



Europska
komisija

Skrb o životinjama u svrhu bolje znanosti

DIREKTIVA 2010/63/EU
O ZAŠTITI ŽIVOTINJA KOJE
SE KORISTE U ZNANSTVENE SVRHE



**GENETSKI IZMIJENJENE
ŽIVOTINJE**

Europska komisija nije odgovorna za bilo kakve posljedice koje proizlaze iz ponovne uporabe ove publikacije.
Luxembourg: Ured za publikacije Europske unije, 2022



© Europska unija, 2022

Politika ponovne uporabe dokumenata Europske komisije uređena je na temelju Odluke Komisije 2011/833/EU od 12. prosinca 2011. o ponovnoj uporabi dokumenata Komisije (SL L 330, 14.12.2011., str. 39.).

Osim ako je navedeno drukčije, ponovna uporaba ovog dokumenta dopuštena je u skladu s licencijom Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). To znači da je ponovna uporaba dopuštena uz navođenje relevantnih podataka i svih izmjena.

Za svaku uporabu ili reprodukciju elemenata koji nisu u vlasništvu Europske unije možda će biti potrebno zatražiti dopuštenje izravno od odgovarajućih nositelja prava.

Print ISBN 978-92-76-52175-4
PDF ISBN 978-92-76-52193-8

doi:10.2779/348089
doi:10.2779/898546

KH-09-22-172-HR-C
KH-09-22-172-HR-N

**Okvir za genetski izmijenjene životinje na temelju
Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u
znanstvene svrhe**

Nadležna nacionalna tijela za provedbu Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe

Radni dokument o genetski izmijenjenim životinjama za ispunjavanje zahtjeva iz Direktive

- koji zamjenjuje sporazumni dokument od 22. i 23. ožujka 2012. –

Bruxelles, 25. i 26. studenoga 2021.

Radi olakšavanja provedbe Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe Komisija je 2011. uspostavila dvije stručne radne skupine: 1. za izradu zajedničkog obrasca za statistička izvješća i 2. za procjenu težine postupaka.

Rezultat rada bile su smjernice o genetski izmijenjenim životinjama, koje su potvrdile nacionalne kontaktne točke država članica za provedbu Direktive 2010/63/EU na sastanku od 22. do 23. ožujka 2012., nakon čega je na sastanku od 11. do 12. srpnja 2012. potvrđen plan procjene dobrobiti za genetski izmijenjene linije (dostupan u Prilogu). Ispravak Priloga potvrđen je 23. siječnja 2013.

Međutim, zbog brzog tehnološkog razvoja u proteklom desetljeću i očitih poteškoća u postizanju jednakog razumijevanja o tome koje je odobrenje potrebno i kad te o tome kako izvješćivati o životinjama koje se koriste za stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih linija, Europska komisija održala je 27. i 28. lipnja 2018. u Bruxellesu sastanak dodatne stručne radne skupine o stvaranju, uzgoju i održavanju genetski izmijenjenih životinja. Nakon sastanka uspostavljeno je nekoliko podskupina za izradu okvirâ za procjenu dobrobiti za najčešće korištene genetski izmijenjene vrste i još jedna podskupina za utvrđivanje elemenata informacija koje bi trebale pratiti genetski izmijenjene životinje kad se one šalju između objekata ili na mjesta izvan EU-a radi osiguravanja da su uspostavljene primjerene prakse uzgoja i skrbi kako bi se pomoglo u optimalnoj primjeni praksi za smanjenje patnji i korištenja te poboljšanje korištenja životinja.

Sve države članice i glavne organizacije dionici pozvane su da imenuju stručnjake koji će pridonijeti i sudjelovati u raspravama. Ovaj je dokument izrađen na temelju rada svih prethodno navedenih stručnih radnih skupina, rasprava s državama članicama i pravnih savjeta Komisije. Nadležna nacionalna tijela za provedbu Direktive 2010/63/EU potvrdila su ga na sastanku od 25. do 26. studenoga 2021.

Izjava o odricanju od odgovornosti

Dokument je namijenjen kao smjernice za pomoć državama članicama i drugim subjektima na koje utječe Direktiva 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (kako je izmijenjena Uredbom (EU) 2019/1010 Europskog parlamenta i Vijeća) kako bi se uspostavilo zajedničko poimanje odredbi te direktive i olakšala njezina provedba. Sve primjedbe trebalo bi razmatrati u kontekstu Direktive 2010/63/EU i Provedbene odluke Komisije (EU) 2020/569. Sadržajem dokumenta ne uvode se dodatne obveze uz one utvrđene u Direktivi.

Samo je Sud Europske unije ovlašten tumačiti pravo Unije s pravno obvezujućom ovlaštenosti.

SADRŽAJ

UVOD	5
PRVI DIO: ADMINISTRATIVNI POSTUPCI KOJI UKLJUČUJU GENETSKI IZMIJENJENE ŽIVOTINJE	7
1. KONTEKST	7
2. PRAVNI OKVIR	7
3. AKTIVNOSTI NA KOJE SE PRIMJENJUJE DEFINICIJA PROJEKTA I ZA KOJE JE POTREBNO ODOBRENJE PROJEKTA	9
4. DIJAGRAM TOKA ZAHTJEVA ZA ODOBRENJE PROJEKTA ZA STVARANJE I ODRŽAVANJE GENETSKI IZMIJENJENIH LINIJA	17
5. VRSTE PROJEKATA I POSTUPAKA ZA ODOBRAVANJE	19
6. KLJUČNI ELEMENTI ZAHTJEVA ZA PROJEKT POTREBNI ZA PROCJENU PROJEKTA	20
7. IZMJENE ODOBRENJA PROJEKTA	21
DRUGI DIO: ZAMJENA, SMANJENJE I POBOLJŠANJE U STVARANJU, UZGOJU I ODRŽAVANJU GENETSKI IZMIJENJENIH ŽIVOTINJA	22
1. DOSTUPNOST POSTOJEĆIH LINIJA GENETSKI IZMIJENJENIH ŽIVOTINJA	22
2. ODABIR METODE STVARANJA NOVIH LINIJA GENETSKI IZMIJENJENIH ŽIVOTINJA	23
3. POBOLJŠANJA U POSTUPCIMA U KOJIMA SE KORISTE GLODAVCI (MIŠEVI I ŠTAKORI)	24
<i>Superovulacija</i>	25
<i>Vazektomija</i>	25
<i>Prijenos embrija</i>	25
<i>Induciranje i potiskivanje aktivnosti gena</i>	26
4. GENETSKA KARAKTERIZACIJA	26
5. PROCJENA DOBROBITI	28
6. UZGOJ, SKRB I ODRŽAVANJE TE UPRAVLJANJE VIŠKOM	29
<i>Smanjenje viškova</i>	29
<i>Uspostava ravnoteže između poboljšanja i smanjenja</i>	31
<i>Krioprezervacija</i>	32
TREĆI DIO: PLANOVI PROCJENE DOBROBITI ZA NAJČEŠĆE GENETSKI IZMIJENJENE VRSTE	33
1. UVOD	33
2. OPĆE NAPOMENE	33
3. ODJELJAK A PREDLOŠKA PROCJENE DOBROBITI ZA SVE VRSTE I VREMENSKE TOČKE	36
4. ODJELJAK B PREDLOŠKA PROCJENE DOBROBITI ZA SPECIFIČNE VRSTE	38
<i>Plan procjene dobrobiti genetski izmijenjenih glodavaca</i>	38
Odjeljak B – Predložak za procjenu dobrobiti glodavaca	39
Dodatna razmatranja za procjenu dobrobiti novorođenih životinja do odbijanja	41
<i>Plan procjene dobrobiti genetski izmijenjenih riba (koštunjače, prave koštunjače)</i>	43
Odjeljak B – Predložak za procjenu dobrobiti riba	45
Dodatna razmatranja za procjenu dobrobiti ličinki	48

Dodatna razmatranja za procjenu dobrobiti spolno zrelih, odraslih jedinki	48
<i>Plan procjene dobrobiti genetski izmijenjenih domaćih ili mini svinja</i>	49
Odjeljak B – Predložak za procjenu dobrobiti domaćih ili mini svinja	50
Dodatna razmatranja za procjenu dobrobiti novorođenih životinja	52
<i>Plan procjene dobrobiti genetski izmijenjenih kokoši</i>	53
Odjeljak B – Predložak za procjenu dobrobiti kokoši	54
ČETVRTI DIO: PRIJENOS INFORMACIJA O DOBROBITI GENETSKI IZMIJENJENIH ŽIVOTINJA	57
1. KLJUČNA NAČELA	57
2. ODJELJAK C – PREDLOŽAK ZA PREMJEŠTANJE SA ZAHTJEVIMA ZA SKRB I UZGOJ ZA GENETSKI IZMIJENJENE ŽIVOTINJE	59
PETI DIO: IZVJEŠĆIVANJE O GENETSKI IZMIJENJENIM ŽIVOTINJAMA	61
1. OPĆI PRAVNI OKVIR	61
2. DIJAGRAM TOKA ZAHTJEVA ZA STATISTIČKO IZVJEŠĆIVANJE I IZVJEŠĆIVANJE O PROVEDBI ZA STVARANJE, ODRŽAVANJE I KORIŠTENJE GENETSKI IZMIJENJENIH ŽIVOTINJA	61
3.1. GODIŠNJE STATISTIČKO IZVJEŠĆIVANJE	63
<i>Pravni zahtjevi koji se odnose na genetski izmijenjene životinje i zahtjeve za godišnje statističko izvješćivanje</i>	63
<i>Izvješćivanje o životinjama koje se koriste za stvaranje genetski izmijenjenih linija</i>	63
<i>Izvješćivanje o životinjama koje se koriste za održavanje genetski izmijenjenih linija</i>	64
<i>Izvješćivanje o životinjama koje se kreću među postupcima, projektima, objektima i/ili državama članicama</i>	64
3.2. IZVJEŠĆE O PROVEDBI SVAKIH PET GODINA	70
<i>Pravni zahtjevi koji se odnose na genetski izmijenjene životinje i izvješća o provedbi država članica</i>	70
<i>Životinje koje su uzgojene, usmrćene i koje nisu korištene</i>	70
<i>Uzorkovanje tkiva</i>	71
DODACI	76
DODATAK I.: PRIMJERI BAZA PODATAKA GENETSKI IZMIJENJENIH LINIJA	76
DODATAK II.: ZAHTJEV ZA PROJEKT I PROCJENA PROJEKTA ZA STVARANJE I ODRŽAVANJE GENETSKI IZMIJENJENIH LINIJA	77
<i>Uvod</i>	77
<i>Dio A: Ogladni primjeri ključnih informacija u zahtjevu za projekt s genetski izmijenjenim životinjama</i>	77
<i>Prijedlog projekta</i>	77
<i>Netehnički sažetak projekta</i>	78
<i>Popis elemenata iz članka 37. stavka 1. točke (c) i Priloga VI.</i>	78
<i>Dio B: Ogladni primjer procjene prijedloga projekta s genetski izmijenjenim životinjama</i>	88
DODATAK III.: LITERATURA	100
DODATAK IV.: POJMOVNIK	102

Uvod

Genetski izmijenjene životinje činile su 2017. gotovo trećinu (2,59 milijuna) svih životinja koje se u EU-u koriste za znanstveno istraživanje i ispitivanje¹. Miševi i zebrice najčešće su prijavljene vrste genetski izmijenjenih životinja, iako je prijavljen i znatan broj žaba iz roda *Xenopus*, kunića i štakora, ali i manji broj drugih vrsta kao što su zamorci, psi, svinje, ovce, domaće kokoši i druge vrste riba. Genetski izmijenjeno bilo je 64 % zebrica koje su se koristile za istraživanje i ispitivanje te 38 % miševa.

Prema članku 1. u vezi s člancima 3. i 17. Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (dalje u tekstu „Direktiva”) stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih životinja smatra se znanstvenim „postupkom” ako rođenje ili valjenje može životinjama prouzročiti bol, patnju, stres ili trajno oštećenje u jednakoj ili većoj mjeri od uboda igle izvedenog u skladu s dobrom veterinarskom praksom. Stoga definicija postupka, uz životinje koje se izravno koriste za istraživanje i ispitivanje, obuhvaća i životinje potrebne za stvaranje novih genetski izmijenjenih (GA) linija i životinje koje se koriste za održavanje (uzgoj) postojećih genetski izmijenjenih linija sa štetnim fenotipom. Tako je 2017., uz genetski izmijenjene životinje koje su se koristile za istraživanje i ispitivanje, u stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih životinja bilo uključeno gotovo 1,3 milijuna životinja². Nadalje, kao posljedica programa za stvaranje i uzgoj genetski izmijenjenih životinja kojima se osigurava dovoljna dostupnost potrebnih genetski izmijenjenih linija prijavljeno je da je usmrćeno još 6,1 milijun životinja koje se nisu koristile u postupku³.

Stoga je važno posvetiti pažnju tehnikama proizvodnje i održavanja genetski izmijenjenih životinja te specifičnim značajkama koje se prenose kao posljedica genetskih izmjena kako bi se primijenilo načelo zamjene, smanjenja i poboljšanja („tri R”: engl. *replacement, reduction, refinement*) u praksama stvaranja, uzgoja i upotrebe tih životinja te skrbi za njih. Osim toga, kako bi se olakšalo jednako razumijevanje zahtjeva iz Direktive, smatralo se da su potrebne dodatne smjernice o odgovarajućim administrativnim postupcima i obvezama izvješćivanja koji proizlaze iz Direktive i povezane Provedbene odluke Komisije (EU) 2020/569.

U prvom dijelu ovih smjernica utvrđeni su pravni okvir i formalne obveze na temelju Direktive te se navode informacije o ključnim elementima koje treba obuhvatiti i opisati za potrebe podnošenja zahtjeva za projekt i procjenu kako bi se pridonijelo usklađenosti.

U drugom dijelu razmatra se primjena zamjene, smanjenja i poboljšanja u aktivnostima i postupcima povezanim sa stvaranjem i održavanjem genetski izmijenjenih linija, koje bi uzgajivači, korisnici, procjenitelji projekta i inspektori trebali pažljivo uzeti u obzir, te se navode neka opća načela koja treba primjenjivati.

¹ Europska komisija, [Statističko izvješće za 2019., Radni dokument službi Komisije, SWD\(2020\) 10 final](#), (2020).

² Europska komisija, [Radni dokument službi Komisije SWD\(2017\) 353 final/2](#), (2017).

³ Europska komisija ; [Izvješće o provedbi Direktive 2010/63/EU, Radni dokument službi Komisije, SWD\(2020\) 15 final](#), (2020).

U trećem i četvrtom dijelu smjernica objašnjava se plan procjene dobrobiti za genetski izmijenjene linije koji je potreban kako bi se olakšala identifikacija učinaka genetske izmjene radi:

- omogućivanja klasifikacije genetski izmijenjene linije prema tome smatra li se da ima štetan ili neštetan fenotip
- pružanja alata za praćenje zdravlja i dobrobiti genetski izmijenjenih životinja
- olakšavanja primjerene skrbi i smještaja prilagođenih potrebama linije
- davanja potrebnih informacija o skrbi i dobrobiti za genetski izmijenjene životinje kad se one premještaju u drugi objekt.

Izrađeno je nekoliko predložaka za korisnike kako bi se dale praktične i korisne smjernice o sljedećim područjima:

- U **odjeljku A predložka procjene dobrobiti za sve vrste i vremenske točke** opisuju se relevantne informacije kao što su opis i ime linije, genetska izmjena i pojedinosti o procjeni (datum, procjenjivač) te se navodi završna predviđena klasifikacija po težini dodijeljena liniji.
- U **odjeljku B predložka procjene dobrobiti za specifične vrste** opisuju se elementi i nalazi specifični za vrstu koja se procjenjuje.
- **Odjeljak C – Predložak za premještanje sa zahtjevima za skrb i uzgoj za genetski izmijenjene životinje** temelji se na nalazima procjene dobrobiti i daje informacije o pitanjima dobrobiti na koja treba paziti za određenu liniju, posebnim potrebama u pogledu smještaja i skrbi i/ili prijedlozima za strategije poboljšanja.

Sva tri dokumenta zajedno će činiti nužne informacije koje bi trebale pratiti genetski izmijenjene životinje kad se one premještaju unutar objekta ili između objekata.

Naposljetku, u petom dijelu raspravlja se o pravnim obvezama izvješćivanja povezanima s genetski izmijenjenim životinjama tijekom stvaranja i održavanja linija te se daju daljnje smjernice za osiguravanje usklađenosti sa zahtjevima za godišnje statističko izvješćivanje i petogodišnje izvješćivanje o provedbi.

Prvi dio: Administrativni postupci koji uključuju genetski izmijenjene životinje

1. Kontekst

Od 2011. sazvano je nekoliko stručnih radnih skupina kako bi se raspravilo o tome kako bi genetski izmijenjene životinje trebalo razmatrati u kontekstu Direktive. Ishodi tih skupina rezultirali su prihvaćanjem Radnog dokumenta o genetski izmijenjenim životinjama⁴ i donošenjem Provedbene odluke Komisije 2012/707/EU, u kojoj se, među ostalim, detaljno opisuje postupanje s genetski izmijenjenim životinjama u okviru statističkog izvješćivanja.

Na temelju teksta Direktive odabrani pristup bio je odvajanje genetski izmijenjenih linija za koje je utvrđeno da su štetne od onih koje se smatraju neštetnima. Razlog je uglavnom bio uklanjanje potrebe za posebnim odobrenjem projekta i povezanog administrativnog opterećenja za neštetne linije za koje ne postoji mogućnost rizika od boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja kako je navedeno u definiciji „postupka” iz članka 3. točke 1. Međutim, u tom kontekstu važno je napomenuti da su, neovisno o tome je li za aktivnost potrebno izričito odobrenje *projekta*, sve životinje koje se uzgajaju za znanstvenu upotrebu obuhvaćene područjem primjene Direktive, pa ih stoga smiju uzgajati samo odobreni objekti koji ispunjavaju zahtjeve iz tog propisa.

U praksi je odvajanje štetnih linija od neštetnih uzrokovalo poteškoće i nadležnim tijelima i gospodarskim subjektima, a posljedica su bile nedosljednosti u praksi određivanja smatra li se linija štetnom, kriterijima koji se koriste za odlučivanje, a zatim i izvješćivanju država članica. Osim toga, razlike u pristupima za odobrenja projekata za stvaranje novih genetski izmijenjenih linija (od odobrenja projekta za jednu liniju do projekata koji uključuju više genetski izmijenjenih linija) spriječile su uspostavu jednakih uvjeta za gospodarske subjekte, što je jedan od ključnih ciljeva Direktive. Ta su pitanja istaknuta i u izvješću o preispitivanju Direktive objavljenome 2017.⁵ i u prvom izvješću EU-a o provedbi Direktive, objavljenome 2020.³ Nacionalne kontaktne točke država članica smatrale su da bi bila korisna daljnja pojašnjenja i smjernice. Veća jasnoća i točnost uvedene su Provedbenom odlukom Komisije (EU) 2020/569, koja zamjenjuje Odluku 2012/707/EU.

U prvom dijelu smjernica o genetski izmijenjenim životinjama razmatrat će se glavna načela i ključni elementi povezani s primjenom, procjenom i odobrenjem projekata koji uključuju stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih životinja.

2. Pravni okvir

Područje primjene Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe uključuje stvaranje, održavanje na životu i upotrebu genetski izmijenjenih životinja u Uniji. Provedbenom odlukom Komisije (EU) 2020/569 daju se daljnje upute za praktičnu provedbu.

⁴ Nadležna nacionalna tijela za provedbu Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, [Radni dokument o genetski izmijenjenim životinjama](#) (2013).

⁵ Europska komisija, [Izvješće u skladu s člankom 58. Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe](#) (2017).

