzocht, 2) het ontbreken van standaardisatie van de

uitkomstmaten, 3) onvoldoende (gedetailleerde) rapportage van de onderzoeksmethodologie, in het bijzonder de powerberekening en methoden om bias te verminderen en 4) onvolledige rapportage van uitkomstdata. Daarom is er meer onderzoek nodig om betrouwbaar bewijs van het effect van oor- of teenknip op dierenwelzijn te verkrijgen. Alle hierboven genoemde tekortkomingen moeten in toekomstige studies worden gecorrigeerd.

Ten eerste zullen de toekomstige studies specifiek gericht moeten zijn op vaststellen van het effect van de oor- of teenknip op ongerief bij knaagdieren. Daarvoor moeten ze een passende controlegroep hebben, bij voorkeur één groep waarin dieren geen enkele behandeling ondergaan (ten einde een baselinemeting te verkrijgen) en één waarin dieren een sham behandeling ondergaan waarbij ze gehanteerd en gefixeerd worden. Er dienen geen co-interventies toegepast te worden. De dieren dienen onder dezelfde omstandigheden behandeld en gehuisvest te worden. Verder is het onduidelijk of karakteristieken zoals diersoort, stam, geslacht en leeftijd van invloed zijn op de uitkomstmaten. Toekomstig onderzoek zal specifiek opgezet moeten zijn om dit betrouwbaar te kunnen onderzoeken. Ten tweede is het noodzakelijk dat onderzoekers al bij het indienen van een voorstel voor nieuwe dierexperimenten een argumentatie voor de gekozen uitkomstmaten geven, inclusief gegevens over reproduceerbaarheid en het optimale tijdstip van meten. Idealiter zou de relevantie en de reproduceerbaarheid van de uitkomstmaten betreffende het beoordelen van ongerief bij pups en volwassen knaagdieren gevalideerd en bediscussieerd worden onder de deskundigen zodat methoden gestandaardiseerd kunnen worden. Multi-center studies kunnen mogelijkheden bieden om de power en standaardisering van toekomstige experimenten te vergroten.

Tot slot laten we in dit review de noodzaak zien van het verbeteren van (de rapportage van) de methodologische kwaliteit van de dierstudies. De ARRIVE richtlijn en de Gold Standard Publication Checklist (GSPC) werden in 2010 gepubliceerd, maar de kwaliteit van de geïnccludeerde studies was laag, ongeacht het jaar van publicatie. We wijzen erop dat de ARRIVE richtlijn en de GSPC niet specificeren hoe gedetailleerd de gebruikte methoden om bias te verminderen gerapporteerd moeten worden. De risk of bias tool van SYRCLE geeft aanwijzingen voor het rapporteren van deze methoden in verschillende stadia van een experiment. Dit is voor onderzoek naar de oor- of teenknip van groot belang, omdat deze interventies moeilijk te blinderen zijn, waardoor het risico op bias groot is. Het rapporteren van een powerberekening zou verplicht moeten zijn voor toekomstige studies. Tot slot is complete rapportage van de data van alle uitkomstmaten, in het artikel, bijlagen, of in *data repositories*, essentieel om in de toekomst betrouwbare conclusies te kunnen trekken in het belang van wetenschap en dierenwelzijn.



Norecopa
c/o National Veterinary Institute
P.O. Box 750 Sentrum
0106 Oslo
Norway

www.norecopa.no

Correspondence to: Adrian Smith (adrian.smith@vetinst.no)

15. December 2008

Toe clipping in mice: an evaluation of the method and alternatives

1. Background.....	2
2. Introduction	2
3. Terms in use.....	3
4. Methods of identification	4
1. Toe clipping	4
2. Ear punching.....	5
3. Earmarking with metal tags	6
4. Tail clipping	6
5. Tattooing.....	7
6. ID-chip (transponder).....	7
7. Blood sampling	8
8. Application of dye to the skin, hair clipping etc.....	8
9. Saliva/epithelial cells from the buccal cavity	8
10. Rectal scrapings/faecal samples.....	9
11. Removal of hair follicles	9
12. Earprint.....	9
5. Research on toe clipping and other methods	10
6. Important considerations when choosing a technique	11
7. Practice in other countries	14
8. Conclusions	16
9. Literature	17

1. Background

1. On 2 May 2008 the Norwegian Animal Research Authority (Forsøksdyrutvalget, FDU) forwarded to the Norwegian Food Safety Authority (Mattilsynet, MT) a complaint made about their decision of 26 February 2008 to allow toe clipping as a method for the identification and genotyping of genetically modified mice. FDU had set the following conditions for their decision:
 - a. toe clipping must be performed before the age of 10 days
 - b. only one toe on each hindleg must be clipped
 - c. the toe must be anaesthetised with a local anaesthetic (gel or dip method) before clipping
 - d. Clipping must be performed before bone tissue and periosteum have been formed.

In the application for animal research upon which FDU made their decision, it was specified that clipping was to be performed no nearer the body than the first toe joint. The method should therefore be referred to as *toetip clipping*. FDU considered other methods such as ear marking to be equally severe procedures, at least. FDU were aware of studies on the effect of toe clipping at the University of Zurich and will compare these findings with the results from studies on other marking methods. Based on available knowledge and experience, FDU concluded that they could not see that toe clipping, under the conditions described above, is particularly burdensome compared with other identification techniques.