Kako je prethodno opisano, Direktiva se primjenjuje na sve životinje koje se koriste u znanstvene svrhe, neovisno o tome jesu li genetski izmijenjene (štetno ili neštetno) ili obične/nemutirane. Uzgajivači životinja moraju imati odobrenje i poslovati u skladu s Direktivom. Nadzor vrše nadležna tijela koja su obvezna provoditi redovite inspekcije uzgajivača, dobavljača i korisnika životinja. Aktivnosti na koje se primjenjuje definicija „postupka” mogu se provoditi samo u okviru odobrenog projekta. Odobrenje projekta moguće je samo na temelju zadovoljavajuće procjene projekta koju provodi nadležno tijelo. U procjeni projekta mora biti osigurana usklađenost s načelom zamjene, smanjenja i poboljšanja te nadležno tijelo mora biti uvjeren da je šteta koja se nanosi životinjama opravdana očekivanim koristima, pri čemu se uzimaju u obzir etička načela.

Kako bi se odredilo na koje se aktivnosti primjenjuje definicija postupka pa je za njih potrebno odobrenje projekta, u članku 3. točki 1. Direktive u definiciju „postupka” uključene su sve aktivnosti koje namjerno prouzroče ili mogu **prouzročiti rođenje ili valjenje životinje ili stvaranje i održavanje na životu genetski modificirane životinjske linije, koje životinji mogu prouzročiti određenu razinu boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja u jednakoj ili većoj mjeri od uboda igle izvedenog u skladu s dobrom veterinarskom praksom.**

Kako je navedeno u Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569, za potrebe Direktive „genetski izmijenjene životinje (GAA)” uključuju genetski modificirane životinje (transgene životinje, životinje s „izbijenim” genom (*knock-out*) ili drukčije genetske izmjene) i životinje s mutacijom koja se javlja prirodno ili životinje s izazvanom mutacijom u skladu s definicijom iz članka 3. točke 1.

Nadalje, u članku 3. točki 1. određuje se prag minimalne boli, patnje, stresa i trajnog oštećenja iznad kojeg se aktivnost smatra „postupkom” i zahtijeva odobrenje u okviru projekta (članak 12. stavak 2.).

U članku 17. navodi se da se smatra da je „postupak” okončan kad nema više daljnjih opažanja za navedeni postupak ili **kad se u slučaju novih genetski modificiranih linija životinja kod njihovih potomaka ne primjećuje i ne očekuje da će osjećati bol, patnju, stres ili trajno oštećenje** koje je jednako ili veće od onog izazvanog ubodom igle.

U Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569 dalje se opisuje da se nova linija smatra „uspostavljenom” kad je prijenos genetske izmjene stabilan (potrebne su najmanje dvije generacije) i dovršena je procjena dobrobiti. Potrebni su znanstveni podaci o vjerojatnim učincima genetske promjene i o vremenu kad će se te promjene vjerojatno manifestirati. Na temelju informacija/dokaza dobivenih za vrijeme procjene dobrobiti i drugih znanstvenih podataka odredit će se hoće li se linija razvrstati kao štetna ili neštetna kad se uzgaja i održava kao uspostavljena linija. U kontekstu održavanja uspostavljenih linija u članku 1. stavku 2. navodi se, među ostalim, **da uklanjanje boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja s pomoću uspješnog korištenja anestezije, analgezije ili drugih metoda ne isključuje korištenje životinja u postupcima iz područja primjene Direktive. Za uzgoj genetski izmijenjenih linija koje zadržavaju rizik od razvoja štetnog fenotipa (npr. rizik od infekcije zbog oslabljenog imunosnog sustava), neovisno o primijenjenom poboljšanju (prepreka / uvjeti biološke sigurnosti), potrebno je odobrenje projekta u skladu s člankom 1. stavkom 2. jer primjena**

poboljšanja **ne uklanja rizik u potpunosti**, već ga samo smanjuje u tom kontekstu (pozitivne intervencije potrebne za smanjenje rizika).

Slično tome, za predviđene poremećaje koji se javljaju u određenoj dobi može se predvidjeti da će se štetni učinci javiti poslije, kako životinje stare, npr. povišeni krvni tlak. Ako se životinje povremeno usmrćuju kako bi se spriječio nastup štetnih učinaka, to ne uklanja rizik za liniju, već samo za pojedinačne životinje koje su usmrćene. Stoga se te linije moraju **klasificirati kao štetne** i za njihovo je držanje potrebno odobrenje projekta.

U rijetkim se slučajevima u istraživanjima koja obuhvaćaju cijeli životni vijek životinja može utvrditi da nema štete ni skraćanja životnog vijeka kod životinja s tim poremećajima koji se javljaju u određenoj dobi. Ako se to dokaže, linija se može reklasificirati kao neštetna i od tog trenutka više ne bi bila potrebna odobrenja projekta.

Naposljetku, važno je podsjetiti na definiciju projekta iz članka 3. točke 2., u kojoj se navodi da „projekt” znači **program rada koji ima definirani znanstveni cilj** i uključuje jedan ili više postupaka (primjeri su dostupni u Dodatku II.).

3. Aktivnosti na koje se primjenjuje definicija projekta i za koje je potrebno odobrenje projekta

U skladu s prethodnim odredbama Direktive **stvaranje** nove genetski izmijenjene linije u načelu se smatra postupkom jer se posljedice stvaranja nove linije ne mogu uvijek u potpunosti odrediti unaprijed.

Iznimka su slučajevi u kojima se križaju / povratno križaju dvije linije s neštetnim fenotipom i u kojima se može razumno očekivati da nova linija neće dovesti do štetnog fenotipa. Zahtjev za odobrenje projekta tad se možda neće primjenjivati. Tu bi odluku trebalo jasno evidentirati u objektu u kojem se uzgajaju životinje. Ako se stvaraju potomci, potrebno je potvrditi da linija ne pokazuje nikakve značajke štetnog fenotipa primjenom procjene dobrobiti kako je opisano u odjeljku 3. Sve te životinje ostaju pod zaštitom i kontrolom objekta kao životinje uzgojene za znanstvenu upotrebu.

Održavanje uspostavljene genetski izmijenjene linije smatra se postupkom ako linija nosi štetan fenotip.

Osim toga, za vrijeme stvaranja i održavanja genetski izmijenjenih linija provodi se nekoliko posebnih aktivnosti, kao što su superovulacija, vazektomija, prijenos embrija i uzorkovanje tkiva za potrebe genotipizacije. Na većinu tih aktivnosti primjenjuje se definicija „postupka” iz članka 3. točke 1. Direktive.

Za uzorkovanje tkiva trebalo bi koristiti najmanje invazivnu metodu koja daje primjeren uzorak DNK-a u smislu količine i kvalitete za provedbu pouzdanog postupka genotipizacije. Ta bi metoda, ako je moguće, trebala istodobno osigurati pouzdanu identifikaciju/označivanje. Ako se koristi višak tkiva iz metode identifikacije/označivanja, to se ne smatra postupkom (članak 1. stavak 5. točka (e)).

U tablici u nastavku nalazi se pregled najčešćih aktivnosti i uvjeta u kojima se na njih primjenjuje zahtjev za odobrenje projekta.

Aktivnost	Komentar	Potrebno je odobrenje projekta	Nije potrebno odobrenje projekta
Stvaranje nove genetski izmijenjene linije	Genetska manipulacija gameta ili zametaka	Za stvaranje nove genetski izmijenjene linije potrebno je odobrenje projekta.	
	Križanje postojećih linija	Za stvaranje nove genetski izmijenjene linije <i>križanjem različitih linija radi stvaranja nove genetski izmijenjene linije pri kojemu se ne može unaprijed odrediti da će fenotip nove linije biti neštetan</i> potrebno je odobrenje projekta kako je navedeno u Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569 (Prilog III. dio B odjeljak B – Kategorije za unos podataka – točka 8.) za obveze statističkog izvješćivanja o upotrebi životinja.	Ako se stvara nova genetski izmijenjena linija križanjem / povratnim križanjem dviju linija s neštetnim fenotipom i ako se može razumno očekivati da nova linija neće dovesti do štetnog fenotipa , zahtjev za odobrenje projekta možda se neće primjenjivati. U tim slučajevima nadležno tijelo mora razmotriti načela odlučivanja u objektu i uvjeriti se da su uspostavljeni postupci za brzo dobivanje odobrenja projekta ako se pokaže da su ta predviđanja bila netočna.
	Mutageneza	Koristi se izlaganje kemikalijama ili ozračivanje kako bi se izazvale slučajne mutacije zametnih stanica koje su u mnogim slučajevima štetne za potomke. Za izlaganje roditelja i potomaka potrebno je odobrenje projekta.	
	Životinje sa spontanom štetnom mutacijom	Do mutacija dolazi spontano u uzgoju i u nekim slučajevima dovode do štetnih značajki koje su znanstveno zanimljive. Ako se takve životinje održavaju, uzgajaju, dobivaju i/ili koriste u znanstvene svrhe, potrebno je odobrenje projekta.	Štetne mutacije javljaju se kod pojedinačnih životinja/legla, ali se odmah usmrćuju, štetna značajka identificira se i roditelji se više ne koriste za uzgoj. Neke nemutirane linije kod kojih je došlo do srodstvenog parenja ponekad pokazuju štetne značajke, kao što je hidrocefalus u B6 miševa. Te linije

			ne održavaju se za ispitivanje hidrocefalusa. Sve životinje kod kojih je identificirana takva značajka odmah će se usmrtniti. Poduzet će se mjere za smanjenje učestalosti značajke selektivnim uzgojem.
Održavanje postojeće genetski izmijenjene linije	Fenotip linije	<p>Uzgoj postojeće linije sa štetnim fenotipom.</p> <p>Linije za koje procjena dobrobiti (kako je opisana u trećem dijelu) pokazuje da za nju postoji rizik od štetnog fenotipa iznad praga minimalne boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja tijekom životnog vijeka životinje.</p> <p>Za uzgoj štetnih linija križanjem het x het ili het x nemutirani tip radi smanjenja/uklanjanja rizika od izražavanja štetnog fenotipa i dalje je potrebno odobrenje.</p>	<p>Uzgoj postojeće linije s neštetnim fenotipom.</p> <p>Linije za koje procjena dobrobiti (kako je opisana u trećem dijelu) ne pokazuje štetu iznad praga minimalne boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja do koje će vjerojatno doći tijekom životnog vijeka životinje, npr. neke linije sa zelenim fluorescentnim proteinom (GFP).</p> <p>Ako se kod životinja iz neštetne genetski izmijenjene linije (tj. onih koje se uzgajaju bez odobrenja projekta) jave štetni učinci, treba preispitati procjenu dobrobiti i ažurirati je, a liniju ponovno klasificirati iz neštetne u štetnu. Odmah treba tražiti odobrenje nadležnog tijela za održavanje linije i daljnji uzgoj životinja.</p>
	Imunokompromitirane linije	Imunokompromitirane linije posebno su podložne infekciji kao posljedica izmjene gena i moraju se držati u posebnom smještaju, kao što je određeno biološki sigurno okruženje radi njihove zaštite, a može im trebati i dodatna skrb uz onu koja je potrebna za održavanje zdravlja i dobrobiti običnih životinja. Za takve se linije smatra da imaju štetan fenotip i za njih je potrebno odobrenje projekta (točka 11.7. odjeljka A dijela B Priloga III. Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569).	

	Linija sa štetnim fenotipom koji se javlja u određenoj dobi	Štetni fenotipi uključuju genetski izmijenjene linije kod kojih se taj fenotip javlja u određenoj dobi . U točki 11.7. dijela B Priloga III. Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569 navodi se da „[t]o uključuje, među ostalim, životinje kojima treba [...] dodatna skrb uz onu koja je potrebna za održavanje zdravlja i dobrobiti običnih životinja”.	
	Cre-lox linije	Za uzgoj križanih Cre-lox linija kako bi izrazile štetan fenotip potrebno je odobrenje projekta.	Za uzgoj nekrižanih Cre ili lox linija kod kojih se ne javlja štetan fenotip nije potrebno odobrenje projekta.
	Inducirane ili potisnute linije	Primijenjen je agens za indukciju kako bi se „aktivirao” štetan fenotip.	Linije kod kojih je genetska modifikacija fenotipa aktivna samo nakon tretmana agensima za indukciju (npr. tamoksifen, tetraciklin itd.): smatra se da do trenutka induciranja nemaju štetan fenotip i nije potrebno odobrenje prije induciranja.
		Linije kod kojih je genetski utemeljen fenotip potisnut tretmanom agensima za potiskivanje (kao što je tetraciklin) pa životinje ne pokazuju štetan fenotip – potrebno je odobrenje projekta jer je potrebna posebna aktivnost kako bi se linija održala neštetnom. U točki 11.7. odjeljku A dijelu B Priloga III. Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569 navodi se da „to uključuje, među ostalim, životinje kojima treba [...] dodatna skrb uz onu koja je potrebna za održavanje zdravlja i dobrobiti običnih životinja”.	

	Reporterske linije		Prisutnost gena reportera u genomu i molekula koje nastaju iz tih gena ne dovodi sama po sebi do štetnog fenotipa. Stoga za uzgoj linija u koje su uvedeni samo geni reporteri nije potrebno odobrenje.
Genetska karakterizacija	Invazivno uzorkovanje tkiva	Uzorkovanje tkiva obrezivanjem ušiju ako se ne provodi za potrebe identifikacije/označivanja, npr. ako se primjenjuje alternativna metoda identifikacije kao što je mikročipiranje.	Višak tkiva od identifikacije/označivanja životinje (npr. označivanja ušiju, ali ne uključujući rezanje vrhova repova ili obrezivanje peraja).
		Uzorkovanje tkiva rezanjem vrhova repova ili obrezivanjem peraja (to nisu metode primjerene za identifikaciju/označivanje jedinki).	
		Uzorkovanje tkiva rezanjem koštanih članaka / prstiju ako se ne koristi za identifikaciju/označivanje.	Višak tkiva od identifikacije/označivanja uklanjanjem jednog distalnog članka ako se to i dalje smatra najhumanijom metodom za identifikaciju pojedinačnih životinja kao što su novorođeni glodavci.
		Uzorak krvi (nije metoda primjerena za identifikaciju/označivanje jedinki).	
			Tkivo dobiveno invazivnom metodom, ali tek nakon što se potvrdi smrt (sekcija).
	Neinvazivno		Metode koje su ispod praga minimalne boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja (kako je definirano u članku 3. točki 1.) kao što su upotreba izmeta, uzorkovanje dlake.

			Metode promatranja, npr. boja krzna, ultraljubičasto fluorescentno svjetlo.
Vazektomija		Kirurški postupak potreban kod mužjaka kako bi se omogućila njihova upotreba za izazivanje lažne trudnoće. Odobrenje je potrebno samo za kirurški postupak (naknadno prirodno parenje nije postupak, vidjeti u nastavku).	
Superovulacija		Injekcije potrebne u znanstvene svrhe i stoga iznad praga minimalne boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja, pa je stoga riječ o postupcima.	
Prijenos embrija		Potrebna je kirurška implantacija ili umetanje cijevi putem cerviksa (nekirurški prijenos embrija), što je iznad praga minimalne boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja, pa je stoga riječ o postupcima.	
Prirodno parenje		Prirodno parenje kod kojeg jedan roditelj nosi štetan fenotip. Ako će križanjem nastati štetan fenotip, npr. za Cre-lox križanja potrebno je odobrenje projekta za rođenje ili valjenje potomaka (članak 3. točka 1.).	Ako se križaju / povratno križaju dvije linije s neštetnim fenotipom i ako se može razumno očekivati da nova linija neće dovesti do štetnog fenotipa, zahtjev za odobrenje projekta neće se primjenjivati. Ako se životinje nakon oporavka od vazektomije koriste za parenje radi izazivanja lažne trudnoće, to nije postupak.
Presadivanje		Ako se provodi isključivo u znanstvene svrhe , npr. ako prisutni patogeni mogu utjecati na imunosti sustav, ali nije ugroženo zdravlje životinja.	Ako se provodi u korist zdravlja i/ili dobrobiti kolonije, tj. ako je potrebno ukloniti patogen jer će u suprotnom doći do lošeg zdravlja životinja, npr. virus hepatitisa miša (MHV).

Krioprezervacija		Tehnike kod kojih se koriste žive životinje potrebne za krioprezervaciju u znanstvene svrhe kad se provode radi očuvanja linije.	Ako se provodi radi očuvanja linije upotrebom zamrznute sperme usmrćenih životinja.
-------------------------	--	--	---

Kad se razmatraju pojedinačni postupci, odluka o tome je li potrebno odobrenje projekta temelji se na cilju aktivnosti, tj. provodi li se ona u znanstvene svrhe ili radi dobrobiti te životinje ili njezine kolonije. Neka daljnja pojašnjenja navedena su u dvama primjerima u nastavku.

Presadivanje

Mikrobi mogu biti patogeni ili komenzalni. Mnoga presađivanja potrebna su kako bi se uklonili komenzalni organizmi koji mogu utjecati na znanost. Ako se presađivanje ne provodi radi dobrobiti životinja i provodi se radi stvaranja ili zadržavanja životinja/kolonija primjerene kvalitete i dosljednosti za dobru znanost, to se obavlja u znanstvene svrhe i presađivanje se mora obavljati u skladu sa zahtjevima Direktive, uključujući odobrenje projekta, osposobljavanje osoba koje sudjeluju itd. Međutim, ako imenovani veterinar odredi da je presađivanje u interesu dobrobiti životinje ili kolonije radi uklanjanja patogena iz kolonije, na to se ne bi primjenjivala definicija „postupka” i ne bi bilo potrebno odobrenje projekta na temelju Direktive. To bi se obavljalo na temelju relevantnog veterinarskog zakonodavstva u državi članici. Korišteni postupci odlučivanja, brojevi itd. trebali bi se navesti u veterinarskoj zdravstvenoj dokumentaciji (okvir za obrazovanje i osposobljavanje, modul 24 24.15), a postupke bi trebali provoditi veterinari ili osobe kojima oni zakonski mogu delegirati tu zadaću (ako je relevantno na lokalnoj razini). To omogućuje određenu fleksibilnost, ali odluka se mora evidentirati na odgovarajući način i biti opravdana na temelju mjerodavnog zakonodavstva.