2. In a letter to Norecopa dated 1 January 2008, FDU requested an evaluation of the different strategies for toe clipping rodents (time for clipping, how far on to the toe should be clipped, the number of feet where toes should be clipped, the number of toes that should be clipped per foot) in relation to other relevant methods for marking and tissue sampling, as regards both animal protection and ease of use. On 11 August 2008 Norecopa replied that it was willing to undertake the task. An early draft of its conclusions were discussed at Norecopa's board meeting on 17 September 2008.
3. In a letter dated 24 September 2008, MT accepted the complaint lodged against toe clipping and reversed the decision made by FDU. MT pointed out that removal of a body part is against the principles embodied in the Norwegian Animal Protection Act, that animals should be given the benefit of the doubt, and that scientific studies are underway to evaluate the methods available. MT questioned the claim that neonatal animals do not feel pain. Until the results of ongoing studies are available, MT wished to be restrictive.

2. Introduction

Reliable and repeatable identification of individuals with a minimum of stress to the animal is an elementary and necessary factor in the quality assurance of most animal experiments. The increasing use of genetically modified animals in laboratory studies, where large numbers of animals are bred in the hope of producing individuals with the desired genotype, has created a need for individual marking and tissues-sampling of as young animals as possible, for

practical and economic reasons. Early humane killing of surplus animals can be claimed to have ethical advantages, because it eliminates the risk of suffering in individuals which will not be used in experiments anyway.

There are few published studies on methods that can be used for tissue sampling in young genetically modified animals, and even fewer behavioural studies of the effects which these methods have on the animals in the longer term.

It is important to differentiate between quantitative and qualitative genotyping. When new transgenic mouse lines are established, it is often desirable to be able to measure quantitatively how the gene of interest has been incorporated into the genome (the number of copies and location). For these measurements a method like Southern blotting is used. In established lines, it is usually sufficient to detect the gene qualitatively (to see if the animal is transgenic or not) and in these cases methods such as PCR, which are based on the amplification of DNA from very small samples, can be used. In other words, the aim of the tissue typing decides how much tissue one needs to take from the animal. A range of relatively non-invasive methods for DNA-sampling for PCR testing have been developed. In the case of quantitative tissue-typing, however, invasive methods have to be used, that in reality consist of amputations: tail clipping and toe clipping.

The decisions made in research communities in Norway and abroad on the choice of method appear largely to have been made without a solid base of comprehensive and complete scientific studies, and are to a large degree a result of the researchers' subjective opinions or assumptions, based in turn on extrapolations from human experiences. A review of the literature reveals that descriptions of toe clipping are more positive in older publications and guidelines. Norecopa has not found histological or electrophysiological studies of the innervation of the toes in rodents, that could provide an anatomical or physiological basis for assessment of the animal's ability to experience pain when toetip-clipping is performed at the age in question.

It is a generally recognised concept in modern laboratory animal science that choice of method should be based on an evaluation of several factors:

- the method's scientific quality and reproducibility
- the effect which the method has on the individual on which it is used

Both these two factors should be prioritised before practical and economic considerations.

In Norecopa's opinion there is a need for similar evaluations of the methods used for identifying and tissue-typing wildlife (<http://www.nc3rs.org.uk/category.asp?catID=79>) and fish (<http://oslovet.veths.no/gardermoen.pdf>) in research.

3. Terms in use

The Norwegian Regulation on Animal Experimentation §2 gives guidelines for what can be defined as 'simple marking of animals'. Methods for marking animals are not defined as animal experiments as long as there is no 'reason to assume that the experiment will affect the animal's normal way of life, or cause other than slight pain or discomfort of a highly temporary nature'. This type of division into regulated and non-regulated procedures exists in a number of other countries, such as Great Britain:

'Blood or DNA sampling solely to establish the identity or provenance of an animal would not be regulated if the intervention caused no more than momentary discomfort or distress.'

Methods of marking or identification, such as toe clipping, which can cause suffering in excess of this threshold, are regulated when carried out for an experimental or other scientific purpose. (www.nc3rs.org.uk)

Toe clipping has been commented upon in the mass media in Norway, in these articles, among others:

1. Researchers want to mutilate mice (Norecopa's translation) (www.nrk.no/nyheter/distrikt/ostlandssendingen/1.5879860).
2. A letter to the editor of Aftenposten 10.06.08 from Bodil Ekerhovd Damsgaard, Oslo, who claims that toe clipping reduces the animal's ability to climb and groom itself.
3. A letter to the editor of Aftenposten 14.06.08 from Janicke Nordgreen and Torunn Fosse, Norwegian School of Veterinary Science, who point out that it is the degree of development of the nervous system that determines whether or not a newborn mouse can feel pain, not the size of the sample taken or the degree of skeletal ossification. The authors also point out that research indicates that the body's mechanisms for reducing painful stimuli are probably not fully developed at birth, such that stimuli may be more painful to newborn animals than they are to adults. In addition, pain experienced in the neonatal period may be "remembered" by the central nervous system, so that the animals show increased sensitivity to pain later in life.

These articles in the media do not always give a precise description of the method for which FDU gave permission, see section 1.1 above.

4. Methods of identification

In this section, the advantages and disadvantages of the different methods for identification and tissue-sampling are briefly described.

1. Toe clipping

Advantages:

- It is a permanent identification method with a low risk of misidentifying individuals (Kumar, 1979)
- It provides enough DNA for quantitative genotyping
- It allows the identification of desirable genotypes before weaning (Nadon & Draeger, 1996)
- It has been reported that the tip of a toe on the forelimb of a mouse will grow out again if the amputation is performed distal to the outermost joint (Borgens, 1982)
- The method is simple and cheap. It must, however, be performed carefully if only the tissue distal to the outermost joint is to be removed
- The method requires minimal restraint of the animal (the animal's hindquarters are lifted up by gripping the base of the tail, or the animal is lifted by the skin of its neck in the same way as young are transported by their dams)
- Local anaesthesia of the foot can easily be carried out using a spray
- Inspection of the toeclip is quick and easy, with small chances for misidentifying two animals

Disadvantages:

- There is reason to believe that the method is painful, regardless of whether the toe contains bone or cartilage at the time, and the animal will experience pain after the procedure, even if analgesics or anaesthetics are used
- There is some behavioural evidence of reduced welfare after toe clipping (Iwaki *et al.*, 1989)
- It may be assumed that mice use all their toes for normal locomotion, including climbing, and that some degree of locomotory impediment arises after toe clipping. Mice in cages appear, however, primarily to use their forelimbs when climbing. The removal of one toetip on one hindleg will probably have limited effect on their ability to climb. On the other hand, the toe stump will be in more or less continuous contact with the cage floor after the procedure, unlike the situation if tail clipping is performed

2. Ear punching

Advantages:

- The method is similar to earmarking used in farm animals, which is a standard practice and therefore generally accepted
- The method is considered to cause less discomfort than tail or toe clipping, because it is performed in an area without bone formation
- The technique provides tissue for qualitative genotyping
- The size of the hole can be reduced to 0.5 mm and still give enough tissue for PCR (Hawkins *et al.*, 2006)

Disadvantages:

- The method is likely to be painful, even though the ear contains cartilage and not bone. The animal will probably experience pain after the procedure, even if painkillers are used during the procedure
- The method cannot be used for quantitative genotyping
- Problems with reading the ear punches are common, particularly if there has been fighting in the cage, since some management systems require the use of more than one hole per ear. Animals can easily be confused using this technique, which may in turn lead to the use of more animals in a study
- The ear that has been punched may become the target of aggressive behaviour in the cage and the ear may be torn into pieces
- Ear punching requires considerable restraint of the animal, since the operator will want to avoid being bitten in the process
- Animals cannot be ear punched before they are 14 days of age, since the ears are too small to be marked without causing extensive damage to the ear
- The ear is given a permanent perforation, which reduces its thermoregulatory function and the ability to localise sound. The outer ear is an important organ in the mouse for the reduction of body temperature following exertion, since these animals cannot lose water vapour by gasping or sweating

- Local anaesthesia of the ear is difficult because of its proximity to the ear canal and eye

3. Earmarking with metal tags

Advantages:

- The method is the equivalent of earmarking domestic animals, and is therefore generally accepted
- The method is likely to cause less discomfort to the animal than toe clipping as an identification technique, because it takes place in an area without ossification
- It is an unequivocal method of identification

Disadvantages:

- The method is considered to be painful, even though the ear contains cartilage and not bone. The animal will probably experience pain after the procedure, even if painkillers are used during the procedure itself
- Ear tags have to be placed where the cartilage is thickest. This necessitates long experience if they are to be placed correctly in mice
- For this reason, ear tags frequently fall out. If this happens on two animals in the same cage, both must be marked a second time
- Ear tags can result in the ear being caught on cage furniture
- Ear tags can become a target for aggressive behaviour in a cage, with the risk of them being ripped out
- This method does not provide tissue for genotyping
- Animals cannot be tagged before they are 14 days of age, because the ears are not big enough
- The method requires considerable restraint of the animal
- The weight of the tag results in the ear hanging in a lower position than normal, which reduces its function in thermoregulation and the localisation of sound
- Anaesthesia is difficult because of the proximity to the ear canal and eye

4. Tail clipping

Advantages:

- The method provides enough DNA for quantitative genotyping
- It enables animals with a genotype of interest to be identified before weaning
- The method is simple and cheap
- Experience indicates that the method is less painful than ear punching if no more than 5 mm of the tail are removed
- The method is quick and does not require a form of restraint that stresses the animal

Disadvantages:

- The method is likely to cause pain, regardless of whether the tail contains bone or cartilage, and the animal will probably experience pain after the procedure. It is possible that the pain during and after the procedure can be reduced by using

anaesthesia, and this should be investigated more closely. It must also be assumed that suffering after the procedure can be reduced by treatment with painkillers

- The tail is an important organ for balance and grasping, and a degree of locomotory impairment will arise after this procedure if significant lengths of the tail are removed, for example by serial sectioning
- Removal of only the very tip of the tail will on the other hand have minimal effects on locomotion
- There is a danger of bleeding if the technique is used on older animals. Repeated tail sectioning is therefore not recommended
- The method must be combined with a means of identification