Krioprezervacija

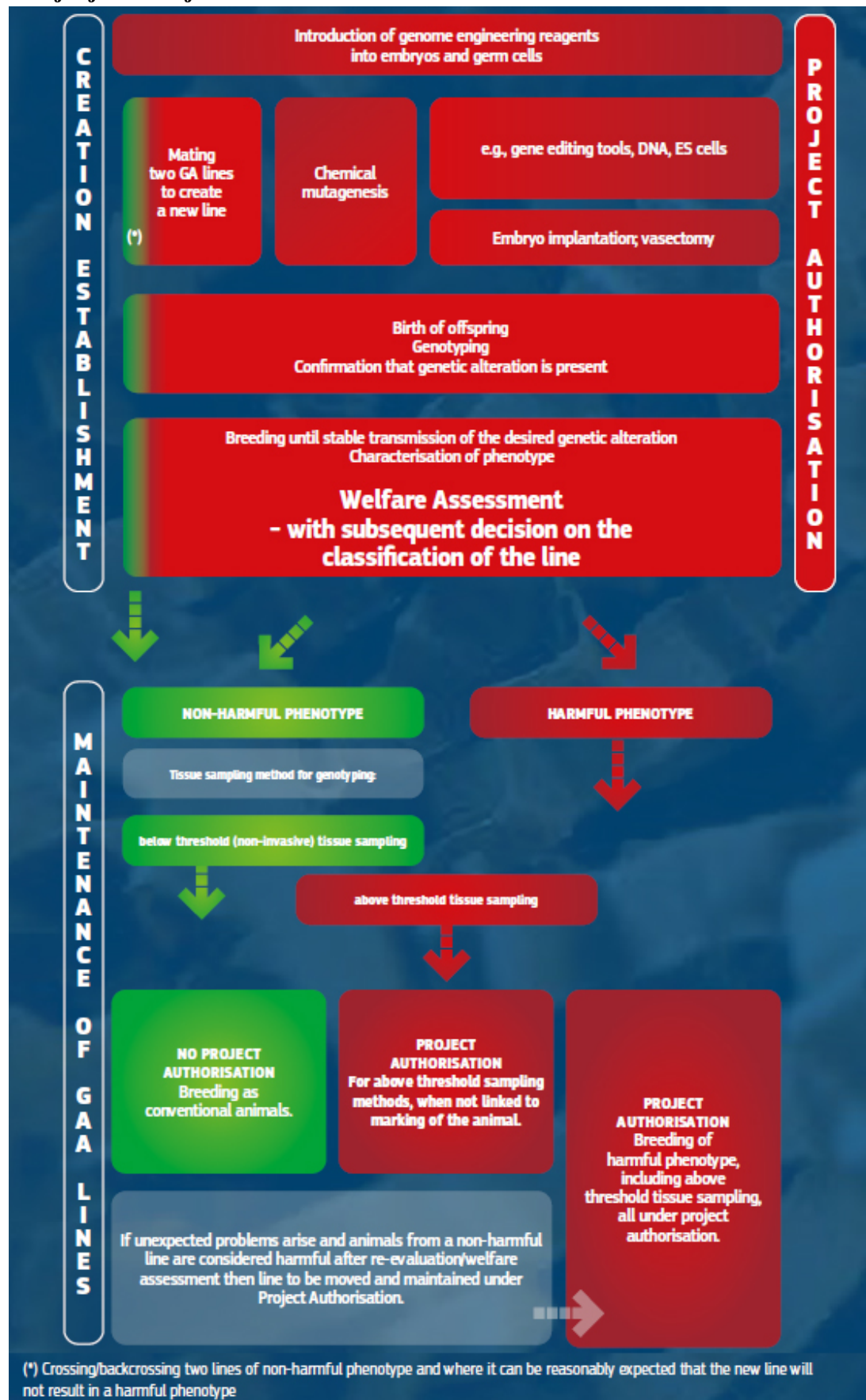
Krioprezervacija (superovulacija s uzimanjem jajašaca/embrija nakon usmrćivanja ili prikupljanje sperme sa zamrzavanjem gameta/embrija, rekonstrukcija specifične genetski izmijenjene linije) provodi se u svrhu održavanja znanstvenog integriteta i primjerenosti genetski izmijenjene linije, npr. kako bi se spriječio genski pomak utvrđen u koloniji. Za upotrebu živih životinja za krioprezervaciju u znanstvene svrhe potrebno je odobrenje projekta. Krioprezervacija nije obuhvaćena definicijom „postupka” samo ako se obavlja upotrebom zamrznute sperme usmrćenih životinja.

4. Dijagram toka zahtjeva za odobrenje projekta za stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih linija

Na dijagramu toka na sljedećoj stranici prikazani su glavni koraci od stvaranja do uspostave i održavanja genetski izmijenjene linije te povezani zahtjevi za odobrenje projekta, navedeni u područjima označenima crvenom bojom. Može se preuzeti kao plakat na sljedećoj stranici:

https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pubs_posters_en.htm.

Dijagram toka zahtjeva za odobrenje projekta za stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih linija



5. Vrste projekata i postupaka za odobravanje

Potreban je ujednačen pristup odobrenju projekata koji uključuju stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih linija kako bi se ostvarili ciljevi Direktive usmjereni na stvaranje jednakih uvjeta za sve gospodarske subjekte u cijeloj Uniji. Unatoč nastojanjima da se olakša ujednačena primjena Direktive, povratne informacije korisnika iz 2016. za preispitivanje iz članka 58. Direktive⁵ ukazale su na to da dolazi do znatnih razlika u postupcima odobrenja projekta s obzirom na proizvodnju genetski izmijenjenih životinja, od zahtjeva za zaseban prijedlog projekta za svaku novu genetski izmijenjenu liniju do veće fleksibilnosti koju nude višekratni generički projekti u kojima se više linija može stvoriti i održavati u okviru jednog odobrenja projekta. Zbog toga nastaju nejednakosti u troškovima i kašnjenja u provedbi istraživanja. Odgovori na preispitivanje ukazali su i na poteškoće u premještanju genetski izmijenjenih životinja između država članica zbog različitih pristupa odobrenju i različitih klasifikacija linija (štetne linije naspram neštetnih), što bi moglo ugroziti dobrobit životinja.

Tehnike uređivanja gena znatno su se razvile od donošenja Direktive. Jedna od najvećih promjena, koja je posljedica uvođenja tehnika CRISPR/Cas9, odnosi se na pristupačnost novih tehnologija i brzinu postupka stvaranja. Zahvaljujući toj tehnologiji, više linija može se stvoriti u mnogo manje vremena nego primjenom prethodnih metoda, što omogućuje progresivni odabir linija koje treba nastaviti razvijati. Taj razvoj do kojeg je došlo nakon donošenja Direktive još više utječe na povezane administrativne postupke u državama članicama / regijama u kojima je projekt odobren na razini jedne linije, a ne više linija unutar određene bolesti ili istraživačkog područja.

U tom kontekstu važno je podsjetiti da se projekt definira kao „program rada koji ima definirani znanstveni cilj”. Direktivom se nadalje zahtijeva da se procjena projekta provodi toliko detaljno koliko je primjereno za projekt i da pritom omogućuje realističnu procjenu štete i očekivanih koristi te osigurava primjenu zamjene, smanjenja i poboljšanja u projektu.

Člankom 38. poziva se na nužnu fleksibilnost s obzirom na stupanj detaljnosti potreban u procjeni projekta, dok se članom 40. stavkom 4., a u nekim slučajevima i člankom 42., omogućuje pojednostavnjenje administrativnih postupaka. Stvaranje novih genetski izmijenjenih linija razlikuje se od održavanja uspostavljenih genetski izmijenjenih životinja u svrhu proizvodnje. Međutim, mora se uzeti u obzir da projekti često uključuju i stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih linija.

Zahtjev za projekt stoga mora biti dovoljno detaljan kako bi omogućio provedbu procjene projekta u skladu s obvezama iz Direktive i istodobno smanjio administrativno opterećenje i za gospodarske subjekte i za nadležna tijela.

Izmjene projekata za stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih linija obrađuju se u odjeljku 7.

Aktivnosti za koje se mora dobiti odobrenje projekta uključuju:

- stvaranje novih genetski izmijenjenih linija (iznimka su slučajevi u kojima se stvara nova genetski izmijenjena linija križanjem / povratnim križanjem **dviju linija s**

neštetnim fenotipom i u kojima se može razumno očekivati da nova linija neće dovesti do štetnog fenotipa – u njima se zahtjev za odobrenje projekta možda neće primjenjivati)

- tehnike potrebne za stvaranje novih linija, npr. vazektomija, superovulacija
- održavanje uspostavljenih štetnih genetski izmijenjenih linija
- uzorkovanje tkiva (neovisno o fenotipu linije kad se za potrebe genotipizacije primjenjuju metode uzorkovanja tkiva koje su iznad praga).

Stoga je važno napomenuti da čak i ako za održavanje linije s neštetnim fenotipom nije potrebno odobrenje projekta, objekt će vjerojatno morati dobiti odobrenje projekta za postupke kao što je invazivno uzorkovanje tkiva za potrebe genotipizacije.

Preporuke

Kako bi se uskladile i pojednostavnile administrativne prakse u svrhu smanjenja administrativnog opterećenja i znanstvene zajednice i nadležnih tijela te kako bi se osigurala usklađenost s načelom zamjene, smanjenja i poboljšanja, trebalo bi razmisliti o sljedećim pitanjima:

- prelazak s projekata koji uključuju samo stvaranje pojedinačnih linija na projekte koji uključuju **stvaranje linija za definirano područje bolesti ili drugu usmjerenu projektnu temu**
- kombiniranje svih aktivnosti povezanih s genetski izmijenjenim linijama, tj. stvaranja, uzgoja, održavanja i drugih postupaka povezanih s genetski izmijenjenim životinjama, u jedan projekt
- razina detaljnosti u zahtjevu za projekt:
 - s jedne strane kako bi se osiguralo da su u dovoljnoj mjeri zastupljeni svi elementi koji su potrebni za procjenu usklađenosti projekta s načelom zamjene, smanjenja i poboljšanja te za poboljšanje dobrobiti životinja (uključujući zahtjeve u pogledu skrbi i smještaja)
 - s druge strane kako bi se informacije koje se traže ograničile na elemente relevantne za procjenu štete i koristi (uključujući potencijalno predloženo ponovno korištenje)
- upotreba višekratnih generičkih projekata kako je predviđeno u članku 40. stavku 4. Direktive, npr. odobrenja koja se odnose na više linija potrebnih za ispitivanje patogeneze bolesti motoneurona, kod kojih će fenotipi biti slični ili se na drugi način mogu opisati u okviru integriranog programa rada.

6. Ključni elementi zahtjeva za projekt potrebni za procjenu projekta

Procjena projekta mora osigurati usklađenost sa zahtjevima Direktive, među ostalim da su uključeni svi potrebni elementi iz Priloga VI. Direktivi te provedba zamjene, smanjenja i poboljšanja s obzirom na te aktivnosti. U trećem dijelu ovog dokumenta daje se niz preporuka o načinima na koje bi se zamjena, smanjenje i poboljšanje mogli provesti u okviru različitih aktivnosti povezanih sa stvaranjem i održavanjem genetski izmijenjenih linija.

Važno je da zahtjev za projekt bude dovoljno detaljan kako bi omogućio da se procijeni jesu li ti elementi uzeti u obzir na odgovarajući način kako bi se omogućila procjena.

U dijelu A Dodatka II. nalaze se primjeri vrste informacija potrebnih u zahtjevu za projekt za stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih životinja, a u dijelu B Dodatka II. opisuju se pitanja i razmatranja koja treba sagledati u tom zahtjevu za vrijeme procjene projekta.

7. Izmjene odobrenja projekta

U članku 44. navodi se da se izmjene zahtijevaju samo ako promjene mogu negativno utjecati na dobrobit životinja. Takve promjene u projektu mogu uzrokovati povećanje broja životinja, uvođenje nove vrste ili povećanje težine u odnosu na ono što je izvorno odobreno.

U kontekstu projekata za stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih linija proizvodnja novih linija vjerojatno će povećati broj potrebnih životinja, a dovršetak procjena dobrobiti može rezultirati promjenom težine. Ako se nove linije mogu predvidjeti u trenutku podnošenja zahtjeva, mogu se uključiti kao skupina, npr. linije u kojima se označuju neuroni ili linije koje pokazuju znakove mišićne distrofije. Međutim, za mnoge će projekte tijekom njihova trajanja biti potrebne izmjene, npr. povećanje potražnje, promjene u znanstvenom usmjerenju ili dodavanje novih ciljeva.

Još je jedan primjer potreba za postupkom za brzo postupanje s izmjenama kad se utvrde dodatna pitanja povezana s dobrobiti povrh onih koja su se razmatrala u početku. Primjeri uključuju:

1. štetne linije kod kojih je težina veća od očekivane (npr. ako je težina unaprijed klasificirana kao blaga, ali se u praksi utvrdi da životinje iskuse umjerenu težinu)
2. neočekivane štetne učinke u liniji koja je izvorno klasificirana kao neštetna, koji zahtijevaju da se na liniju primijeni odobrenje projekta.

Struktura i sadržaj zahtjeva za projekt i pojedinosti potrebne za postupak odobrenja mogu znatno utjecati na broj izmjena koje mogu biti potrebne u petogodišnjem razdoblju.

Preporuke

- ☐ Uzeti u obzir strukturu i ključne elemente zahtjeva kako bi se smanjio broj izmjena, a istodobno omogućila dovoljna razina pojedinosti za provedbu procjene projekta.
- ☐ Ograničiti zahtjev za izmjene samo na promjene koje mogu negativno utjecati na dobrobit životinja ili koje su potrebne za ponovnu procjenu analize štete i koristi.

Drugi dio: Zamjena, smanjenje i poboljšanje u stvaranju, uzgoju i održavanju genetski izmijenjenih životinja

Primjena zamjene, smanjenja i poboljšanja u praksama stvaranja, održavanja i uzgoja genetski izmijenjenih životinja

Zamjenu, smanjenje i poboljšanje dobrobiti životinja trebalo bi razmotriti u svim fazama, od osmišljavanja projekta do stvaranja, uzgoja i nabave genetski izmijenjenih linija životinja.

U drugom dijelu ovih smjernica ističu se područja u kojima bi primjeni zamjene, smanjenja i poboljšanja trebalo posvetiti posebnu pozornost u tom kontekstu.

1. Dostupnost postojećih linija genetski izmijenjenih životinja

Ne bi trebalo stvarati liniju ako je ona već dostupna ili ako je dostupna alternativa kojom će se postići isti znanstveni ishod. Međutim, nekoliko poteškoća može otežati dostupnost informacija o genetski izmijenjenim linijama koje već postoje ili pristup tim linijama.

Postoji nekoliko specijaliziranih baza podataka o uspostavljenim genetski izmijenjenim linijama. Primjeri tih baza podataka navedeni su u Dodatku I. Međutim, često se događa da se stalno uspostavljaju nove baze podataka, dok se stare brišu ili se ne održavaju. Nadalje, ne postoji konsolidirana platforma za razmjenu informacija među organizacijama ili istraživačkim objektima o postojećim linijama za različite vrste i sojeve.

Modeli genetski izmijenjenih životinja ne dijele se nužno među pojedinačnim istraživačkim skupinama unutar objekata, a još manje s vanjskim subjektima, bilo da je riječ o istraživačkim skupinama izvan vlastitog objekta i/ili zemlje ili putem otvorenog pristupa.

Mogu se javiti pitanja povjerljivosti i/ili intelektualnog vlasništva, koja odgađaju ili, u nekim slučajevima, sprečavaju pristup tehnologijama i novim linijama genetski izmijenjenih životinja.

Zdravstveni status možda nije primjeren. U tom slučaju treba odlučiti je li bolje presađivanje u životinje s primjerenim statusom bez patogena ili ponovno stvaranje linije.

Preporuke:

- ☐ Kako bi se izbjeglo nepotrebno udvostručivanje, potrebno je sustavno pretražiti postojeće genetski izmijenjene linije u dostupnim bazama podataka prije nego što se odluči stvoriti novu liniju. Liniju bi trebalo udvostručiti samo ako za to postoji posebno znanstveno opravdanje, u slučaju nedostupnosti ili ako postoji problem s pristupom postojećoj liniji.
- ☐ Važno je redovito preispitivati status baza podataka (održavaju li se kontinuirano) koje se koriste za pretraživanje postojećih linija i osigurati temeljito pretraživanje kako bi se utvrdile nove baze podataka koje su možda izrađene u međuvremenu.

- ☐ Zajednička platforma za razmjenu informacija o postojećim linijama za različite vrste i sojeve bila bi uzajamno korisna za smanjenje troška udvostručivanja (vrijeme i resursi) i pridonijela bi smanjenju patnje i poboljšanju dobrobiti životinja.
- ☐ Istraživačke skupine i tijela za dobrobit životinja trebala bi preispitati internu upotrebu genetski izmijenjenih životinja kako bi se osiguralo da ne dođe do udvostručivanja unutar objekta. Ako su često korišteni modeli u vlasništvu pojedinačnih skupina, racionalizacija na jednu koloniju za uzgoj omogućuje bolje planiranje za učinkovitiju upotrebu životinja, smanjenje višaka i veću kontrolu nad pitanjima kao što je genski pomak.
- ☐ Istraživačke skupine trebale bi razmisliti o vanjskoj nabavi genetski izmijenjenih životinja kako bi se izbjeglo udvostručivanje potrebno za uzgoj i upravljanje kolonijama genetski izmijenjenih životinja, a koje je svojstveno za više raspršenih kolonija. Konsolidacija linija, kao što su one koje nose specifične rekombinaze, uvjetne alele ili gene reportere, poboljšala bi učinkovitost i smanjila viškove i na nacionalnoj i međunarodnoj razini.
- ☐ Zajednica korisnika trebala bi uložiti napore u poboljšanje otvorene razmjene informacija o postojećim genetski izmijenjenim linijama i njihove nabave na obostranu korist te u ažuriranje baza podataka kojima ima pristup.
- ☐ Za evidentiranje informacija o genetski izmijenjenim linijama i pretraživanje postojećih genetski izmijenjenih linija trebalo bi koristiti standardne opise upotrebom dogovorene terminologije za nomenklaturu (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>) i dobrobit (npr. www.mousewelfareterms.org).
- ☐ Repozitoriji (baze podataka i prostori za krioskladištenje) trebali bi sadržavati informacije o fenotipu, dizajnu mutacije, dobrobiti, smještaju i potrebama u pogledu skrbi. Dosljednosti na razini Europe pomoglo bi navođenje informacija o tome je li fenotip linije klasificiran kao štetan ili neštetan.
- ☐ Zajednica korisnika genetski izmijenjenih životinja trebala bi uzeti u obzir osmišljavanje strategija za utvrđivanje i prevladavanje pitanja povjerljivosti i/ili intelektualnog vlasništva radi smanjenja nepotrebnog udvostručivanja genetski izmijenjenih linija.
- ☐ Trebalo bi odrediti standardizirani skup informacija koje prate životinje kad se one premještaju u novi objekt (vidjeti četvrti dio ovih smjernica).

2. Odabir metode stvaranja novih linija genetski izmijenjenih životinja

Sad je dostupno nekoliko metoda za stvaranje novih linija genetski izmijenjenih životinja. „Tradicionalne” metode genetske manipulacije velikim su dijelom zamijenile tehnologije uređivanja gena posredovane endonukleazom, među kojima prevladava CRISPR (grupirane pravilno razmaknute kratke ponavljajuće palindromske sekvence povezanih nukleaza) / Cas. Neizbježno je da će se uz razvoj tehnika genetske manipulacije početi primjenjivati nove metode koje omogućuju veću kontrolu. Potencijalne poteškoće i dalje su mozaicizam, nepredvidive promjene na ciljnom mjestu i neciljni učinci. Možda će biti potrebni stručnjaci

kako bi se prevladale/umanjile te poteškoće. Za nasumičnu transgenezu potrebno je dobro opravdanje zbog nepredvidivih rezultata neciljane integracije u kodiranje ili sustav regulatornoga genoma. Međutim, embrionalne matične stanice i dalje imaju ulogu u stvaranju novih modela kad su cilj složene promjene genoma, posebno homologna rekombinacija duljih dijelova genoma.

Tehnologija CRISPR/Cas9 potaknula je i omogućila stvaranje novih genetski izmijenjenih životinja na način koji mnogim znanstvenicima olakšava stvaranje nove linije u odnosu na prethodne metodologije.

Odabir metode koja će se primijeniti obično će se temeljiti na znanstvenim potrebama. Sve su metode povezane s različitim poteškoćama i prilikama i za znanost i s obzirom na provedbu zamjene, smanjenja i poboljšanja, a posebno broj potrebnih životinja. Na broj životinja utječe i složenost željenog modela, tj. koliko je paralelnih genetskih manipulacija potrebno.

Trebalo bi uspostaviti sustave za potvrđivanje gena koji se proučavaju i regija umetanja/brisanja, a rasplodne linije uvijek bi trebale biti sljedive uz jasnu dokumentaciju.

Testovi za određivanje genotipa trebali bi biti specifični za genetsku izmjenu soja (tj. specifične za alel), a ne za uobičajeni transgen kao što su CRE, GFP, neo itd. jer su ti genetski sljedovi uobičajeni u laboratorijskim zalihama i općim testovima neće se moći utvrditi miješanje sojeva koji su nositelji.

Preporuke:

- ☐ Trebalo bi razmotriti način optimizacije točne manipulacije metodom odabranom za stvaranje novih linija te način probira i kontrole neželjenih molekularnih događaja. Ako specijalizirano znanje o kontroli genetske kvalitete potrebno za osiguravanje učinkovite i djelotvorne proizvodnje nije dostupno lokalno, treba razmotriti eksteralizaciju te zadaće drugima.
- ☐ Treba pažljivo potvrditi ispunjava li gen koji se proučava znanstvene potrebe.
- ☐ Neovisno o odabranoj metodi, za vrijeme stvaranja novih linija potrebna je komponenta za osiguravanje kvalitete kako bi se osiguralo željenu strukturu mutacije i njezino predviđeno održavanje u programu uzgoja. Komponente za osiguravanje kvalitete trebalo bi imati u vidu u okviru održavanja genetskog integriteta modela koji se proizvodi.
- ☐ Trebalo bi izbjeđavati proširenje nabave životinja iz linija koje nisu uspostavljene i/ili dobro okarakterizirane.
- ☐ Kako bi se osigurao dobar genetski integritet, trebalo bi uvesti korištenje sekvencionirajućih, pouzdanih protokola za genotipizaciju.

3. Poboljšanja u postupcima u kojima se koriste glodavci (miševi i štakori)

Mnogo je prilika za poboljšanje u uobičajenim postupcima koji se provode u svrhu stvaranja i održavanja genetski izmijenjenih linija. Budući da se učinak tih elemenata razlikuje (npr. ovisno o dobi ili liniji), važno je da se o odlukama u pogledu elemenata navedenih u nastavku raspravlja i da se uzimaju u obzir na pojedinačnoj osnovi.

Superovulacija

- Pozadinski soj može utjecati na broj dobivenih potomaka, a stoga i na broj korištenih životinja. Međutim, najvažniji je čimbenik znanstveni zahtjev za završni pozadinski soj na kojemu je potrebna genetska izmjena kako bi se optimizirala proizvodnja i izbjeglo povratno križanje.
- Na proizvodnju oocita i embrija utječu i dob i tjelesna masa ženki. Kod superovulacije nezrela ženka daje više oocita i poželjnija je pri proizvodnji oocita za *in vitro* oplodnju (IVF) ili embrija za krioprezervaciju. Stoga se preporučuju mlade ženke koje nisu ovulirale. U većini jedinica ne bi se spajale mlade (male) ženke s velikim potencijalno previše energetičnim mužjacima.
- Za krioprezervaciju bi prije stvaranja i zamrzavanja embrija trebalo razmotriti upotrebu sperme prikupljene od usmrćenih mužjaka. To je humanija metoda koja smanjuje broj životinja potrebnih za arhiviranje.
- Trebalo bi osigurati primjeren i najhumaniji sustav stimulacije hormona, uključujući najbolje vrijeme/intervale, dob i tjelesnu masu ženki, pri čemu u obzir treba uzeti i znanstvene potrebe i dobrobit životinja.

Vazektomija

- Čimbenici koje treba uzeti u obzir za upotrebu sterilnih mužjaka:
 - o ukupna uspješnost u parenju genetski sterilnih životinja (moguće je da je manja) u usporedbi sa životinjama na kojima je obavljena vazektomija i
 - o utjecaj na broj ako je potrebno održavati koloniju za uzgoj radi opskrbe genetski sterilnim mužjacima (što može dovesti do povećanja viška životinja, osim ako se koriste u druge svrhe).
- Ako je potrebno pripremiti mužjake za vazektomiju, trebalo bi proučiti najnovije znanstvene dokaze kako bi se utvrdilo je li skrotalni rez poželjniji od abdominalnog pristupa.
- Za učinkovito parenje i uzrokovanje lažne trudnoće ženki, uspješnost mužjaka trebalo bi pratiti i prema potrebi ih zamijeniti kako bi se osigurale energičnost i učinkovitost.

Prijenos embrija

- Odabir pozadinskog soja utječe na sposobnost skrbi/njege za mladunce.
- Dob i tjelesnu masu mužjaka koji se koriste za izazivanje lažne trudnoće trebalo bi odabrati tako da se izbjegnu svi negativni učinci na dobrobit ženki.
- Upotreba kirurškog naspram nekirurškog prijenosa embrija (NSET): iako se možda čini da je NSET najhumanija metoda, trenutačno nije primjeren za embrije u vrlo ranoj fazi (0,5 dana nakon oplodnje) u kojoj su stope uspješnosti niske. Međutim, trebalo bi ga uzeti u obzir za kasnije embrionalne faze prije implantacije.
- Kirurški pristup: moguće je implantirati embrije jednostrukim ili dvostranim rezom. Mogućnosti bi se trebale razmotriti uz savjet imenovanog veterinarara, pri čemu treba uzeti u obzir očekivani uspjeh obaju pristupa i različite učinke na dobrobit.

Induciranje i potiskivanje aktivnosti gena

- Činjenica da se fenotip kod inducibilnih mutanata može aktivirati neposredno prije predviđenog korištenja i da nije prisutan tijekom cijelog života životinje može pridonijeti poboljšanju jer se skraćuje razdoblje u kojem životinje trpe bol, patnju, stres ili trajno oštećenje. Međutim, mora se uzeti u obzir da tvari koje se primjenjuju za potiskivanje i induciranje izražavanja gena (npr. tamoksifen) same mogu uzrokovati neželjene nuspojave, kao što je gubitak tjelesne mase.
- Ako životinja pokazuje štetan fenotip, nastupom svih štetnih značajki trebalo bi upravljati dobro definiranim paketom za skrb i/ili strogom primjenom humanog usmrćivanja.

4. Genetska karakterizacija

Genetska karakterizacija potrebna je kako bi se potvrdio željeni genotip životinje. Važno je da se karakterizacija ne obavlja samo pri stvaranju, već i kako bi se očuvao potreban genotip uzgojem i održavanjem. Mora se paziti da se spriječi slučajno križanje, posebno u sustavima otvorenih kaveza. Postoji mogućnost nehotečajne kontaminacije. Dobro osposobljavanje istražitelja, među ostalim o dobroj praksi postupanja sa životinjama i upotrebi sigurnih kaveza, točnom odabiru životinja i evidentiranju te primjeni pouzdanog informacijskog sustava za upravljanje uzgojem, trebalo bi smanjiti „slučajan” uzgoj i istaknuti važnost genetske kvalitete / genskog pomaka.

S vremenom će doći do genskog pomaka. Redovito osvježavanje u genetski kontroliranu podlogu ili iz krioprezerviranih populacija najbolja je praksa u upravljanju svim genetski izmijenjenim linijama. Kad se linija stvara interno ili kod prodavatelja, trebalo bi paziti da se radi s definiranom pozadinom. Kad se primaju životinje ili se radi s naslijeđenim linijama, trebalo bi ih temeljito analizirati prije korištenja za dobivanje znanstvenih podataka.

Upotreba panela za genetski integritet za procjenu integriteta pozadinskog soja ključna je iz perspektive znanstvenih podataka kako bi se izbjegli mogući zbunjujući čimbenici. Brigu o genetskoj kvaliteti trebalo bi, prema potrebi, evidentirati i objaviti te uključiti u dokumentaciju za prijenos kako bi se institucije ili organizacije koje primaju životinje moglo uvjeriti u kontrolu kvalitete koja se primjenjivala na određeni model genetski izmijenjenih životinja.

Genetska karakterizacija može se obavljati na više načina, koji se kreću od neinvazivnih metoda (npr. opažanje) do iznimno invazivnih metoda u kojima se koristi uzorkovanje tkiva (npr. rezanje repa ili članka (prsta)). Trebalo bi koristiti najhumaniju metodologiju usklađenu s točnim znanstvenim ishodom.

Uzorci za provjeru genotipa mogu se uzimati od životinja koje umru ili se usmrte u koloniji, na primjer od viška životinja.

U nekim slučajevima, čak i ako su metode invazivne, tkivo se može dobiti kao nusproizvod označavanja životinja, npr. obrezivanje ušiju. Na temelju Direktive na označavanje životinje radi identifikacije ne primjenjuje se definicija postupka, stoga nije potrebno odobrenje projekta.

U izvješću EU-a o provedbi Direktive prvi su put navedene određene informacije o metodama koje se primjenjuju za genetsku karakterizaciju genetski izmijenjenih životinja. Međutim, zbog manjka dovoljno kvalitetnih podataka o drugim vrstama mogle su se analizirati samo informacije koje se odnose na miševе. Rezultati su pokazali da je 2017. više od polovine uzoraka tkiva dobiveno kao višak materijala od identifikacije/označivanja životinje (89 % od obrezivanja ušiju i 11 % od rezanja koštanih članaka). Znatno udio životinja bio je podvrgnut invazivnom uzorkovanju na temelju odobrenja projekta, koje se nije vršilo na višku tkiva od označivanja, a čini se da je biopsija repa uobičajena metoda unutar te skupine. Čini se da bi se velik dio toga odmah mogao zamijeniti humanijom metodom.

Primjena neinvazivnih metodologija uzorkovanja (ispod praga minimalne boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja za koji je potrebno odobrenje projekta) činila je manje od 2 % svega uzorkovanja, pri čemu većinu u toj kategoriji čini upotreba postmortalnog materijala, a rijetko se koristi opažanje, izlaganje specifičnim uvjetima osvjetljenja ili uzorkovanje dlake.

Kad je riječ o invazivnim metodama uzorkovanja tkiva na temelju odobrenja projekta, najčešća je biopsija repa (65 %), nakon čega slijedi biopsija uha (20 %). Međutim, na biopsiju distalnog članka i dalje se odnosilo 13 % invazivnih metoda. Važno je napomenuti da neke države članice više ne dopuštaju upotrebu biopsije distalnog članka za uzorkovanje tkiva ili snažno odvrćaju od nje. Ako genotipizaciju treba obaviti u prvom tjednu života, za miševе će amputacija distalnog članka i vrha repa možda biti jedine moguće metode. Kod nezrelih miševa putovi boli nisu u potpunosti razvijeni. Trebalo bi predočiti specifično opravdanje o tome zašto su odabrane metode najhumanije.

Kao i sva tehnologija, što se više razvije i što se češće koristi, to će se moći učinkovitije primjenjivati. Brzo dobivanje rezultata važno je za bolje upravljanje kolonijom i planiranje studija te kako bi se osiguralo učinkovito korištenje životinja u najboljoj dobi.

Ostala pitanja koja treba razmotriti kako bi se smanjila patnja i poboljšala dobrobit životinja uključuju:

- upotrebu fluorescentnih markera (neinvazivnih) za određivanje prisutnosti gena
- upotrebu tkiva od životinja koje su usmrćene u postupku karantene ili presađivanja
- uzorkovanje izlučenih suvišnih rasplodnih životinja
- uzimanje što manjeg uzorka tkiva
- odabir analitičke metode:
 - o bolja točnost omogućuje mnogo manji uzorak
 - o pouzdanost metode uklanja potrebu za drugim testiranjem/uzorkovanjem
- čuvanje dijela tkiva ako bude potrebno ponoviti uzorak/analizu
- obavljanje tehnike biopsije repa, ako je potrebna, prije naprednijeg okoštavanja i oživčenja (mlade životinje)
- upotrebu lokalne i/ili opće anestezije i/ili analgezije, prema potrebi, kako bi se osigurala najhumanija metodologija za sve metode uzorkovanja tkiva
- za zebrice genotipizaciju ličinki, što omogućuje uklanjanje neprimjerenog viška životinja prije samostalnog hranjenja

- brzu analizu koja skraćuje vrijeme u kojem se ribe moraju držati u zasebnom smještaju na jedan ili dva dana – to su poboljšanja koja koriste neki objekti.

Preporuke:

- ☐ Kad god je to moguće, trebalo bi koristiti neinvazivne metode uzorkovanja tkiva za genotipizaciju.
- ☐ Ako su potrebne invazivne metode, trebalo bi koristiti najhumaniju (najmanje bolnu) metodu. Uzorkovanje repa gotovo se uvijek može zamijeniti humanijom metodom i za njegovo odobrenje bit će potrebno vrlo dobro opravdanje.
- ☐ Obvezi poboljšanja metoda uzorkovanja tkiva trebali bi se sustavno posvetiti osobe odgovorne za kolonije, objekti (npr. tijela za dobrobit životinja) i tijela zadužena za procjenu projekta.
- ☐ Ako se za identifikaciju/označivanje životinja koriste invazivne metode (npr. zarezivanje/probijanje uha), višak tkiva treba iskoristiti za genotipizaciju.
- ☐ Procjenitelji projekta trebali bi osigurati da se primjereno opravda upotreba invazivnih metoda koje se ne koriste za označivanje.
- ☐ Tijela za dobrobit životinja imaju ulogu u pribavljanju i dijeljenju informacija o novim neinvazivnim metodama uzorkovanja tkiva (npr. neinvazivno okularno uzorkovanje (iz suza)) i tehnikama za poboljšanje invazivnih metoda uzorkovanja tkiva.
- ☐ Ako se koristi invazivno uzorkovanje tkiva, trebalo bi razmotriti upotrebu analgezije/anestezije (pritom treba uzeti u obzir potencijalne dodatne štete zbog primjere anestezije/analgezije).
- ☐ Trebalo bi ukinuti upotrebu biopsije distalnog članka samo u svrhu uzorkovanja tkiva.
- ☐ Budući da su biopsija repa, biopsija uha i uklanjanje cijelog ili dijela prsta i dalje najčešće korištene metode u EU-u, inspekcijama bi se trebalo sustavno ispitivati primjenjuju li se najhumanije metode identifikacije/označivanja i uzorkovanja tkiva.
- ☐ Objekti bi trebali razviti sustave koji osiguravaju brzo dobivanje rezultata genotipa.
- ☐ Objekti bi trebali razmotriti je li djelotvornije i učinkovitije pružati usluge genotipizacije unutar organizacije ili koristiti vanjske profesionalne usluge genotipizacije.

5. Procjena dobrobiti

U sveobuhvatnoj procjeni utvrdit će se zabrinutosti za dobrobit životinja, koje se mogu otkloniti primjenom strategija poboljšanja (ili smanjenja), uključujući određivanje trenutka humanog usmrćivanja.

Procjenom dobrobiti dobivaju se informacije o tome jesu li potrebni dodatni zahtjevi za uzgoj i/ili skrb. Pomaže i u razlikovanju štetnih i neštetnih linija te klasifikaciji po težini za štetne linije u odobrenju projekta.

Neočekivane štetne fenotipe može uzrokovati genetska izmjena primijenjena na životinju. Kod jednokratnih učinaka / zdravstvenih problema treba razmotriti jesu li povezani s genetskim učinkom koji je posljedica genetske manipulacije. Možda će biti potrebna daljnja dijagnostika i u te rasprave treba uključiti imenovanog veterinaru. Međutim, ponovljeni dosljedni znakovi

koji se javljaju kod linije u mnogim slučajevima ukazuju na genetsko podrijetlo. Osim toga, promjene u okolišu isto mogu utjecati na prirodu i pojavu kliničkih znakova i primjenu humanog usmrćivanja.

Preporuke:

- ☐ Priroda i vrijeme procjena trebali bi se temeljiti na očekivanoj prirodi i vremenu pojave kliničkog učinka genetske izmjene.
- ☐ Trebalo bi paziti da se prate svi aspekti dobrobiti životinja, a ako utječu na dobrobit životinje, treba ih evidentirati i upravljati njima na odgovarajući način.
- ☐ Procjena bi trebala omogućiti odvajanje učinka gena od uobičajenih pozadinskih učinaka / učinaka skrbi, uključujući reproduktivnu uspješnost, npr. stope gubitaka prije odbijanja.
- ☐ Odgovarajući pozadinski soj ili referentnu liniju trebalo bi koristiti kao osnovu za usporedbu kako bi se osiguralo da pozadinske značajke ne poremete fenotip.
- ☐ Procjene dobrobiti trebalo bi ponoviti ako se promijeni okruženje (uključujući promjenu objekta).
- ☐ Procjene dobrobiti trebalo bi ponoviti ako se kod linije primijete novi stalni znakovi (uključujući različitu dob životinja).

U odjeljku o planovima procjene dobrobiti (vidjeti treći dio ovih smjernica) nalaze se detaljnije informacije o brojevima životinja i kliničkim parametrima koje treba uključiti u procjenu dobrobiti te se predlažu standardizirani predlošci za poboljšanje dosljednosti.

6. Uzgoj, skrb i održavanje te upravljanje viškom

Smanjenje viškova

U EU-u je 2017. usmrćeno 12,6 milijuna životinja koje su se uzgajale u znanstvene svrhe, a nisu iskorištene. Gotovo 49 % njih potječe iz stvaranja novih genetski izmijenjenih linija ili održavanja postojećih genetski izmijenjenih linija.

Neke životinje posebno se uzgajaju zbog organa i tkiva. Međutim, na temelju informacija koje su trenutačno dostupne iz nekih država članica, te životinje čine približno 10 % svih životinja koje se uzgajaju i usmrćuju, ali se ne iskorištavaju u postupcima. Zasad nije poznato koliki je udio životinja uzgojenih zbog njihovih organa/tkiva genetski izmijenjeno.

Smjernice za optimalno upravljanje kolonijom (npr. najbolji broj rasplodnih parova/trojki za održavanje genetski izmijenjenih linija, uključujući programe uzgoja ili broj legla) podupiru smanjenje broja životinja. Nekoliko organizacija i država članica objavilo je korisne smjernice o načinu smanjenja viška i poboljšanja učinkovitosti uzgoja genetski izmijenjenih životinja.

Izrađeni su alati za samoprocjenu radi preispitivanja učinkovitosti nekih aspekata uzgoja genetski izmijenjenih životinja. U objavljenim smjernicama javlja se nekoliko zajedničkih tema koje bi trebale poboljšati učinkovitost proizvodnje i smanjiti višak.

Učinkovito upravljanje kolonijom uključuje nekoliko pitanja koja treba uzeti u obzir i koja bi trebalo koristiti kao referentno mjerilo za dobru praksu. To uključuje sljedeća pitanja:

- osoba koja se odredi kao glavni upravitelj kolonije za sve kolonije
- redovita preispitivanja uspješnosti kolonije i upravljanja na razini pojedinačne kolonije i na razini objekta
- osposobljavanje i potpora za upravitelje kolonije kako bi usvojili ili usavršili potrebne vještine te kako bi im se pomoglo da savladaju teške situacije
- definirani pokazatelji uspješnosti uzgoja primjereni za soj za sve kolonije i redovno/stalno praćenje u skladu s tim pokazateljima
- metodologija za procjenu sklonosti, preferencija i fenotipa specifičnih za soj radi planiranja i uspostave optimalnih uvjeta za te sojeve
- uzimanje u obzir zahtjeva u pogledu okruženja za sve sojeve i prema potrebi prilagodbe specifične za soj
- razmatranje najbolje strategije za održavanje kolonija, pri čemu treba uspostaviti ravnotežu između genetskih potreba i praktičnih ograničenja
- razmatranje najboljih kontrola za eksperimentalna križanja
- izbjegavanje udvostručivanja kolonija tako da se stave na raspolaganje različitim istraživačkim skupinama
- izračun veličine kolonije koji bi se trebao temeljiti na brojevima potrebnima za ispunjavanje znanstvenih potreba i ostvarenje reproduktivne uspješnosti linije; znanstvene potrebe uključivat će dob, tjelesnu masu, spol i broj potreban u određenom razdoblju; reproduktivna uspješnost uključivat će razmatranje uspjeha u parenju, veličine legla, stopa smrtnosti, genotipa, rasplodnog vijeka i strategije za zamjenu rasplodnih životinja
- procjena kojom se određuje može li se višak uzgojenih životinja koristiti u drugim studijama ili kao izvor organa/tkiva, posebno s obzirom na potomke nemutiranog tipa, npr. nemutirani potomci odgovarajuće pozadine mogu se koristiti za stvaranje staničnih linija ili u pilot-studijama za drugi projekt; možda će biti potrebna odgovarajuća odobrenja
- korištenje obaju spolova radi poboljšanja znanstvene valjanosti ako za ishod pokusa nije potreban određeni spol, a to će smanjiti i rasipanje genetski izmijenjenih životinja.

Korištenje uvjetnih mutanata (npr. Cre x lox) i inducibilnih mutanata (npr. tamoksifenom) može pridonijeti poboljšanju. Činjenica da se fenotip kod inducibilnih mutanata može aktivirati neposredno prije predviđenog korištenja i da nije prisutan tijekom cijelog života životinje može pridonijeti poboljšanju jer se skraćuje razdoblje u kojem životinje trpe bol, patnju, stres ili trajno oštećenje.