5. Tattooing

Advantages:

- It is a permanent method of identification with little risk of misidentifying individuals
- The method can be used on very young individuals, for example on the palm of the paw (Honma *et al.*, 1986)

Disadvantages:

- The method is difficult to use on animals with pigmented skin
- It does not provide tissue for genotyping
- The effect of tattooing on the toes and palms of small rodents has not been sufficiently investigated
- Tattooing is experienced as painful in humans and the same must be assumed for rodents
- The method can result in activation of the immune system due to uptake and storage of dye particles in tissue macrophages. This is an undesirable factor in many animal experiments

6. ID-chip (transponder)

Advantages:

- This is a permanent method of identification with no risk of misidentifying individuals
- Smaller transponders have been developed in recent years (e.g. Nonatec, www.nonatec.net) which may be assumed to cause a minimum of discomfort. These can be used on young animals
- The transponder is implanted under the skin of the neck, which is an area where the animals are grasped by their dams when they are moved around the cage. It may therefore be assumed that this procedure causes a minimum of fear

Disadvantages:

- The method does not provide tissue for genotyping
- The method requires equipment, including a scanner that supports the system used in the transponder. Differences between systems can cause problems when animals are moved from one laboratory to another

- The larger transponders are likely to be burdensome for small individuals. The needles used to implant the transponder are large and analgesia should be used during implantation
- There is some evidence of an increased frequency of cancer in rodents that have been implanted with transponders (<http://en.wikipedia.org/wiki/VeriChip>)
- The transponders can cease to function after a while
- The transponders can wander under the skin, making it difficult or impossible to scan them

7. Blood sampling

Advantages:

- The method does not involve the removal of part of the animal's exterior organs

Disadvantages:

- Blood sampling in small animals is technically demanding and can result in pain and discomfort
- The method must be combined with a means of identification
- The method provides little tissue for genotyping and is most suitable for research where groups of animals are to be separated based on the phenotype of their blood cells
- The method requires some equipment and experienced operators

8. Application of dye to the skin, hair clipping etc.

Advantages:

- There is little risk of misidentifying individuals if the operators use a standard system
- The methods are animal-friendly, simple and cheap

Disadvantages:

- The methods do not provide tissue for genotyping
- Dyes can be rubbed off and frequent handling is necessary to apply more dye or to clip the hair
- In toxicological studies, the use of chemicals that can penetrate the skin should be avoided
- The chemicals may affect the other animals in the cage if they lick each other

9. Saliva/epithelial cells from the buccal cavity

Advantages:

- The method is animal-friendly in individuals that are sufficiently large (Irwin *et al.*, 1996).
- The method provides DNA for qualitative genotyping (Zhang *et al.*, 2006)
- Extraction of DNA from the sample is faster than when using ear punching, tail clipping or toe clipping (Meldgaard *et al.*, 2004; Mitrecić *et al.*, 2008)

Disadvantages:

- The method can only be used for qualitative genotyping (PCR)
- The method must be combined with a means of identification
- There is a risk of contamination by DNA from the mother's milk or mammary glands
- The method is burdensome for young mice
- There is a risk of contamination between animals because they lick each other and consume each others' faeces. The method is therefore not suitable when several animals are housed in the same cage

10. Rectal scrapings/faecal samples

Advantages:

- The methods are animal-friendly and cheap
- Extraction of DNA from the samples is faster than with ear punching or ear/toe clipping (Murgatroyd *et al.*, 2006)

Disadvantages:

- The methods must be combined with a means of identification
- The chance of contamination of faecal samples, or confusion between animals, is great, unless the samples are collected directly from the individual, which is a time-consuming process
- The samples contain DNA from a range of other sources than the animal itself
- Rectal scrapings cannot be performed on very young animals
- The method has not been used extensively, particularly on young animals

11. Removal of hair follicles

Advantages:

- The method is relatively animal-friendly and cheap
- Hair plucking requires minimal restraint

Disadvantages:

- The method must be combined with a means of identification
- Mouse hair easily becomes charged with static electricity, which can result in contamination between individual, either due to hair moulted from other animals or because of insufficient cleaning of equipment between samples. The method is, however, suitable for sampling just a few animals, for example in cases of repeated genotyping
- The method is unsuitable for small animals that have little hair

12. Earprint

This is a new method, inspired by the use of fingerprinting in humans, based upon photography and interpretation of the pattern of blood vessels in the ear of rodents (Cameron *et al.*, <http://www.nc3rs.org.uk/news.asp?id=675>).

Advantages:

- The method is animal-friendly, rapid and non-invasive

Disadvantages:

- The method is still under development and requires special equipment
- Some readings are of insufficient quality to enable definite conclusions to be reached and the animal has to be re-photographed
- The method does not provide DNA for genotyping

5. Research on toe clipping and other methods

Little research has been published on toe clipping.

1. Vachon (1998) studied the anatomical changes following amputation of the distal end of the first bone at approx. 2 weeks of age. Complete healing of the bone and the overlying skin was observed, but changes in the normal architecture of the bones were observed. Ossification occurred on day 18. No problems were observed after amputation but the author pointed out the need for studies of the innervation of the area and the possible risk of inflammatory reactions.
2. Cinelli *et al.* (2007) did not evaluate toe clipping, but they compared the effects of many biopsy techniques using telemetry of body temperature and heart rate, and locomotory patterns. They concluded that restraint was the most important stress factor for the animals and that hair samples were difficult to handle because of the risk of cross-contamination. Ear marking was the method that gave the greatest and most longlasting effects on the parameters they measured, but all the same it was considered to be the best method since it functioned both as an identification technique and a biopsy method. The authors pointed out that buccal and rectal scraping often resulted in bleeding and could therefore not be reckoned as non-invasive methods, neither did they give a different stress response than the other methods investigated.
3. Arras *et al.* (2007) studied the effect of tail clipping with or without anaesthesia on a range of physiological parameters in adult mice. They concluded that anaesthesia did not reduce the effects of tail clipping on a range of physiological parameters, and that tail clipping affected these parameters less and for a shorter period than did anaesthesia alone. In a short description of the histology of the tail, they reported that there was little difference between sections taken 2, 6 and 10 mm from the tip, except for a gradual reduction in the number of nerve fibres further away from the body.
4. Hankenson *et al.* (2008) have recently published a study of ossification, DNA-content and acute behavioural response to tail clipping (various lengths) in 6 mouse lines between 3 and 42 days of age. The authors concluded that the optimal time for harvesting DNA was 14-17 days of age.
5. The European laboratory animal science organisation FELASA (www.felasa.eu) has appointed a working group that is comparing the various methods for identification of rodents. The first phase of their work is a pure literature study. Their conclusions are not available yet.
6. FELASA has also appointed a working group to investigate the possibilities that exist for refining the methods used to genotype genetically modified rodents. The deadline for this report is December 2009.

7. A research group in Utrecht is in the process of comparing tattooing with toe clipping in newborn rodents.
8. Researchers in Uppsala are working on a comparison of toe clipping and earmarking in various mouse strains.

The conclusion that must be drawn is that a number of studies are in progress, but at the present time there are few results of scientific experiments that are of relevance to the current topic.

6. Important considerations when choosing a technique

1. Norecopa is of the opinion that both scientific, legal and ethical considerations should for the basis of judgement when a procedure to be used on an experimental animal is evaluated. As an aid to this process, the "3 R's" of Russell & Burch (1959) and the "3 S's" of Carol Newman (cited in Öbrink & Waller, 1996) may be used:
 Replace, Reduce, Refine
 Good Science, Good Sense, Good Sensibility
2. Any pain or suffering involved is experienced by the individual, regardless of the number of animals used.
3. The total burden placed on the animal in its lifespan should be considered. If a procedure carried out at one phase can eliminate the need for further harmful procedures later, then it should be considered, even if in itself it is a burden to the animal.
4. The advantages of tranquillisers/sedatives or anaesthetics must be weighed against the stress imposed by the handling necessary to administer these drugs, or the drugs themselves. This stress may be greater than the stress of the procedure itself, but optimal use of tranquillisers/sedatives can also contribute to a reduction of the burden on the animals. This must be assessed in each specific case. The Norwegian Regulation on Animal Experimentation §14 states that 'should there not be reason to assume that the intensity of pain experienced in an experiment exceeds the pain intensity of anaesthesia, anaesthesia may be omitted'.
5. The aesthetic aspect of the amputation of parts of a body organ is important for many people, and traditional methods such as earmarking are more generally accepted in general opinion.
6. The Norwegian Animal Protection Act is in general restrictive to amputations. The Act forbids tail docking, beak clipping of chickens and ear cropping of dogs. The present Act is to be replaced in the near future by a new Animal Welfare Act. The restrictive attitude to amputations is present in the draft of the new Act. Although the Norwegian Regulation on Animal Experimentation allows procedures to be performed that are normally forbidden in society's use of animals, in Norecopa's opinion the research community should be especially cautious in employing techniques that fall into that category.
7. Toe clipping is in Norecopa's opinion within the category of identification and sampling techniques where, according to the Norwegian Regulation on Animal Experimentation (§2) 'there is reason to assume that the experiment will affect the

animal's normal way of life, or cause other than slight pain or discomfort of a highly temporary nature.'