Povećanjem složenosti linija (npr. dvostruke ili trostruke mutacije) smanjuje se vjerojatna učestalost željenih genetskih kombinacija. Time se povećava broj životinja s neprimjerenim genotipom, a time i broj životinja koje su višak. Iako će se neki od tih drugih genotipa često koristiti kao kontrole za višestruki genotip od glavnog interesa, čak i uz optimizirani uzgoj u tim se slučajevima može očekivati određeni višak. U program uzgoja trebalo bi po mogućnosti uključiti izbjegavanje niskih Mendelovih omjera za životinje koje se ispituju. Trebalo bi

razmotriti fiksiranje alela, npr. tako da jedan alel bude homozigotan, a drugi ostane heterozigotan kako bi se Mendelov omjer u životinja koje se ispituju vratio s 1 : 16 na 1 : 4.

Naposljetku, arhiviranje zamrznutih gameta i/ili embrija pomaže smanjiti broj životinja koje se uzgajaju za održavanje linija koje se trenutačno ne koriste u postupcima. Olakšava i razmjenu genetski izmijenjenih linija među istraživačima i tako puža dodatne prilike za smanjenje.

Preporuke:

- ☐ U svakom bi objektu trebalo imenovati osobu koja će osigurati da se u proizvodnji i uzgoju genetski izmijenjenih životinja učinkovito primjenjuju zamjena, smanjenje i poboljšanje.
- ☐ Trebalo bi imenovati koordinatora genetski izmijenjenih životinja, posebice u većim objektima s nekoliko neovisnih znanstvenih programa i/ili nastambi za životinje kako bi objekt zadržao pregled nad potražnjom i dostupnosti genetski izmijenjenih linija.
- ☐ Sustavi upravljanja kolonijom trebali bi omogućiti bolje usklađivanje ponude s potražnjom i trebali bi se upotrebljavati za olakšavanje tog usklađivanja.
- ☐ Praćenje i poboljšanje učinkovitosti uzgoja i proizvodnje genetski izmijenjenih linija/sojeva izradom internih referentnih mjerila i upotrebom redovitih periodičnih samoprocjena unutar objekata i među objektima, npr. koje provode tijela za dobrobit životinja.
- ☐ Trebalo bi uspostaviti redovito praćenje genetske kvalitete za rano otkrivanje, npr. genskog pomaka / slučajne kontaminacije, te strategije za rješavanje problema.
- ☐ Za stvaranje novih linija trebalo bi koristiti odgovarajuće pozadinske sojeve kako bi se izbjegla, u mjeri u kojoj je to moguće, potreba za povratnim križanjem.
- ☐ Potomke genetski izmijenjenih roditelja koji su genotipizirani kao nemutirani trebalo bi razmotriti za korištenje / ponovno korištenje u druge svrhe, npr. za opskrbu krvlju/tkivom ili u obrazovne svrhe ili svrhe osposobljavanja za smanjenje „viška”.
- ☐ Ako su potrebni složeni modeli s više genetskih izmjena, trebalo bi pažljivo promisliti i planirati strategije za uzgoj i uzeti u obzir miješanje različitih genetskih pozadina, kontrole i broj životinja koje se uzgajaju.
- ☐ Genetski izmijenjene linije trebalo bi arhivirati kao zamrznute gamete i/ili embrije kad nisu potrebne za pokuse koji su u tijeku kao rutinski dio postupaka ili znanstvenih programa objekta za proizvodnju genetski izmijenjenih životinja.
- ☐ Genetski izmijenjene linije trebalo bi prenositi između objekata upotrebom gameta i/ili embrija umjesto živih životinja.
- ☐ Trebalo bi uzeti u obzir upotrebu komercijalnih uzgajivača jer bi se moglo postići opće smanjenje putem ekonomije razmjera kolonije.

Uspostava ravnoteže između poboljšanja i smanjenja

Održavanje štetnih homozigotnih linija smanjit će broj životinja potrebnih za zadovoljavanje potražnje. Međutim, štetne linije koje se održavaju u heterozigotnim (het) kolonijama smanjit će broj životinja koje će iskusiti štetu, ali povećat će se broj životinja potrebnih za održavanje kolonije. Uzgoj linija križanjem het x het ili het x nemutirani tip smanjit će rizik od izražavanja

štetnog fenotipa, ali povećat će se broj potrebnih životinja. Za takva križanja i dalje je potrebno odobrenje. Općenito se smatra etičnijim koristiti veći broj životinja koje iskuse manju štetu.

Preporuke:

- ☐ Ako se pitanja povezana s dobrobiti opaze samo kod homozigotnih životinja, trebalo bi razmisliti o upotrebi heterozigotnih životinja za potrebe uzgoja. Ta strategija mogla bi povećati broj životinja koje su višak, ali će se ukupno smanjiti patnja.
- ☐ Pri uzgoju složenih križanja genetski izmijenjenih životinja, metodu proizvodnje trebalo bi pažljivo planirati kako bi se smanjio višak.
- ☐ Trebalo bi koristiti oba spola radi poboljšanja znanstvene valjanosti i smanjenja rasipanja ako za ishod pokusa nije potreban određeni spol.

Krioprezervacija

Krioprezervacija ima nekoliko koristi u primjeni, zaštiti i dijeljenju genetski izmijenjenih linija.

To treba uzeti u obzir kad postoji razdoblje u kojem životinje nisu potrebne.

Krioprezervacija ujedno olakšava i promiče dijeljenje linija na način koji je pogodan za dobrobit jer se prenose gamete ili embriji, a ne žive životinje. Može se koristiti i za poboljšanje zdravstvenog statusa kolonije i, za vrijeme aktivne upotrebe linije, za poboljšanje genetskog integriteta. Genetski pomak zaustavlja se krioprezervacijom. Za održavanje linije nisu potrebne životinje, stoga krioprezervacija pridonosi ukupnom smanjenju mogućeg viška životinja. Međutim, bit će potrebne životinje za vraćanje linije.

Krioprezervacija bi trebala biti sastavni dio plana objekta za uzgoj genetski izmijenjenih životinja u slučaju katastrofe, npr. ako se nastambe za životinje unište u požaru ili se u koloniji pojavi ozbiljna bolest, u hladnjači je dostupno dovoljno materijala za uspostavu nove kolonije.

Preporuke:

- ☐ Svi subjekti koji sudjeluju u proizvodnji i uzgoju genetski izmijenjenih životinja trebali bi imati pristup uslugama krioprezervacije.
- ☐ Trebalo bi razmotriti broj i troškove za dobrobit kod održavanja kolonija u odnosu na krioprezervaciju.
- ☐ Redovito bi trebalo pregledavati kolonije za uzgoj i strategije uspostavljenje za krioprezervaciju kad sojevi više nisu potrebni.
- ☐ Kako bi se poduprlo poboljšanje i smanjenje, trebalo bi razmotriti davanje prednosti zamrzavanju sperme umjesto zamrzavanju embrija.
- ☐ Krioprezervaciju bi trebalo koristiti kako bi se poduprla lakoća distribucije i dijeljenja modela genetski izmijenjenih životinja.

Treći dio: Planovi procjene dobrobiti za najčešće genetski izmijenjene vrste

1. Uvod

Ima li linija neštetan ili štetan fenotip izravno utječe na regulatorne zahtjeve koji se odnose na uzgoj i održavanje takve linije te povezane obveze izvješćivanja. O tome se detaljnije raspravlja u prvom i petom dijelu ovih smjernica.

Procjena dobrobiti potrebna je za sve novostvorene genetski izmijenjene linije kako bi se mogle dobiti sve potrebne informacije za odgovarajuću skrb i smještaj za tu liniju. Nadalje, ona pruža osnovu za dokument za prijenos kako bi se u novi objekt ili novu znanstvenu skupinu unutar objekta zajedno sa životinjama prenijele i sve važne informacije. Naposljetku, u kombinaciji s očekivanim učincima gena na životinju (na primjer veća podložnost šećernoj bolesti ili riziku od infekcije), procjena dobrobiti omogućuje određivanje može li se uspostavljenu genetski izmijenjenu liniju na početku razvrstati kao liniju s neštetnim ili štetnim fenotipom.

Uspjeh plana procjene dobrobiti ovisi o odabiru pokazatelja:

- koji su lako i pouzdano prepoznatljivi
- koji su učinkoviti u davanju dobre ocjene dobrobiti
- koji su relevantni za vrstu i soj (prema potrebi), razvojnu fazu i znanstvenu studiju
- koje je lako provesti i koji ne uznemiruju životinju previše te
- koji omogućuju dosljedno mjerenje, tumačenje i analizu.

Zajednički pristup evidentiranju kliničkih opažanja stoga je poželjan cilj jer će pomoći u razvoju dosljednih pristupa klasifikaciji težine. To bi olakšalo usporedbe kliničkih nalaza među studijama i informiralo osobe koje sudjeluju u procjeni težine, a možda bi se moglo koristiti i za smanjenje težine.

2. Opće napomene

Za potrebe procjene dobrobiti ne bi trebalo uzgajati dodatne životinje. Procjena bi se trebala temeljiti isključivo na promatranju životinje, a životinje ne bi trebalo izlagati nikakvim intervencijama ni drugoj manipulaciji koje bi mogle izazvati bol, patnju, stres ili trajno oštećenje iznad praga uboda igle.

Kod svake novoprodukovane genetske kombinacije nastalu liniju trebalo bi sustavno procijeniti. U skladu s Provedbenom odlukom Komisije (EU) 2020/569 stvaranje nove genetski izmijenjene linije obuhvaća i križanje postojećih genetski izmijenjenih linija radi stvaranja nove genetski izmijenjene linije **pri kojemu se ne može unaprijed odrediti da će fenotip nove linije biti neštetan.**

Procjenu dobrobiti po mogućnosti bi trebalo obaviti na znanstveno i statistički opravdanom broju životinja koji ne bi trebao biti manji od 14 i životinje bi trebale dolaziti iz više legla. Razlike u fenotipu među spolovima trebalo bi uzeti u obzir za izračun veličine uzorka ako se ne mogu isključiti na znanstvenoj osnovi. Ako nije poznato da genotip ovisi o spolu, treba procijeniti sedam ženki i sedam mužjaka. U procjenu dobrobiti trebalo bi uključiti životinje reprezentativnih dobnih skupina i relevantnih genotipa (heterozigotnog i homozigotnog).

Životinje odgovarajuće genetske pozadine (npr. nemutirani tip) ili definirane referentne linije trebale bi služiti kao kontrolna skupina.

Sve nepravilnosti u fenotipu koje se utvrde u genetski izmijenjenoj liniji trebalo bi usporediti s njihovom pojavom u definiranoj referentnoj liniji. Ako se nepravilnost javlja i kod pozadinskog soja, to treba uzeti u obzir. Trebalo bi koristiti statističke testove kako bi se izračunalo je li razina nepravilnosti uočena kod genetski izmijenjene linije znatno viša nego kod pozadinskog soja (tj. kako bi se odredilo je li nepravilnost posljedica genetske modifikacije). U slučajevima u kojima je fenotip koji je možda posljedica genetske izmjene prisutan i kod pozadinskog soja vjerojatno će se morati povećati broj životinja koje se procjenjuju.

Podatke bi trebalo prikupljati u najmanje dva ciklusa razmnožavanja od generacije u kojoj je prijenos genetske izmjene stabilan.

Kliničkim opažanjem ne mogu se uvijek pouzdano identificirati sva sporna pitanja koja su posljedica genetske manipulacije. Međutim, ako se na znanstvenoj osnovi može očekivati da će genetska izmjena negativno utjecati na dobrobit životinja, sve bi takve štete trebalo uzeti u obzir i uključiti u konačno određivanje toga je li linija štetna. Invazivne metode trebale bi se koristiti za dobivanje dopunskih informacija samo ako je to nužno i posebno obrazloženo u odobrenju projekta, na primjer uzorak krvi za procjenu razina glukoze u navodnom modelu šećerne bolesti.

Ako su dostupni, trebalo bi uzeti u obzir dodatne podatke iz drugih izvora, npr. rezultate postupaka na životinjama ili podatke iz publikacija. Ako su dostupne dodatne informacije, procjenu dobrobiti trebalo bi ažurirati za određenu liniju.

Stupanj i učestalost praćenja možda će trebati povećati s osnovnog svakodnevnog praćenja ovisno o očekivanim učincima. Predloške iz odjeljaka A i B trebalo bi koristiti kao osnovu za procjenu i trebalo bi ih dopuniti očekivanim učincima manipulacije gena ili ako se primijeti neočekivani fenotip.

Rezultati procjene dobrobiti mogu se odnositi samo na dob životinja u trenutku provedbe procjena i na specifično okruženje u kojem su se životinje procjenjivale. Ako se promjene parametri, npr. dob ili okruženje (drugi objekt), procjenu dobrobiti trebalo bi potvrditi dodatnim opažanjima.

Trebalo bi voditi točnu kliničku evidenciju i evidenciju o okruženju te je preispitati ako dođe do smrti kako bi se spriječila daljnja smrtnost. Prema potrebi (npr. stopa smrtnosti viša od očekivane) trebalo bi provesti postmortalne preglede kako bi se pomoglo odrediti uzrok smrti.

Preispitivanje plodnosti isto može biti korisno u procjeni utječe li genetska modifikacija primjerice na stope začeca, distocije, pobačaja ili mrtvorođenih životinja.

Procjenu pojedinačnih životinja trebalo bi evidentirati i izvješćivati o njoj primjenom visokokvalitetnih sustava koji omogućuju jednostavnu razmjenu informacija s drugima (obično uz potporu informacijskih tehnologija). Međutim, skupna procjena može biti primjerenija npr. za nezrele životinje kao što su ličinke ribe. Kako bi se olakšalo dosljedno evidentiranje rezultata procjene, izrađeni su predlošci za najčešće korištene genetski izmijenjene vrste (vidjeti odjeljak B).

Nadalje, važno je sažeti informacije dobivene za vrijeme procjena dobiti i izvijestiti o njima pri prijenosu genetski izmijenjene linije u drugu istraživačku skupinu ili u drugi objekt kako bi se odmah mogla primijeniti načela zamjene, smanjenja i poboljšanja. Daljnje smjernice uključene su u dokument o prijenosu genetski izmijenjenih životinja, uključujući zajednički predložak za kretanje unutar i između država članica.

Rezultati procjene dobiti trebali bi omogućiti klasifikaciju linije kao neštetne ili štetne. Ako se genetski izmijenjena linija ocijeni kao štetna, procjenom bi trebalo odrediti odgovarajuću klasifikaciju težine (blaga, umjerena ili teška) na temelju Priloga VIII. Direktivi 2010/63/EU. Više informacija dostupno je u Radnom dokumentu o okviru za ocjenjivanje težine postupaka (2012).

Procjenu dobiti trebalo bi preispitati i ažurirati kad postane dostupno više informacija, a dobavljačima, uzgajivačima i drugim korisnicima trebalo bi dostaviti primjerene povratne informacije ako su poznate.

Kad postanu dostupni podaci za više životinja, klasifikaciju težine linije trebalo bi preispitati, posebno kod linija koje su određene kao neštetne, jer veći broj životinja može ukazati na biološki relevantan fenotip s niskom penetracijom koji nije očit u manjem uzorku.

Kako bi se osigurala dosljednost pristupa, procjenu dobiti trebalo bi obavljati kvalificirano i iskusno osoblje koje je dovršilo primjereno osposobljavanje.

3. Odjeljak A predložka procjene dobrobiti za sve vrste i vremenske točke

Odjeljak A	Predložak procjene dobrobiti
Ime vrste	
Linija koja se procjenjuje – interno ime	Ime koje se koristi u smještajnom objektu: ako je primjenjivo, navesti broj soja
Linija koja se procjenjuje – međunarodno ime	Ime bi, prema potrebi, trebalo navesti u skladu s međunarodnim standardima za nomenklaturu ^{6, 7} .
Strategija za uzgoj	Navesti najpoželjniju metodu za održavanje kolonije, npr. heterozigot x heterozigot, heterozigot x nemutirani tip, homozigot x homozigot ili neki drugi oblik. Opća procjena reproduktivne uspješnosti, npr. mužjaci / ženke / prosječna veličina legla / smrtnost prije odbijanja / uspješnost valjenja, u usporedbi s nemutiranim kontrolnom skupinom.
Pozadinski soj	Ako je poznat, trebalo bi definirati pozadinski soj, npr. evidentiranjem međunarodnog imena.
Vrsta genetske izmjene	Kratak opis vrste genetske izmjene, tehnike koja se koristi i ciljnog programa ⁸ . Trebalo navesti genetsku pozadinu nemutiranog tipa.
Informacije o životinjama u trenutku procjene	Dob ili razvojna faza životinja, brojevi (napomenuti ako je riječ o procjeni, npr. larvalni oblici) i raspodjela po spolu
Informacije o uvjetima smještaja u trenutku procjene	Vrsta smještaja i okruženje, npr. sustav osvjetljenja, temperatura, vlažnost, obogaćivanje okoliša u kavezima, značajke vode za vodene vrste (npr. temperatura, pH-vrijednost, amonijak), položaj u jedinici za životinje (npr. razina kaveza/spremnika)
Ostale informacije relevantne za procjenu	Sve ostale informacije koje su mogle utjecati na procjenu dobrobiti, npr. građevinski radovi, promjene osoblja, zdravstveni status u trenutku procjene

⁶ Međunarodni odbor za standardiziranu genetsku nomenklaturu miševa i Odbor za nomenklaturu genoma štakora, [Guidelines for nomenclature of mouse and rat strains](#) (2018).

⁷ Odbor za nomenklaturu zebrića (ZNC), [ZFIN Zebrafish Nomenclature Conventions](#), (2019).

⁸ Za vrstu modifikacije (navesti broj kopija ako je poznat i primjenjiv), gen na koji se djeluje, uzorak nasljeđivanja, povezanost sa spolom itd. i/ili uputiti na / priložiti detaljan opis – po mogućnosti relevantna publikacija o stvaranju linije (vidjeti i odjeljak „Ostale relevantne informacije“).

Ostale relevantne informacije	Publikacije; poveznice na internetske stranice
Klasifikacija postupaka po težini	Na temelju Priloga VIII. Direktivi 2010/63/EU
Izvor	Objekt u kojem su životinje stvorene ili u kojem su se zadnje držale
Procjenjivači	
Datum	

4. Odjeljak B predložka procjene dobrobiti za specifične vrste

Plan procjene dobrobiti genetski izmijenjenih glodavaca

Preporuke specifične za procjenu dobrobiti glodavaca:

- Procjenu bi trebalo provoditi ubrzo nakon rođenja, u vrijeme odbijanja i ponovno nakon postizanja spolne zrelosti te u starijih životinja ako se očekuje da će se bolest javiti u kasnijoj fazi.
- Životinje odgovarajuće genetske pozadine ili definirane referentne linije služe kao kontrolna skupina. Tijekom uspostave linije posebno su prikladni nemutirani članovi istog legla ako su dostupni.
- Može biti korisno izraditi krivulju rasta za liniju.

Dodatna razmatranja za novorođene životinje i legla utvrđena su u tablicama u nastavku.

Odjeljak B – Predložak za procjenu dobrobiti glodavaca

Izgled / tjelesne funkcije / okruženje / ponašanja / pokazatelji specifični za postupak / slobodna opažanja

Kategorije više razine	Područja na koja se treba usredotočiti pri promatranju životinja	Specifični pokazatelji koje treba pratiti
Izgled	Stanje tijela	Gubitak/povećanje tjelesne mase
		Pretilost
		Mršavost
		Ocjena stanja tijela, ako je dostupna
	Stanje krzna i kože	Piloerekcija
		Raščupanost / nedostatak njegovanja dlake
		Masno krzno
		Gubitak dlake
		Dehidracija – boranje kože
		Lezije kože – oticanje, kraste, čirevi, ozljede/rane
		Mrlje od fekalija ili urina
	Iscjedak	Iz očiju, nosa, urogenitalni, mrlje od porfirina u nekih vrsta, npr. štakora
	Oči	Upale, zamućene ili povećane
		Zatvorene/poluzatvorene/natečene
		Oštećenje/ozljeda oka (npr. ulceracija rožnice)
	Usta	Slinjenje
		Malokluzija/preveliki zubi
	Ostalo	„Bolan izraz lica” – npr. poluzatvorene oči i izbočenja na nosu u miševa
		Stezanje u trbuhu
		Natečen dio tijela, npr. nadutost trbuha
Tjelesne funkcije	Disanje	Ubrzano disanje (tahipneja)
		Otežano disanje (hiperpneja)

		Vrlo otežano disanje (dispneja, dahtanje)
		Hroptanje ili drugi zvuk pri disanju
	Unos hrane	Povećan/smanjen
	Unos vode	Povećan/smanjen
	Tjelesna temperatura	Povišena/snižena; izmjerena tjelesna temperatura ako je dostupna (kontaktno ili beskontaktno mjerenje temperature); boja ekstremiteta u glodavaca
	Osjetila	Znakovi oštećenog vida, sluha ili ravnoteže
Okruženje	Okruženje u nastambi, uključujući stelju, materijal za izradu gnijezda, predmete za obogaćivanje	Prisutnost i čvrstoća izmeta
		Mokra stelja, npr. zbog poliurije
		Prisutnost krvi
		Koristi li životinja predmete za obogaćivanje, npr. materijal za izradu gnijezda, igračke za žvakanje
Ponašanja	Socijalna interakcija	Promjena uobičajenog temperamenta – bojažljive/agresivne interakcije s drugim životinjama; tjeskobno ponašanje (npr. izraženi odgovori bijega, skrivanje)
		Izoliranost ili povlačenje od drugih životinja u socijalnoj skupini
	Nepoželjna ponašanja	Ponavljajuće/stereotipno ponašanje
		Grickanje dlake u glodavaca (engl. <i>barbering</i>), trihotilomanija
		Samoozljeđivanje
		Povećana agresivnost prema ljudima ili drugim životinjama
	Držanje i mobilnost	Neuobičajeno držanje
		Neuobičajen hod; hromost; nedovoljno kretanje / letargija / nevoljko kretanje pri stimulaciji
		Nekoordinirano kretanje
		Izbočen trbuh, nagnuta glava
	Ostalo	Tremori
		Napadaji/konvulzije/grčevi/trzaji
		Glasanje, spontano ili izazvano. (<i>Napomena – glodavci se obično glasaju u ultrazvučnom rasponu, pa je glasanje koje se čuje poseban razlog za zabrinutost.</i>)

		Smrtnost (ili rano usmrćivanje zbog štetnih znakova) prije očekivanog životnog vijeka ili najdulje trajanje života
Pokazatelji specifični za postupak	Određuju se na temelju pojedinačnog projekta, njegovih mogućih štetnih učinaka i predviđenih pokazatelja tih učinaka	Na primjer, u modelu za multiplu sklerozu mogli bi uključivati: gubitak tonusa repa, slabost stražnjih udova, slabost prednjih udova, paralizu, gubitak kontrole mjehura
Slobodna opažanja	Plan procjene dobrobiti uvijek bi trebao uključivati mogućnost bilježenja potencijalnih opažanja neočekivanih negativnih učinaka na dobrobit.	

Dodatna razmatranja za procjenu dobrobiti novorođenih životinja do odbijanja

Kriteriji	Što promatrati
Klinički znakovi	Na primjer deformacije, veličina, boja kože, edemi Rast i neuobičajeni razvoj / kašnjenje u razvoju (npr. vrijeme otvaranja očiju, rast krzna)
Znakovi u ponašanju	Na primjer pojačana aktivnost, agresivnost, prekomjerno glasanje, letargija/nereagiranje
Bijela mrlja (samo za novorođene životinje)	Postoje li mladunci bez bijele mrlje?

Majčinsko ponašanje	Postoje li znakovi lošeg majčinskog ponašanja (npr. kanibalizam, nezadržavanje mladunaca na okupu u kavezu, veliki gubici prije odbijanja)?
Leglo	Veličina legla; homogenost legla

Plan procjene dobrobiti genetski izmijenjenih riba (koštunjače, prave koštunjače)

Preporuke specifične za procjenu dobrobiti riba

Primarna procjena dobrobiti genetski izmijenjenih linija riba treba biti usredotočena na promatranje vidljivih izmjena na ribama. Ako postanu dostupni novi znanstveni uvidi u percepciju boli u riba i njihova ponašanja povezana s boli, oni se uzimaju u obzir u svim budućim ažuriranjima procjene dobrobiti.

Ove se smjernice primjenjuju na sve vrste koštunjača. Trebalo bi navesti ime točne vrste linije koja se procjenjuje. Preporučuje se da se dobrobit koštunjača procjenjuje barem u dvije faze:

- 1. faza ličinke u trenutku samostalnog hranjenja**
- 2. odrasle, spolno zrele životinje**
- 3. starije životinje trebalo bi procijeniti ako se očekuje da će se bolest javiti u kasnijoj fazi.**

Konačna procjena genetski izmijenjenih koštunjača trebala bi se temeljiti na opažanju barem u tim razvojnim fazama.

Vremenska točka u kojoj se ličinke počinju samostalno hraniti ovisi o vrsti ribe (predloženo je pet dana nakon oplodnje (dpf) za zebrice (*Danio rerio*) (pri temperaturi vode od 28 °C) u skladu s Provedbenom odlukom Komisije 2020/569/EU i 12 dana nakon oplodnje za medake (*Oryzias latipes*)). Može se znatno razlikovati ovisno o uvjetima uzgoja (uglavnom temperaturi vode). Načelo kojim se treba voditi upotreba je vremena kad se probavni put u potpunosti otvori i riba bi obično aktivno uzimala hranu.

Vrijeme spolne zrelosti isto ovisi o vrsti ribe i uvjetima smještaja. Za zebricu i medaku može se smatrati da je spolno zrela nakon približno 12 – 16 tjedana pri temperaturi vode od 28 °C.

Pojava bilo kakve izmjene kao posljedica genetske manipulacije može ovisiti o specifičnim uvjetima smještaja u određenoj nastambi. Stoga se uvjeti smještaja (uključujući hranjenje) moraju uzeti u obzir u procjeni dobrobiti i moraju se evidentirati.

Za procjenu dobrobiti genetski izmijenjenih koštunjača u obzir bi trebalo uzeti sljedeća načela:

- Procjena se temelji isključivo na promatranju životinja u okruženju u kojem su smještene (npr. petrijeva zdjelica, akvarij).
- Za procjenu odraslih, spolno zrelih riba nije potrebno koristiti iste jedinke koje su se koristile za procjenu u fazi ličinke jer obično nije moguće trajno označiti ličinke.
- Sve izmjene sagledaju se s obzirom na specifičnu nemutiranu pozadinu i uvjete smještaja određene nastambe, a to treba evidentirati za konačnu procjenu dobrobiti. Napomena: za izmjene navedene u sljedećim dvjema tablicama pretpostavlja se da se javljaju samo povremeno (do 1 %) kod nemutiranih riba ako se drže u nastambama koje se dobro održavaju u skladu s Prilogom III. Direktivi 2010/63/EU. Vrijednosti se mogu razlikovati među objektima.

- Za procjenu smrtnosti genetski izmijenjenih riba na razini populacije trebalo bi koristiti primjerene stope smrtnosti za nemutirani tip.

Odjeljak B – Predložak za procjenu dobrobiti riba

Opažanja su strukturirana u sljedećih šest kategorija. Treba imati na umu da razvoj riba uvelike ovisi o vrsti i uvjetima smještaja (npr. temperatura vode i hranjenje). Opažene izmjene uvijek bi trebalo sagledati s obzirom na specifičnu nemutiranu pozadinu i uvjete smještaja određene nastambe.

Ličinke / izgled / tjelesne funkcije / ponašanja / pokazatelji specifični za postupak / slobodna opažanja

Kategorije više razine	Područja na koja se treba usredotočiti pri promatranju životinja	Specifični pokazatelji koje treba pratiti
Ličinke	Prije samostalnog hranjenja Naznačiti ako se navode procijenjene vrijednosti	Prosječna veličina legla izražena kao broj jajašaca (ili primjeri)
		Vrijeme od mriještenja do samostalnog hranjenja (ako se temperatura vode razlikuje od uobičajenih uvjeta smještaja, treba navesti točnu temperaturu vode)
		Valjenje kao postotak svih jajašaca u leglu, po mogućnosti evidentirati pet dana nakon oplodnje za zebrice
		Stopa preživljavanja ličinki u trenutku samostalnog hranjenja (npr. za zebrice pet dana nakon oplodnje, za medake 12 dana nakon oplodnje) kao postotak svih izlegnutih jajašaca
		Budući da se preživljavanje ličinki u kasnijoj fazi stabilizira, stopu preživljavanja kao postotak svih ličinki trebalo bi evidentirati u drugoj vremenskoj točki prije spolnog sazrijevanja (npr. za zebrice 28 dana nakon oplodnje)
	U vrijeme samostalnog hranjenja	Morfologija, npr. zaostajanje u razvoju / neuobičajeni razvoj, veličina, koža, peraje, svi oblici oticanja, neuobičajeno istežanje, srčani edemi, neotvoreni riblji mjehur
	Ponašanje pri plivanju i aktivnost, npr. stalno plivanje na dnu spremnika ili blizu površine, položaj u vodi	
Područja na koja se treba usredotočiti pri promatranju odraslih, spolno zrelih koštunjača		
Izgled	Stanje tijela	Varijabilnost u duljini, prevelika/premala veličina za dob (procjena)
		Neuhranjenost

		Pretilost/oticanje
		Promijenjen oblik, npr. nepravilnosti kralježnice
		Promjene na perajama ili nedostatak peraja (navesti što i kako)
		Promjene na škržnim poklopcima i nedostatak škržnih poklopaca (operkulum)
	Stanje ljuske i kože	Promjene na ljusci/koži
		Crvena koža
		Tamnija/svjetlija pigmentacija
		Ostale promjene u boji kože
		Čirevi
		Lokalizirane otekline / tumor
Tjelesne funkcije	Disanje	Povećana stopa otvaranja i zatvaranja škržnih poklopaca
		Gutanje na površini
	Unos hrane	Promjene u hranjenju (navesti)
	Ostalo	Navesti
Ponašanja	Plivanje	Pojačana/smanjena aktivnost (među ostalim na podražaj)
		Kruženje / okretanje pri plivanju / spiralno plivanje
		Trljanje o stijenu/dno spremnika, „udaranje” uz dno spremnika
		Plivanje na dnu spremnika
		Plivanje na površini
	Socijalna interakcija	Agresivnost
	Ostala pitanja povezana s populacijom	Gubitak ponašanja tipičnog za jato, odvajanje od jata
		Plodnost, posebno za mužjake i ženke. Uključujući podložnost nemogućnosti izbacivanja jajašaca.
		Smrtnost (ili rano usmrćivanje zbog štetnih znakova) prije očekivanog životnog vijeka ili najdulje trajanje života
Pokazatelji specifični za postupak	Određuju se na temelju pojedinačnog projekta, njegovih mogućih štetnih učinaka i predviđenih pokazatelja tih učinaka	

Slobodna opažanja	Plan procjene težine uvijek bi trebao uključivati mogućnost bilježenja potencijalnih opažanja neočekivanih negativnih učinaka na dobrobit.
--------------------------	--

Dodatna razmatranja za procjenu dobrobiti ličinki

Ličinke se procjenjuju isključivo opažanjem životinje – mikroskopijom, u petrijevoj zdjelici ili akvariju, ovisno o veličini. Za procjenu dobrobiti mora se koristiti reprezentativan broj ličinki (i leglâ). Za dopunu procjene dobrobiti treba uzeti u obzir posebne aspekte ličinki prije vremena samostalnog hranjenja.

Dodatna razmatranja za procjenu dobrobiti spolno zrelih, odraslih jedinki

Procjena odrasle i (po mogućnosti) spolno zrele ribe provodi se opažanjem životinje u akvariju. Sve ribe koje se promatraju po mogućnosti bi trebalo držati u istoj skupini jer bi odvajanje riba radi procjene uzrokovalo dodatan stres.

Općenito, iako se zasebna procjena spolova ne smatra nužnom, oba bi spola trebalo uključiti u procjenu. Ako postoje naznake da su uočene nepravilnosti specifične za određeni spol, procjena dobrobiti odraslih, spolno zrelih riba mora se obaviti zasebno za mužjake i ženke.

Plan procjene dobrobiti genetski izmijenjenih domaćih ili mini svinja

Preporuke specifične za procjenu dobrobiti domaćih ili mini svinja:

Procjena dobrobiti trebala bi uključivati životinje reprezentativnih dobnih skupina:

- ubrzo nakon rođenja, oko odvajanja (životinje stare 4 – 5 tjedana) i ponovno nakon spolne zrelosti (životinje stare približno 4 – 6 mjeseci) i u dodatnim vremenskim točkama koje se smatraju primjerenima u skladu s prognostičkim preispitivanjima mogućeg učinka izmjene gena, npr. ako pojava bolesti ovisi o dobi
- najmanje sedam mužjaka i sedam ženki iz više legla (u leglu mini svinja ima mali broj potomaka, a i broj genetski izmijenjenih rasplodnih životinja i broj životinja obično su mnogo manji nego za druge vrste).

Odjeljak B – Predložak za procjenu dobrobiti domaćih ili mini svinja

Izgled / tjelesne funkcije / okruženje / ponašanja / pokazatelji specifični za postupak / slobodna opažanja

Kategorije više razine	Područja na koja se treba usredotočiti pri promatranju životinja	Specifični pokazatelji koje treba pratiti
Izgled	Stanje tijela	Odstupanja od krivulje rasta
		Pretilost ili veća veličina
		Mršavost ili manja veličina
		Odstupanja u ocjeni stanja tijela
	Stanje krzna i kože	Odstupanje u boji kože
		Odstupanja u teksturi kože
		Odstupanja u kvaliteti dlake (npr. debelo krzno)
		Gubitak dlake ili alopecija
		Obješena koža zbog npr. dehidriranosti ili izgladnjelosti
		Lezije kože – oticanje, kraste, čirevi, ozljede/rane
		Dermatitis ili ekcem
	Iscjedak	Iz očiju, nosa, urogenitalni ili proljev
	Oči	Mikroftalmija
		Natečene ili zatvorene/poluzatvorene
		Oštećenje/ozljeda oka (npr. ulceracija rožnice ili znakovi sljepoće)
	Usta	Slinjenje
		Malokluzija/preveliki zubi
Ostalo	Malformacije (npr. deformacije kostura ili nepravilnosti kao što je hidrocefalus)	
	Morfološke, neurološke ili mišićno-kostane nepravilnosti	
	Natečen dio tijela (npr. nadutost trbuha) ili tumori	
Tjelesne funkcije	Disanje	Ubrzano disanje (tahipneja)
		Duboko disanje (hiperpneja)
		Otežano disanje (dispneja, dahtanje)

		Hroptanje ili drugi zvuk pri disanju
	Unos hrane	Povećan/smanjen
	Unos vode	Povećan/smanjen
	Tjelesna temperatura	Povišena/snižena; izmjerena tjelesna temperatura ako je dostupna (npr. kontaktno ili beskontaktno mjerenje temperature)
	Osjetila	Znakovi oštećenog vida, sluha ili ravnoteže
Okruženje	Okruženje u nastambi, uključujući stelju, materijal za izradu gnijezda, predmete za obogaćivanje	Prisutnost i čvrstoća izmeta
		Prekomjerno mokrenje
		Prisutnost tragova povraćanja ili krvi
		Koristi li životinja predmete za obogaćivanje, npr. materijal za izradu gnijezda, igračke za žvakanje
Ponašanja	Socijalna interakcija	Pokazuje li životinja cijeli raspon ponašanja primjerenih za soj, uključujući socijalnu interakciju, rovanje, hodanje, trčanje, spavanje
		Izoliranost ili povlačenje od drugih životinja u socijalnoj skupini
	Nepoželjna ponašanja	Ponavljajuće/stereotipno ponašanje
		Dulja neaktivnost
		Povećana agresivnost prema ljudima ili drugim životinjama
	Držanje i mobilnost	Neuobičajeno držanje (npr. prasad s raširenim nogama)
		Neuobičajen hod; hromost; nedovoljno kretanje / letargija / nevoljko kretanje pri stimulaciji
		Nekoordinirano ili teško kretanje ili poteškoće u orijentaciji
		Izbočen trbuh, nagnuta glava
	Ostalo	Krutost ili tremori
		Napadaji/konvulzije/grčevi/trzaji
		Glasanje, spontano ili izazvano
		Smrtnost (ili rano usmrćivanje zbog štetnih znakova) prije očekivanog životnog vijeka ili najdulje trajanje života

Pokazatelji specifični za postupak	Određuju se na temelju pojedinačnog projekta, njegovih mogućih štetnih učinaka i predviđenih pokazatelja tih učinaka	
Slobodna opažanja	Plan procjene težine uvijek bi trebao uključivati mogućnost bilježenja potencijalnih opažanja neočekivanih negativnih učinaka na dobrobit.	

Dodatna razmatranja za procjenu dobrobiti novorođenih životinja

KRITERIJI	ŠTO PROMATRATI
Boja kože i izgled novorođenih životinja	Pokazuju li neki prašćići znakove neuobičajene boje kože (npr. anemija, slaba cirkulacija)? Je li im koža obješena (znak dehidriranosti ili izgladnelosti)? Izgledaju li „čupavo“ (znak poteškoće u održavanju uobičajene tjelesne temperature)?
Aktivnost novorođenih životinja	Pokazuju li nekakvu neuobičajenu aktivnost? Jesu li novorođene životinje aktivne i kreću li se slobodno? Dišu li normalno? Je li njihovo držanje neuobičajeno (npr. prasad s raširenim nogama)?
Interakcija novorođenih životinja s krmačom i ponašanje pri sisanju	Jesu li novorođene životinje dobile kolostrum? Jesu li zainteresirane za sisanje i mogu li sisati? Čini li se da normalno konzumiraju mlijeko? Jesu li izolirane od krmače ili izvora topline? Dolazi li kod vimena do tuče i agresivnosti? Postoje li znakovi lošeg majčinskog ponašanja?
Leglo	Je li gestacija bila potpuna? Je li prasenje bilo uobičajeno? Je li bilo nepravilnosti s obzirom na veličinu legla, homogenost legla te rast i razvoj prasadi?

Plan procjene dobrobiti genetski izmijenjenih kokoši

Preporuke specifične za procjenu dobrobiti kokoši:

Važno je uključiti životinje reprezentativnih dobnih skupina:

- Treba uzeti u obzir stope uspjeha valjenja.
- Procjena se obavlja ubrzo nakon valjenja (obično u inkubatoru) i u drugim primjerenim vremenskim točkama* kod odraslih jedinki te starijih jedinki ili jedinki u najvećoj dobi do koje se životinje drže.
- Procjenjuje se najmanje sedam mužjaka i sedam ženki iz više legla jaja.
- Potrebna je usporedba sa sličnim životinjama koje nisu genetski izmijenjene kad god je to moguće.

* U dodatnim vremenskim točkama koje se smatraju primjerenima u skladu s prognostičkim preispitivanjima mogućeg učinka izmjene gena, npr. ako pojava bolesti ovisi o dobi.

Važno je znati je li ptica iz linije nesilica ili brojlera jer će to utjecati na hranjenje i fenotip, a o tome mogu stvarno ovisiti i potrebne razlike u okruženju i promjene prehrane.