8. Toes are more or less in contact with the ground at all times, in contrast to other organs under discussion, such as the tail and ears.
9. A central factor in the evaluation of toe clipping is whether there is a real need for large amounts of tissue for genotyping at the age of 1-10 days. This should be assessed in each case and should be made clear in the application for the animal experiment. Is there really a need for DNA at this age at all, or is the desire for tissue sampling based solely upon practical or economic considerations, or the claim of behavioural advantages by removing unwanted animals from a colony as quickly as possible?
10. Especially when invasive methods are used for sampling, any excess tissue should be stored so that the genotype can if necessary be characterised again without having to take a new sample. The size of the tissue sample should always be adjusted to the test method to be used, so no more tissue than necessary is removed.
11. Colonies of genetically modified animals are often large. It will always be tempting to choose methods (clinical studies, identification techniques, sampling procedures etc.) that are cheap and easy to perform.
12. There are a number of arguments for genotyping the animals in a genetically modified colony as early as possible:
 - a. Unwanted animals can be humanely killed before weaning, reducing the number of cages, number of animals, risk of suffering caused by disease outbreaks and the occurrence of fighting/injuries, as well as the work burden on the employees
 - b. The removal of some individuals from a litter will result in more milk being available, and will reduce stress, for the remaining young. In this way even the weakest can survive. These are often the genetically modified animals (e.g. homozygote knockouts), that have the greatest need for extra milk in this critical phase. Smaller litters result in larger and more robust young at weaning, and this is a significant argument in the improvement of breeding techniques for genetically modified and mutant animals.
 - c. The dam is often pregnant at the time when toe clipping is to be performed, so there is less pressure on her if unwanted young are removed from the home cage (the psychological effects of the loss of these young must however also be taken into consideration). The tissue in the toes and tail tip of mice consists of cartilage, not bone, in the first two weeks of life, so toe and tail clipping at that age are probably comparable to the use of ear punching in older animals as regards the experience of pain.
 - d. Demands for effectivity should not be a main argument for choice of method, particularly if the method is considered to be a burden to the animals. Effective procedures are, however, often of little burden to animals, as they involve the minimum of restraint and therefore reduced stress. The effective management of a research animal unit is also about housing as few animals as possible, for as short a time as possible.
13. Opinions on the experience of pain in newborn animals (and humans) has coloured the debate on whether the more invasive methods are defensible or not. Experience of pain (and therefore suffering) is conditional on two things: the nervous system must be

developed, so pain stimuli reach the brain cortex, and the animal must be conscious. Based upon measurement of the brain's electrical activity (EEG), Diesch *et al.* (2007) divide animal species into three different groups, depending upon how mature their nervous system is at birth. Marsupials (such as the kangaroo) are extremely immature at birth and conscious experience of pain is probably not developed until the animals are 120-180 days old. In other species (e.g. sheep), higher brain activity can be measured approximately 30 days before birth, but the lambs are maintained in a sleep-like state in the uterus by means of a range of substances produced in the brain. Behavioural studies show that these animals develop a full pain response gradually during the first week of life.

Rodents probably occupy a position between these extremes. Diesch *et al.* (2007) cite studies which Ellingsen & Rose (1970) conducted on the electrical activity in the brain of young rats, and concluded that the animals did not show neurophysiological signs of the conscious experience of pain before 12-18 days after birth. From their own studies on young rats whose tails were clamped under anaesthesia, Diesch *et al.* concluded that conscious experience of pain does not normally occur earlier than 10-12 days after birth, with a gradual maturation process thereafter which lasts about one week.

One should all the same be cautious in exposing animals to painful stimuli during the phase when the nervous system is apparently still under development: studies on boys that were circumcised without anaesthesia revealed that they exhibited oversensitivity to the pain of vaccination up to 6 months later (Fitzgerald & Anand, 1993). In addition, there is evidence that the central nervous system is more (rather than less) sensitive to painful stimuli shortly after birth compared to later in life.

It is unclear how much analgesia is achieved by applying local anaesthesia during toe and tail clipping, or whether (and for how long) painkillers should be given after the procedure. There are practical problems in dosing these preparations to very young animals.

Studies of the brain's electrical activity in young rats cast doubts as to whether animals under 10 days of age are capable of the conscious experience of pain. This does not, however, rule out the possibility that these animals may feel pain later, even if anaesthesia has been used. Insufficient studies have been carried out to be able to assess whether the removal of the outermost joint of one toe affects the animal's normal way of life (e.g. climbing) or creates more than 'slight pain or discomfort of a highly temporary nature' (Norwegian Regulation on Animal Experimentation, §.2), e.g. in the form of the phantom pains that are described in humans following amputations, despite postoperative analgesic treatment. Neither is it possible to conclude whether the removal of a tail tip or a piece of the ear results in less pain than toe clipping. None of the methods are unproblematic. Tail clipping, on the other hand, differs from toe clipping in that it does not affect an organ that is in continual contact with the ground. The ears are too small in mice of the age in question to give enough tissue for quantitative genotyping.

7. Practice in other countries

There are few science-based reports from working groups that have evaluated the different methods of identifying and tissue sampling.

The *Joint Working Group on Refinement (JWGR, 2003)* in Great Britain recommended as a matter of principle that consideration should be taken to:

- a. The source of the tissue
- b. The size of the piece of tissue that is to be removed
- c. The age of the animals
- d. The need for local or general anaesthesia

The Group pointed out that the least invasive method should be used, and as little tissue as possible should be taken. Many of the least invasive methods are not used because there are traditions for using the more invasive ones, despite the existence of publications describing less invasive methods. Procedures should be reassessed regularly. The method used for genotyping should be discussed: Southern-blot hybridisations need more DNA than PCR techniques, but can be unavoidable if the number of transgenic copies must be identified. PCR should always be considered for routine genotyping of colonies, but it is important to avoid cross-contamination with other DNA.

In cases where both identification and genotyping are needed, the JWGR recommends the following (combined, if necessary, with an identification method):

	<2 weeks	3-4 weeks	>4 weeks
Saliva or faeces	✓	✓	✓
Tail clipping	✓/X	✓	✓/X
Ear punching	X	✓	✓
Blood	X	✓	✓
Toe clipping	X*	X	X

X: only in exceptional cases*

The JWGR was of the opinion that toe clipping probably incurs pain and can reduce the animal's ability to grasp or groom. The Group concluded that it must not be used as a routine method of identification or tissue sampling for genotyping. In rare cases it may be unavoidable, e.g. where there are good scientific reasons for identifying mice of less than 14 days that are kept in isolators because of infection. In these cases, toe clipping may be the only practical method because of the animals' size and the need for biosecurity. Toe clipping should only be used as a last resort, and only one toe should be removed from one hindleg, under local anaesthesia. The tissue that is removed should be used for genotyping and the animals should not be subjected to further biopsy procedures. The method must not be used on animals older than 14 days, because other methods such as ear punching are then possible.

The JWGR mention several references in their guidelines on tail clipping, which Norecopa considers to be relevant when assessing toe clipping. The tail vertebrae begin to ossify at 2-3 weeks of age. There is evidence in the literature that there is bone substance even in the last millimetre of the tail. The skin and periosteum are rich in nervous tissue, and the JWGR concludes that tail clipping must be considered to be very painful, particularly when bony tissue is cut.

1.2
6.2
+
6.3
+
6.4
+
6.5
+
6.6
+
6.7
+
6.8

Norecopa's secretary has discussed the matter with the chair of the JWGR committee, Professor David Morton, UK. He recommends tail clipping (3-5 mm of tissue), which should normally be performed on mice before they are 2 weeks old and under full inhalational anaesthesia (e.g. isoflurane, N.B. not ether). Half of the sample DNA should be stored in case the tissue has to be retested, to avoid repeating the procedure (personal communication, cited with permission).

The ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC, 1996), which is used by, among others, the accreditation body AAALAC International (www.aaalac.org) states that toe clipping should only be used as an identification method in small rodents when no other method is possible in practice, and even then only be performed on 'altricial neonates'.

The Canadian organisation CCAC (Canadian Council on Animal Care, www.ccac.ca) have produced guidelines for the care of transgenic animals (1997) but these do not give specific recommendations on techniques for identification or tissue sampling.

An Internet search reveals that many local ethical committees describe the use of toe clipping. Some, such as the *Guidelines for biopsy procedures to facilitate identification and DNA-based molecular genotyping of rodents* from Emory University (2001) allow toe clipping on 8-12 day old animals without anaesthesia. In many cases, however, toe clipping is described as a method for identification alone, and is in such instances often cautioned against, with advice on using less invasive methods like tattooing or the use of transponders. This impression is supported by the replies that Norecopa has received to a posting on an international discussion forum for the laboratory animal community (CompMed) managed by the American laboratory animal science organisation AALAS.

8. Conclusions

1. Quantitative genotyping creates a need for relatively large amounts of DNA and therefore the use of invasive methods of tissue collection. This means in reality that amputations have to be performed on living animals. Amputations should therefore only be performed when tissue for quantitative genotyping is needed to characterise new genetically modified lines. Norecopa's Board believes that this principle should also apply to wild animals and fish. Amputations should not be accepted as routine methods and special permission should be sought from the regulatory authorities to use them. Less invasive methods that need less DNA should therefore always be used for routine genotyping. It should be emphasised that animal protection organisations are in principle against amputations.
2. There are only two established methods that give sufficient tissue for quantitative genotyping of transgenic lines: tail clipping and toetip clipping. Although toetip clipping has the advantage that it also functions as an identification method, it is assumed to be more of a burden than tail clipping for the animal because it affects the locomotory apparatus which is more or less continually in contact with the ground. There are simple, non-invasive marking methods that can be combined with tail clipping, for example the application of a coloured dye to the skin in the armpits.
3. Norecopa's Board has registered that few institutions use toe clipping for genotyping, and that there is greater resistance to toe clipping than there is to tail clipping, even though both methods are controversial. The majority have replaced toe clipping as an identification method with other procedures, also for animals under 10 days of age, in agreement with the conclusions in the British JWGR report and the American ILAR Guide.
4. Norecopa's Board is therefore of the opinion that toetip clipping, even with the refinements described in FDU's decision, should not be permitted. In those cases where it is absolutely necessary to undertake quantitative genotyping, tail clipping should be used (3-5 mm performed only once per animal) under anaesthesia, and with post-operative analgesia as long as this does not in itself create a greater burden for the animal. Further studies should be performed to identify the optimal anaesthesia and analgesia for the various methods of identification and tissue sampling. In cases where qualitative genotyping is adequate, less invasive methods should be employed, such as the collection of saliva, blood, faecal or hair samples, or (in larger animals) the material removed by ear punching.

The minority of the Board has expressed their disagreement with this conclusion:

There is no evidence today that amputation of the tip of a toe is worse than amputation of the tip of the tail. Therefore toetip clipping should be permitted in situations where it is necessary to undertake genotyping at an early age. Early genotyping is necessary in cases where weak

offspring will have far better survival rates as soon as the litter size is reduced, in studies where genotyping is necessary before 14 days of age, or in cases where breeding is conducted in an isolator in connection with infection models. If the study design does not permit marking methods such as the use of pens, tattooing or other substances that will affect the study (e.g. toxicological, immunological or carcinogenic studies), toe clipping will function as a combined identification and biopsy method that together results in the least possible burden on the animal.