Odjeljak B – Predložak za procjenu dobrobiti kokoši

Izgled / tjelesne funkcije / okruženje / ponašanja / pokazatelji specifični za postupak / slobodna opažanja

Kategorije više razine	Područja na koja se treba usredotočiti pri promatranju životinja	Specifični pokazatelji koje treba pratiti
Izgled	Stanje tijela / oblik / rast	Malformacije, neuobičajeni razvoj, deformacija kostura, raširene noge
		Odstupanja u rastu i od očekivane veličine
		Stanje tijela – specifično za nesilice/brojlere
		Gubitak/povećanje tjelesne mase
	Stanje perja i kože	Neuobičajeni razvoj perja
		Loše stanje perja / razbarušeno / prljavo
		Područja gubitka perja, više čupanja perja od očekivanog
		Dehidracija – boranje kože
		Lezije kože – osjetljivost/oticanje, kraste, čirevi, ozljede/rane
	Iscjedak	Iz očiju, nosa, nečisnice (kloake)
	Oči	Upale ili zamucene
		Zatvorene/poluzatvorene/natečene
		Oštećenje/ozljeda oka (npr. ulceracija rožnice)
	Kljun / probavni sustav	Problemi s gušom, kao što je začepljena guša
		Deformiran kljun, kresta ili rese
Ostalo	Boja i oblik resa i kreste – blijede/crvene/plavičaste; tvrde ili meke	
	Natečen dio tijela, npr. nadutost trbuha	
Tjelesne funkcije	Disanje	Ubrzano disanje (tahipneja)
		Duboko disanje (hiperpneja)
		Otežano disanje (dispneja, dahtanje)
		Hroptanje ili drugi zvuk pri disanju
	Unos hrane/vode	Povećan/smanjen

		Sposobnost pronalaska hrane i vode nakon valjenja kako je očekivano; trebaju pomoć ili držanje s kontrolama (kao pratnja)
	Tjelesna temperatura	Povišena/snižena; izmjerena tjelesna temperatura ako je dostupna (npr. kontaktno ili beskontaktno mjerenje temperature); boja ekstremiteta
	Osjetila	Znakovi oštećenog vida, sluha ili ravnoteže
	Razmnožavanje	Neuobičajena stopa održivih embrija pri pregledu jaja pod svjetlom (manja od očekivanih 90 %) Niska stopa valjenja zbog nemogućnosti razbijanja jajeta (životinja je zarobljena u ljusci) Uspješnost nesenja kokoši, početak dobi za nesenje, stopa proizvodnje jaja u razdoblju nesenja, nepravilnosti jajeta, čvrstoća ljuske, kvarenje jaja
Okruženje	Okruženje u nastambi, uključujući stelju, materijal za izradu gnijezda, predmete za obogaćivanje	Prisutnost i čvrstoća izmeta
		Prekomjerno/neuobičajeno prljanje podloge
		Koristi li životinja predmete za obogaćivanje, npr. pješčanik, prečku za sjedenje
Ponašanja	Socijalna interakcija	Životinje obično pokazuju cijeli raspon ponašanja primjerenih za soj, uključujući čišćenje, hodanje, trčanje, grebanje, valjanje u prašini, sjedenje na prečki, kratak „let“, traženje hrane
		Neuobičajena aktivnost, kao što je hiperaktivnost
		Promjena u uobičajenom temperamentu
		Izoliranost ili povlačenje od drugih ptica u socijalnoj skupini
	Nepoželjna ponašanja	Bojažljive/agresivne interakcije s drugim pticama, tjeskobno ponašanje (npr. izraženi odgovori bijega, skrivanje)
		Pojačano glasanje pri rukovanju životinjom
		Ponavljajuće/stereotipno ponašanje
		Čupanje perja
		Dulja neaktivnost (može ukazivati na kroničan stres ili depresiju (anhedonija) i/ili bolest/bol), osobito ako je povezana s pogrbljenim držanjem i/ili razbarušenim ili neodržanim perjem

		Povećana agresivnost prema ljudima ili drugim životinjama
	Držanje i mobilnost	Neuobičajeno držanje, pogrbljenost
		Poteškoće u orijentaciji
		Neuobičajen hod; hromost; nedovoljno kretanje / letargija / nevoljko kretanje pri stimulaciji
	Ostalo	Tremori
		Krutost
		Napadaji/konvulzije/grčevi/trzaji
		Glasanje, spontano ili izazvano
		Smrtnost (ili rano usmrćivanje zbog štetnih znakova) prije očekivanog životnog vijeka ili najdulje trajanje života
Pokazatelji specifični za postupak	Određuju se na temelju pojedinačnog projekta, njegovih mogućih štetnih učinaka i predviđenih pokazatelja tih učinaka.	
Slobodna opažanja	Plan procjene težine uvijek bi trebao uključivati mogućnost bilježenja potencijalnih opažanja neočekivanih negativnih učinaka na dobrobit.	

Četvrti dio: Prijenos informacija o dobrobiti genetski izmijenjenih životinja

1. Ključna načela

Kad se genetski izmijenjene životinje prenose unutar i između ustanova, važno je da s njima putuju i specifične informacije o njihovim potrebama u pogledu dobrobiti. To će svim osobama koje brinu o životinjama ili ih koriste omogućiti da razumiju posebne značajke životinja (ili sojeva ili linija) koje primaju, zajedno sa svim posebnim zahtjevima koji se mogu primjenjivati na životinje u pogledu njihove dobrobiti kako bi se odmah mogla primijeniti poboljšanja.

Te se informacije mogu prenositi u različitim oblicima, uključujući dokument u papirnatom obliku, elektronički spis ili bazu podataka. Važno je da pružaju prilagođene i smislene informacije te da budu lako dostupne svim osobama koje skrbe za genetski izmijenjenu životinju na svim lokacijama tako da sve životinje (ili skupine životinja) primaju dosljednu skrb tijekom cijelog života.

Koje bi se informacije trebale prenositi sa životinjama?

Uz sve relevantne podatke o stvaranju, uzgoju, nomenklaturi i genetskoj pozadini (**dio A procjene dobrobiti**), u dokumente za prijenos trebalo bi uključiti jasan opis fenotipa i sve druge značajke koje se uoče u procjeni dobrobiti (**dio B procjene dobrobiti**).

Pri prijenosu životinja iz nešteth linija posebno je važno izvijestiti o informacijama o uvjetima u kojima je provedena početna klasifikacija, npr. zdravstveni status ili okolišni uvjeti, jer te promjene mogu utjecati na posljedice genetske modifikacije na dobrobit životinja, što može uzrokovati reklasifikaciju iz nešteth linije u štetnu.

Kako bi se olakšale primjerene prakse smještaja, skrbi i praćenja, uz to je važno evidentirati informacije o potencijalnim pitanjima u pogledu dobrobiti koja bi mogla biti povezana s fenotipom, zajedno s odgovarajućim zahtjevima za skrb i uzgoj te mogućim strategijama poboljšanja (**dio C – Zahtjevi za skrb i uzgoj**). Te informacije treba dostaviti zajedno sa životinjama.

Sljedeće informacije trebalo bi uključiti za sve genotipe koji se mogu javiti (tj. heterozigoti i homozigoti) kao posljedica razmnožavanja životinja koje se prenose u novo okruženje.

Treba dostaviti relevantne informacije o:

- **fenotipima** – jesu li opaženi promatranjem u kavezu ili akvariju – uključujući životnu fazu / dob uključenih životinja
- **skrbi za životinje** – pitanja povezana s uzgojem koja bi utjecala na zdravlje životinja i bilo kakva posebna skrb o životinjama koja je potrebna (npr. dodaci prehrani, obogaćivanje)
- **sterilnosti** – pitanja povezana s plodnosti, rođenjem ili valjenjem ili roditeljskom skrbi

- **pojedinstima o soju** – nomenklatura, genetska pozadina, informacije o genotipu. Te su informacije poznate pod kraticom PASS.

2. Odjeljak C – Predložak za premještanje sa zahtjevima za skrb i uzgoj za genetski izmijenjene životinje

Odjeljak C – Zahtjevi za skrb i uzgoj						
<p>Kratak opis fenotipa, uključujući korektivne mjere i usmrćivanje</p> <p>Uključiti nepravilnosti u fenotipu i primjetljive značajke do kojih može doći i navesti dob u kojoj se javljaju (npr. ubrzo nakon rođenja/valjenja, pri odbijanju, samostalnom hranjenju ili tijekom spolnog sazrijevanja, kod odraslih jedinki ili tijekom razmnožavanja (nemogućnost razvoja jaja, pobačaji, abnormalni fetusi itd.))</p>						
	Do b	Vrsta znakova	Moguće posljedice na dobrobit	Mogući tretman, intervencije i strategije poboljšanja	Poseban smještaj ili skrb	Humano usmrćivanje
<p>Klinički znakovi</p> <p>Uključujući praćenje izgleda, tjelesnih funkcija i okruženja</p>						
<p>Znakovi u ponašanju</p>						

Uspješnost uzgoja, uključujući održivost mladunaca/potoma ka						
Preuranjena smrt						

Peti dio: Izvješćivanje o genetski izmijenjenim životinjama

1. Opći pravni okvir

Opće obveze izvješćivanja utvrđene su u članku 54. Direktive. Detaljni zahtjevi utvrđeni su u Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569.

Direktiva sadržava dvije vrste obveza izvješćivanja koje uključuju genetski izmijenjene životinje:

- 1) Godišnje statističko izvješćivanje uključuje statističke podatke o korištenju životinja, među ostalim u svrhu stvaranja i održavanja genetski izmijenjenih životinja. Za aktivnosti na koje se primjenjuje definicija „postupka” potrebno je odobrenje projekta, a na životinje koje se koriste u projektima općenito se primjenjuju obveze godišnjeg statističkog izvješćivanja.

Detaljni zahtjevi dostupni su u Prilogu III. Provedenoj odluci Komisije (EU) 2020/569.

- 2) Osim toga, države članice obvezne su svakih pet godina prikupiti informacije o provedbi Direktive. To obuhvaća dvije specifične kategorije podataka od uzgajivača i korisnika genetski izmijenjenih životinja o njihovom stvaranju i održavanju, a uključuje posljednju godinu petogodišnjeg ciklusa izvješćivanja:
 - sve ostale životinje koje nisu uključene u godišnje statističko izvješćivanje, uključujući one koje su posljedica stvaranja i održavanja genetski izmijenjenih linija (životinje koje su uzgojene, usmrćene i koje nisu korištene) te
 - reprezentativne informacije o metodama uzorkovanja tkiva u svrhu genetske karakterizacije (genotipizacije) – te životinje mogu biti, ali nisu nužno uključene i u godišnja statistička izvješća, ovisno o vrsti primijenjene metode uzorkovanja tkiva (vidjeti 70. stranicu).

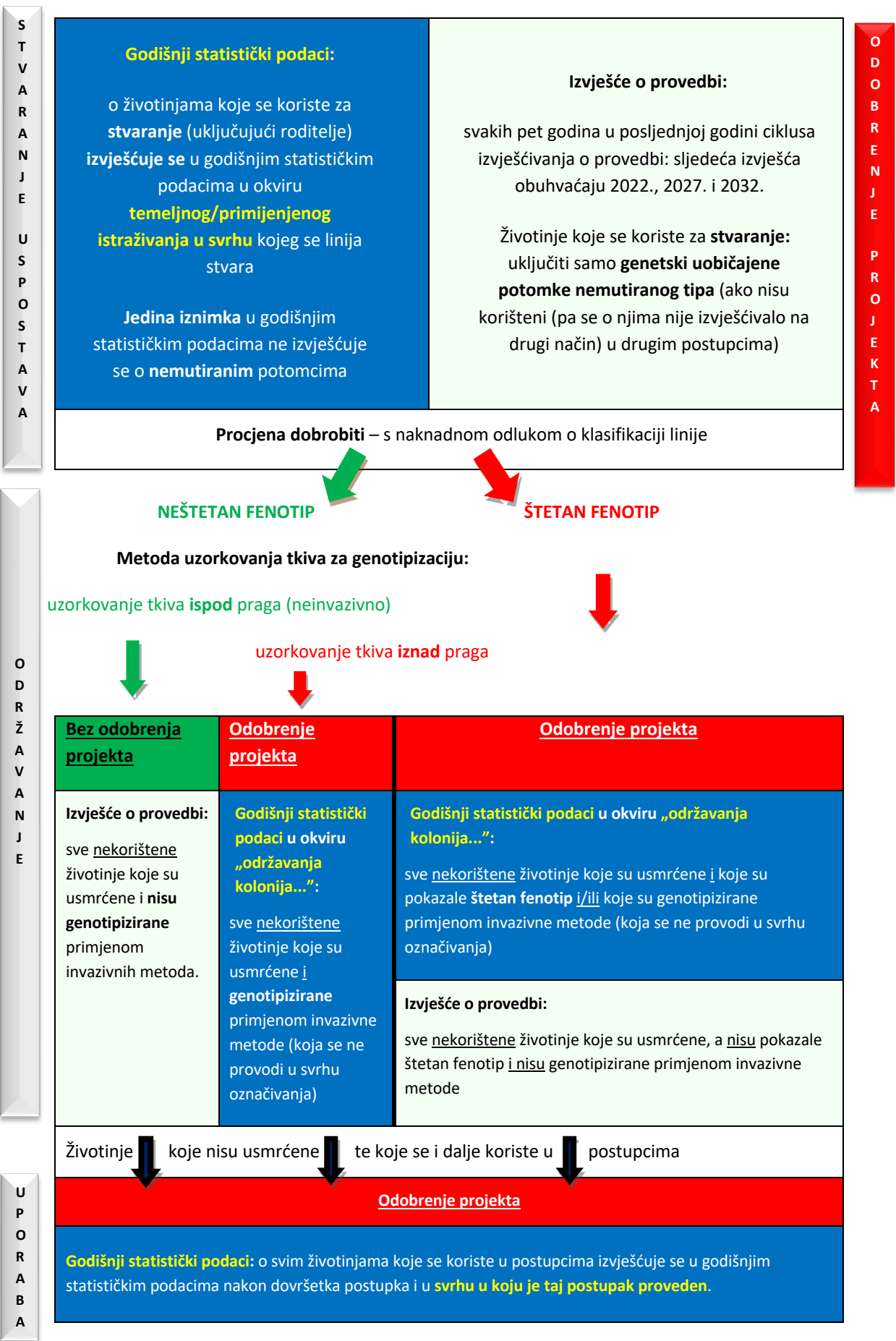
Detaljni zahtjevi dostupni su u Prilogu II. Provedenoj odluci Komisije (EU) 2020/569.

2. Dijagram toka zahtjeva za statističko izvješćivanje i izvješćivanje o provedbi za stvaranje, održavanje i korištenje genetski izmijenjenih životinja

Na dijagramu toka na sljedećoj stranici nalazi se sažetak zahtjevâ za izvješćivanje i za godišnje statističko izvješćivanje (tamnoplavi okviri) i petogodišnja izvješća o provedbi (svjetlozeleni okviri).

Dijagram toka može se preuzeti kao plakat na sljedećoj stranici:

https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pubs_posters_en.htm.



3.1. Godišnje statističko izvješćivanje

Pravni zahtjevi koji se odnose na genetski izmijenjene životinje i zahtjeve za godišnje statističko izvješćivanje

U Prilogu III. Provedenoj odluci Komisije (EU) 2020/569:

- u dijelu A određene su kategorije podataka koje treba koristiti
- u dijelu B navedene su opće upute i upute za detaljne kategorije podataka.

U svrhu godišnjeg statističkog izvješćivanja o životinjama se izvješćuje samo **jednom** na kraju postupka – obično izvješćuje nositelj projekta koji dovršava „korištenje”. U svrhu statističkog izvješćivanja važno je razlikovati „korištenje”, „stalno korištenje” i „ponovno korištenje” (više informacija dostupno je u [Radnom dokumentu o određenim člancima Direktive 2010/63/EU](#)⁹).

Izvješćivanje o životinjama koje se koriste za stvaranje genetski izmijenjenih linija

Sve genetski izmijenjene linije naručuju se u određenu znanstvenu svrhu. O postupcima povezanim sa stvaranjem novih genetski izmijenjenih linija mora se izvješćivati u odnosu na specifično istraživačko područje za koje se linija stvara. Stoga subjekti koji traže liniju i oni koji stvaraju nove linije moraju raspravljati i izraditi dokumentaciju kako bi se osigurala točnost izvješćivanja koje provodi nositelj projekta.

- „Stvaranje” je razvoj nove linije genetski izmijenjenih životinja namjernom genetskom izmjenom (npr. genetsko umetanje/brisanje/uređivanje, kemijska mutagenaza ili druga manipulacija gamete ili embrija ili križanje dvaju postojećih linija).

Kako je opisano u odjeljku 3. prvog dijela ovih smjernica, stvaranje nove genetski izmijenjene linije načelno se smatra postupkom. O životinjama koje se koriste u stvaranju izvješćuje se u godišnjim statističkim izvješćima, osim o potomcima koji se genotipiziraju neinvazivnim metodama i za koje se pokaže da su nemutirani, tj. ne nose genetsku mutaciju. O tim nemutiranim životinjama izvješćuje se samo u petogodišnjem izvješću o provedbi – vidjeti 65. stranicu.

Iznimka su slučajevi u kojima se križaju / povratno križaju **dvije linije s neštetnim fenotipom** i u kojima se može **razumno očekivati** da nova linija **neće** dovesti do štetnog fenotipa. Zahtjev za odobrenje projekta tad se možda neće primjenjivati, pa se o tim životinjama neće izvješćivati u godišnjim statističkim izvješćima **osim** ako su primijenjene invazivne metode genotipizacije.

Pri izvješćivanju o životinjama u godišnjem statističkom izvješću važno je zasebno uzeti u obzir oba roditelja i potomke jer se o svim životinjama može različito izvješćivati ovisno o, na primjer, genotipu i fenotipu koji pokažu i njihovoj sudbini (vidjeti tablicu u nastavku).

⁹ https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Consensus_document.pdf

Izvjješćivanje o životinjama koje se koriste za održavanje genetski izmijenjenih linija

Kad se linija uspostavi, nakon dovršetka procjene dobrobiti i klasifikacije na neštetne i štetne fenotipe te klasifikacije prema težini (uključujući razmatranje heterozigota i homozigota), izvješćivati bi trebalo pod kategorijom „Održavanje kolonija uspostavljenih genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima”, osim ako se životinje prenesu za stalno korištenje u znanstvenim postupcima za koje je potreban taj genotip.

O životinjama iz linije koja je okarakterizirana kao **neštetna** izvješćivat će se u godišnjem statističkom izvješću ako se primjenjuju invazivne metode genotipizacije i životinja se usmrćuje i ako se životinja drži živom i ima **nepredviđeni** genotip. O tome se izvješćuje kao o prvom korištenju. O životinjama s **predviđenim genotipom** koje se i dalje koriste u znanstvenim postupcima za koje je potreban taj genotip izvješćivat će se samo na kraju cijelog postupka tog stalnog korištenja.

Životinje iz uspostavljene linije koja je razvrstana kao **štetna** bit će podložne izvješćivanju u godišnjim statističkim izvješćima, tj. životinje koje pokazuju štetu i/ili koje su podvrgnute invazivnim metodama genotipizacije i usmrćene te godine bez naknadnog korištenja u znanstvenom postupku.

Detaljne informacije o zahtjevima za izvješćivanje nalaze se u tablici na sljedećoj stranici.

Izvjješćivanje o životinjama koje se kreću među postupcima, projektima, objektima i/ili državama članicama

Ako se životinje kreću među projektima i/ili objektima (unutar države članice ili između država), kako bi se omogućilo točno izvješćivanje na kraju života/postupka („korištenje”), pri premještanju životinja trebalo bi dostaviti i informacije koje pokazuju kojoj skupini životinja pripada:

- životinje koje nisu podvrgnute nikakvom postupku u prvom objektu
 - o njima izvješćuje primatelj ako ih koristi u znanstvenom postupku po završetku tog postupka
 - (napomena: o životinjama koje nisu podvrgnute nikakvom postupku u objektu koji ih prima ne izvješćuje se u godišnjem statističkom izvješću, ali o njima mora izvijestiti objekt u kojem se usmrćuju ako se usmrćuju u godini evidentiranja za petogodišnje izvješće o provedbi – vidjeti odjeljak 3.2.)
- životinja je podvrgnuta stalnom korištenju (npr. genotipizirana je invazivnom metodom kako bi se potvrdio odgovarajući genotip i premještena je radi korištenja u znanstvenom postupku za koji je potreban taj genotip)
 - o njima izvješćuje primatelj na kraju postupka
- životinja na kojoj je završeno „korištenje” (npr. genotipizirana je invazivnom metodom kojom je određeno da nema predviđeni genotip) i premješta se radi ponovnog korištenja
 - o njima izvješćuje i prvi odobreni korisnik koji je genotipizirao životinje u okviru prvog korištenja i primatelj na kraju ponovnog korištenja.