9. Literature

1. Arras M, Roneich A, Seifert B, Käsermann HP & Rülcke T (2007): Should laboratory mice be anaesthetized for tail biopsy? *Laboratory Animals*, 41: 30-45.
2. Borgens RB (1982): Mice regrow the tips of their foretoes. *Science*. 217(4561): 747-50.
3. Cameron J, Jacobson C, Nilsson K & Rögnvaldsson T. Identifying laboratory rodents using earprints. <http://www.nc3rs.org.uk/news.asp?id=675>
4. CCAC Guidelines on transgenic animals (1997). www.ccac.ca
5. Cinelli P, Roneich A, Seifert B, Bürki K, and Arras M (2007): Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Lab Anim* 41(2): 174-184;
6. Diesch TJ, Mellor DJ, Johnson CB & Lentle RG (2007) Responsiveness to painful stimuli in anaesthetised newborn and young animals of varying neurological maturity (wallaby joeys, rat pups and lambs) AATEX 14, Special Issue, 549-552. Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August 21-25, 2007, Tokyo, Japan
7. Ellingsen RJ & Rose GH (1970): Ontogenesis of the electroencephalogram. I. Developmental Neurobiology, s. 441-474. Ed. WA Himwich. Illinois: Charles C Thomas Publisher
8. Emory University Guidelines for Biopsy Procedures to Facilitate Identification and DNA-Based Molecular Genotyping of Rodents. <http://www.emory.edu/IACUC/pdfs/BiopsyPolicy.pdf>
9. FELASA working group on Rodent Identification. www.felasa.eu
10. Fitzgerald M & Anand KJS (1993): Developmental neuroanatomy and neurophysiology of pain. I Schechter NL, Berde CB & Yatsers M (red.): Pain in infants, children and adolescents, sider 11-32. Baltimore: William and Wilkins.
11. Hankenson FC, Garzel LM, Fischer DD, Nolan B & Hankenson KD (2008): Evaluation of tail biopsy collection in laboratory mice (*Mus musculus*): vertebral ossification, DNA quantity, and acute behavioral responses. *J. Amer. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 47:10-18.
12. Hawkins P, Felton LM, van Loo P, Maconochie M, Wells DJ, Itinison N, Hubrecht R & Jennings M (2006): Report of the 2005 RSPCA/UFAW Rodent Welfare Group meeting. *Lab Animal* 35(9): 29-38.
13. Honma M, Iwaki S, Kast A, Kreuzer H. (1986): Experiences with the identification of small rodents. *Jikken Dobutsu*. 35(3): 347-52.

14. Irwin MH, Moffatt RJ, Pinkert CA. (1996): Identification of transgenic mice by PCR analysis of saliva. *Nat Biotechnol.* 1996, 1094.
15. Iwaki S, Matsuo A, Kast A. (1989): Identification of newborn rats by tattooing. *Lab Anim.* 361-4.
16. BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement (2003): Refinement and reduction in production of genetically modified mice. *Lab. Anim.* 37 (Supplement 1), S1-S1. <http://www.lal.org.uk/pdf/Transgenic.pdf>.
17. Kumar RK (1979): *Lab Anim Sci.* 679-80.
18. Meldgaard M, Bollen PJ, Finsen B. (2004): Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR. *Lab Anim.* 38(4), 413-7.
19. Mitrečić D, Mavrić S, Branica BV & Gajović S. (2008): Mice genotyping using buccal swab samples: an improved method. *Biochem Genet.* 2008 Apr;46(3-4):105-12. Epub 2008 Jan 23.
20. Murgatroyd C., Bilko D. & Spengler D. (2006): Isolation of high-quality DNA for genotyping from feces of rodents. *Analytical Biochemistry*, 348, 160-162.
21. Nadon NL, Draeger K. (1996): Genomic DNA analysis from mouse toe lysates. *Transgenic Res.* 5(3):209-11.
22. National Centre for the 3Rs, Storbritannia. Wildlife research. <http://www.nc3rs.org.uk/category.asp?catID=79>
23. National Research Council (1996): *ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, side 46. Washington DC: National Academy Press.
24. Nonatec microtransponder (www.nonatec.net)
25. Russell WMS & Burch RL (1959): *The Principles of Humane Experimental Technique*. UFAW, Wheathampstead, 238 sider. http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm
26. Vachon P (1998): Anatomical and histological observations of fore- and hind limb toes in adult mice after amputations performed at the age of two weeks. *Can J Vet Res.* 62(4):311-3.
27. VeriChip (<http://en.wikipedia.org/wiki/VeriChip>)
28. Zhang Y-H, Huang B-L, Eastman K, McCabe LL, MacLennan NK & McCabe ERB (2006): Mouth collection device for newborn mice. *Molecular Genetics and Metabolism* 89: 164-167.
29. Öbrink KJ & Waller M (1996): *Försöksdjurs-kunskap: Refinement, Reduction, Replacement*. Studentlitteratur AB, Lund, 393 sider.

ZonMw stimuleert gezondheids-
onderzoek en zorginnovatie

Laan van Nieuw Oost-Indië 334

2593 CE Den Haag

Postbus 93245

2509 AE Den Haag

Telefoon 070 349 5111

Fax 070 349 5100

info@zonmw.nl

www.zonmw.nl