U sljedeće dvije tablice navedeni su uobičajeni postupci u okviru održavanja genetski izmijenjenih životinja i prikazana je shema odlučivanja koja olakšava određivanje treba li o životinji izvijestiti u godišnjem statističkom izvješću u okviru održavanja.

1. U prvoj tablici prikazane su životinje uzgojene iz uspostavljene genetski izmijenjene linije s **neštetnim fenotipom**.
2. U drugoj tablici prikazane su životinje uzgojene iz uspostavljene genetski izmijenjene linije sa **štetnim fenotipom**.

1. ŽIVOTINJE IZ ODRŽAVANJA POSTOJEĆE LINIJE S NEŠETNIM FENOTIPOM

Kakav je genotip životinje?	Je li životinja pretrpjela štetne učinke zbog genotipa?	Je li životinja genotipizirana invazivnom metodom uzorkovanja tkiva koja se ne koristi za identifikaciju? ¹⁰	Je li genotip potvrđen kako je predviđeno?	Je li životinja podvrgnuta drugim postupcima osim održavanja ili uzorkovanja tkiva ¹¹ ?	Je li životinja usmrćena u izvještajnoj godini, a nije korištena u drugim postupcima?	Treba li nositelj projekta (objekt) u godišnjim statističkim izvješćima izvijestiti o životinji za održavanje genetski izmijenjene linije?	Napomene	Prijavljena stvarna težina
Nije genetski izmijenjen	ne	ne	nije potrebno	ne	da	NE	Izvješćuje se samo jednom u pet godina u sklopu izvješća o provedbi.	nije potrebno
Nije genetski izmijenjen	ne	da	nije potrebno	ne	da	DA	Iako su informacije o težini samog uzorkovanja tkiva potrebne samo u godini prije petogodišnjeg izvješća o provedbi, preporučuje se zabilježiti metodu uzorkovanja tkiva s povezanom težinom kako bi se olakšala izrada petogodišnjeg izvješća o provedbi.	Najveća dosegnuta težina kao posljedica uzorkovanja tkiva
Genetski izmijenjen	ne	ne	nevažno	ne	da	NE	Neštetne genetski izmijenjene životinje – izvješćuje se samo jednom u pet godina u sklopu izvješća o provedbi.	nije potrebno
Genetski izmijenjen	ne očekivano da	ne	nevažno	ne	da	NE	Ako do štetnih učinaka dođe kod nekoliko životinja, treba ponoviti procjenu dobrobiti životinja i prema potrebi razmotriti reklasifikaciju iz neštetne linije u štetnu. Ako se linija reklasificira kao štetna, za njezino održavanje bit će potrebno odobrenje projekta. —	nije potrebno

¹⁰ To se odnosi na sve invazivne metode uzorkovanja tkiva ako se tkivo ne dobiva od označavanja životinje.

¹¹ U rijetkom slučaju kad je prijenos embrija potreban samo radi uklanjanja komenzalnih organizama iz kolonije za uzgoj (tj. ne radi poboljšanja zdravlja ili dobrobiti kolonije, nego zbog toga što je to potrebno u znanstvene svrhe), postupke koji se provode (npr. prijenos embrija, superovulacija prema potrebi) trebalo bi uključiti u godišnja statistička izvješća i evidentirati težinu kao najveću dosegnutu težinu koja je posljedica navedenog postupka.

							Izvrješćuje se samo jednom u pet godina u sklopu izvješća o provedbi.	
Genetski izmijenjen	neočekivano da	da	nevažno	ne	da	DA	Ako do štetnih učinaka dođe kod nekoliko životinja, treba ponoviti procjenu dobrobiti životinja i prema potrebi razmotriti reklasifikaciju iz neštetne linije u štetnu. Ako se linija reklasificira kao štetna, za njezino održavanje bit će potrebno odobrenje projekta.	
Genetski izmijenjen	ne	da	nevažno	ne	da	DA	Preporučuje se zabilježiti metodu uzorkovanja tkiva s povezanom težinom kako bi se olakšala izrada petogodišnjeg izvješća o provedbi koje će biti potrebno za te životinje, zajedno s godišnjim statističkim izvješćima.	Najveća dosegnuta težina kao posljedica uzorkovanja tkiva
Genetski izmijenjen	ne	da	da	ne	ne	NE	Invazivno uzorkovanje tkiva (kad se potvrdi očekivani fenotip i životinju se ne usmrti) prvi je dio stalnog korištenja ; <u>krainji korisnik treba evidentirati životinju u godišnjim statističkim izvješćima</u> nakon dovršetka posljednjeg korištenja.	Težinu uzorkovanja tkiva treba priopćiti krajnjem korisniku kako bi je mogao uzeti u obzir za završno izvješćivanje o stvarnoj težini.
Genetski izmijenjen	ne	da	genotip nije primjeren	ne	ne	DA	Invazivno uzorkovanje tkiva (kad se ne potvrdi očekivani fenotip i životinju se ne usmrti) smatra se prvim korištenjem te životinje; sva naknadna korištenja smatraju se ponovnim korištenjem . Preporučuje se zabilježiti metodu uzorkovanja tkiva s povezanom težinom kako bi se olakšala izrada petogodišnjeg izvješća o provedbi.	Najveća dosegnuta težina kao posljedica uzorkovanja tkiva

2. ŽIVOTINJE IZ ODRŽAVANJA POSTOJEĆE LINIJE SA ŠTETNIM FENOTIPOM

Kakav je genotip životinje?	Je li životinja pretrpjela štetne učinke zbog genotipa?	Je li životinja genotipizirana invazivnom metodom uzorkovanja tkiva ¹² ?	Je li genotip potvrđen kako je predviđeno ?	Je li životinja podvrgnuta drugim postupcima osim održavanja ili uzorkovanja tkiva ¹³ ?	Je li životinja usmrćena u izvještajnoj godini, a nije korištena u drugim postupcima?	Treba li nositelj projekta (objekt) u godišnjim statističkim izvješćima izvijestiti o životinji za „održavanje“ genetski izmijenjenih životinja?	Napomene	Prijavljena stvarna težina
Nije genetski izmijenjen	ne	ne	nije potrebno	ne	da	NE	Izvješćuje se samo jednom u pet godina u sklopu izvješća o provedbi.	nije primjenjivo
Nije genetski izmijenjen	ne	da	nije potrebno	ne	da	DA	Preporučuje se zabilježiti metodu uzorkovanja tkiva s povezanom težinom kako bi se olakšala izrada petogodišnjeg izvješća o provedbi.	Najveća dosegnuta težina kao posljedica uzorkovanja tkiva
Genetski izmijenjen	ne	ne	nevažno	ne	da	NE	Izvješćuje se samo jednom u pet godina u sklopu izvješća o provedbi.	nije primjenjivo
Genetski izmijenjen	da	ne	nevažno	ne	da	DA		Najveća dosegnuta težina kao posljedica štetnih učinaka zbog genotipa
Genetski izmijenjen	ne	da	nevažno	ne	da	DA	Preporučuje se zabilježiti metodu uzorkovanja tkiva s povezanom težinom kako bi se olakšala izrada petogodišnjeg izvješća o provedbi.	Najveća dosegnuta težina kao posljedica uzorkovanja tkiva
Genetski izmijenjen	da	da	nevažno	ne	da	DA	Preporučuje se zabilježiti metodu uzorkovanja tkiva s povezanom težinom kako bi se olakšala izrada petogodišnjeg izvješća o provedbi.	Najveća dosegnuta težina, pri čemu se uzimaju u obzir i rezultat štetnih učinaka kao posljedica genotipa i rezultat uzorkovanja tkiva

¹² To se odnosi na sve invazivne metode uzorkovanja tkiva ako se tkivo ne dobiva od označavanja životinje.

¹³ U rijetkom slučaju kad je prijenos embrija potreban samo radi uklanjanja komenzalnih organizama iz kolonije za uzgoj (tj. ne radi poboljšanja zdravlja ili dobiti kolonije, nego zbog toga što je to potrebno u znanstvene svrhe), postupke koji se provode (npr. prijenos embrija, superovulacija prema potrebi) trebalo bi uključiti u godišnja statistička izvješća i evidentirati težinu kao najveću dosegnutu težinu koja je posljedica navedenog postupka.

Genetski izmijenjen	ne	da	da	ne	ne	NE	Životinja nije usmrćena, već je podvrgnuta invazivnom uzorkovanju tkiva koje je prvi dio stalnog korištenja ; <u>krajnji korisnik treba evidentirati životinju u godišnjim statističkim izvješćima nakon dovršetka korištenja.</u>	Životinja možda jest ili možda nije pretrpjela štetne učinke kao posljedica genotipa. Najveću težinu, pri čemu se uzimaju u obzir i učinci genotipa i uzorkovanja tkiva, treba priopćiti krajnjem korisniku kako bi je mogao uzeti u obzir za završno izvješćivanje o stvarnoj težini.
Genetski izmijenjen	da	da	da	ne	ne	NE	Životinja nije usmrćena, već je podvrgnuta invazivnom uzorkovanju tkiva koje je prvi dio stalnog korištenja ; <u>krajnji korisnik treba evidentirati životinju u godišnjim statističkim izvješćima nakon dovršetka korištenja.</u>	Životinja možda jest ili možda nije pretrpjela štetne učinke kao posljedica genotipa. Najveću težinu, pri čemu se uzimaju u obzir i učinci genotipa i uzorkovanja tkiva, treba priopćiti krajnjem korisniku kako bi je mogao uzeti u obzir za završno izvješćivanje o stvarnoj težini.
Genetski izmijenjen	ne	da	genotip nije primjeren	ne	ne	DA	Invazivno uzorkovanje tkiva (kad se ne potvrdi očekivani fenotip i životinju se ne usmrti, već se ostavlja živom radi korištenja u drugoj studiji za koju je potreban taj genotip ili za studiju u kojoj genotip nije važan) smatra se prvim korištenjem te životinje; sva naknadna korištenja smatraju se ponovnim korištenjem. Preporučuje se zabilježiti metodu uzorkovanja tkiva s povezanom težinom kako bi se olakšala izrada petogodišnjeg izvješća o provedbi.	Najveća dosegnuta težina kao posljedica uzorkovanja tkiva

3.2. Izvješće o provedbi svakih pet godina

Pravni zahtjevi koji se odnose na genetski izmijenjene životinje i izvješća o provedbi država članica

U Prilogu II. Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569 zahtijeva se izvješćivanje svakih pet godina u dvama zasebnim područjima koja uključuju genetski izmijenjene životinje. To su:

- životinje koje su uzgojene, usmrćene i koje nisu korištene te koje su posljedica stvaranja ili održavanja genetski izmijenjene linije
- životinje koje su podvrgnute uzorkovanju tkiva, neovisno o metodi koja se koristi za dobivanje tog tkiva.

Detaljni pravni zahtjevi dostupni su u dijelu C točki 2. i dijelu D točki 3.1. Priloga II. Provedenoj odluci Komisije (EU) 2020/569.

Životinje koje su uzgojene, usmrćene i koje nisu korištene

Direktivom se zahtijeva da se jednom svakih pet godina izvijesti o točnom broju svih životinja koje su potrebne za potporu istraživanju i ispitivanju u EU-u. To se dijelom dobiva iz godišnjih statističkih podataka za tu godinu, koji uključuju sve životinje koje su se koristile u postupcima, a drugi dio za utvrđivanje ukupnog broja dovršava se jednom svakih pet godina brojenjem svih ostalih životinja koje su uzgojene, usmrćene i nisu korištene u postupcima. Ta kategorija obuhvaća i obične životinje i životinje iz stvaranja i održavanja genetski izmijenjenih linija.

U usporedbi s podacima za 2017., za buduća izvješća životinje koje su usmrćene radi dobivanja organa/tkiva treba iskazivati zasebno.

Važno je napomenuti da o informacijama koje se daju za ovu kategoriju podataka ne izvješćuju samo **korisnici, već i uzgajivači životinja**.

Pri izvješćivanju o životinjama iz stvaranja i uzgoja genetski izmijenjenih linija za potrebe izvješća o provedbi važno je zasebno uzeti u obzir oba roditelja i potomke jer se o svim životinjama može različito izvješćivati ovisno o genotipu i fenotipu koji pokažu.

Ako se uzgaja genetski izmijenjena linija, o njoj bi trebalo izvješćivati kao o genetski izmijenjenoj, osim ako se potvrdi (npr. genotipizacijom, bojom krzna) da ona nije genetski izmijenjena.

Države članice koriste različite metode za prikupljanje tih podataka. Radi jasnoće u zajednici uzgajivača i korisnika životinja neke države članice odlučile su prikupljati te podatke svake godine.

Europska komisija izradila je dobrovoljni alat za pomoć u točnom prikupljanju tih podataka primjenom predložka u Excelu („Predložak za podatke korisnika/uzgajivača za potrebe izvješća o provedbi država članica”, vrsta evidencije IR2). Može se upotrebljavati za evidentiranje godišnjih podataka.

Zahtjevi za izvješćivanje detaljno su opisani u tablici na 68. stranici. Međutim, s obzirom na to da se alati za izvješćivanje različitih zemalja mogu razlikovati, u tablici se upućuje samo na alate koje izradila Komisija.

Preporuke:

- Države članice trebale bi osigurati da odgovarajuća nadležna tijela i znanstvena zajednica budu svjesni da postoje i da su im dostupni točni i najnoviji alati za prikupljanje podataka o životinjama koje su uzgojene, usmrćene i koje nisu korištene prije početka pete godine u petogodišnjem ciklusu izvješćivanja.

Uzorkovanje tkiva

Za razliku od *točnog broja* svih životinja koje su uzgojene, usmrćene i koje nisu korištene, države članice dužne su dostaviti *reprezentativne* podatke o uzorkovanju tkiva. Cilj izvješća o uzorkovanju tkiva nije utvrditi ukupan broj životinja čije je tkivo uzorkovano. Umjesto toga, ono omogućuje analizu na razini EU-a o vrstama životinja, udjelima različitih metoda uzorkovanja tkiva koje se primjenjuju i njihovoj povezanoj težini kako bi se procijenio napredak u provedbi načela zamjene, smanjenja i poboljšanja u svrhu uzorkovanja tkiva.

Načini na koji države članice tumače i prikupljaju reprezentativne podatke znatno se razlikuju. Kako bi se smanjila zabuna u korisničkoj zajednici i pojednostavnili zahtjevi za izvješćivanje, neke države članice odlučile su svake godine prikupljati sve podatke od svih uzgajivača i korisnika. Druge države članice prikupljale su podatke samo posljednje godine petogodišnjeg ciklusa izvješćivanja. U nekim slučajevima podaci su se prikupljali iz svih objekata, a u drugima samo iz reprezentativnog broja objekata. U nekim slučajevima iz svih su se relevantnih objekata prikupljali djelomični podaci (npr. za šest mjeseci izvještajnog razdoblja). U budućim petogodišnjim izvješćima o provedbi navest će se kriteriji koje države članice koriste za odabir i podnošenje podataka kako bi se osiguralo da su dostavljene informacije reprezentativne. Države članice trebale bi odrediti te kriterije i na vrijeme ih priopćiti znanstvenoj zajednici.

Kao i o podacima o životinjama koje su uzgojene, usmrćene i koje nisu korištene, o informacijama o uzorkovanju tkiva izvješćuju **i korisnici i uzgajivači životinja**.

Za razliku od izvješćivanja o životinjama koje su uzgojene, usmrćene i koje nisu korištene, neke životinje o kojima se izvješćuje u okviru uzorkovanja tkiva možda će biti uključene i u godišnje statističko izvješćivanje ako je životinja podvrgnuta drugim znanstvenim postupcima (čak i ako je uzorak tkiva dobiven neinvazivnom metodom ili ako se za genetsku karakterizaciju koristio višak tkiva od označivanja) ili ako je na životinji izvršena invazivna metoda uzorkovanja tkiva.

Potrebne su informacije za sve vrste podvrgnute uzorkovanju tkiva. Za sve vrste životinja treba izvijestiti o broju životinja prema vrsti primijenjene metode i, ako je riječ o invazivnim metodama, povezanoj distribuciji težine.

Kako bi olakšala prikupljanje podataka o metodama uzorkovanja tkiva i njihovoj povezanoj težini, Europska komisija izradila je dva dobrovoljna komplementarna alata koji se koriste u tu svrhu:

- za životinje o kojima se izvješćuje u godišnjim statističkim izvješćima u predlošku za godišnje statističko izvješćivanje u Excelu dostupna su dodatna dobrovoljna polja (X – Z) u kojima se mogu zabilježiti informacije o uzorkovanju tkiva i

X	Y	Z
Method of tissue sampling	Specify other method	Severity of genotyping
[IG1] Invasive genotyping: blood sampling		
[IG2] Invasive genotyping: ear biopsy		
[IG3] Invasive genotyping: tail biopsy		
[IG6] Invasive genotyping: fin biopsy		
[IG4] Invasive genotyping: toe clipping		
[IG5] Invasive genotyping: other		
[ST1] Surplus tissue from the marking of an animal via ear punch		
[ST2] Surplus tissue from the marking of an animal via toe clipp		

- za životinje o kojima se ne izvješćuje u godišnjim statističkim izvješćima može se koristiti dobrovoljan list u Excelu za dodatne podatke korisnika („Predložak za podatke korisnika/uzgajivača za potrebe izvješća o provedbi država članica”, vrsta evidencije IR1) radi bilježenja neinvazivnog uzorkovanja tkiva i upotrebe viška materijala od identifikacije/označavanja životinje.

A	J	K
Entry data		
Record type *	Method of tissue sampling	Specify other method
[IR1] Tissue sampling (non-invasive genotyping or from surplus tissue)		
	[ST1] Surplus tissue from the marking of an animal via ear punch	
	[ST2] Surplus tissue from the marking of an animal via toe clipping	
	[NG1] Non-invasive genotyping: hair sampling	
	[NG2] Non-invasive genotyping: observation under special lighting	
	[NG3] Non-invasive genotyping: post mortem	
	[NG4] Non-invasive genotyping: other	

Ti komplementarni alati, ako se koriste zajedno, pridonijet će točnom izvješćivanju. Ako se jedan izostavi, država članica na raspolaganje treba staviti drugi alat kako bi se osiguralo evidentiranje svih potrebnih informacija i izvješćivanje o njima u izvješću o provedbi.

Ako se u državi članici upotrebljavaju prethodno opisani alati, u tablici u nastavku prikazuje se koji alat treba upotrebljavati u kojim slučajevima, kako izvješćivati o stvarnoj težini povezanog s uzorkovanjem tkiva i tko bi trebao izvješćivati.

Izvješćivanje o metodama uzorkovanja tkiva U SVRHU PETOGODIŠNJEG IZVJEŠĆA O PROVEDBI UPOTREBOM ALATA EUROPSKE KOMISIJE						
Metoda genotipizacije	Životinju se nakon uzorkovanja tkiva usmrćuje	Životinja se koristi u (prvom / stalnom / još jednom) ¹ postupku nakon uzorkovanja tkiva		Izvješćivanje uz pomoć dobrovoljnog lista u Excelu ¹⁴	Izvješćivanje dodavanjem relevantnih informacija u godišnje statističko izvješće - stupci X-Z	Napomene
		U istom objektu	U drugom objektu			
				-		
				vrsta evidencije: [R1]		

¹⁴ Dobrovoljni list u Excelu „Predložak za podatke korisnika/uzgajivača za potrebe izvješća o provedbi država članica”.

				uzorkovanj e tkiva		
Neinvazivna metoda ili iz viška tkiva od označivanja životinje²	da	ne	ne	DA		Izvešćuje objekt u kojem je životinja genotipizirana i usmrćena.

Neinvazivna metoda ili iz viška tkiva od označivanja životinje ²	ne	da	ne		DA	Informacije o uzorkovanju tkiva dodaju se upotrebom stupaca X – Z u godišnjem statističkom izvješćivanju nakon dovršetka korištenja te životinje u postupku.
Neinvazivna metoda ili iz viška tkiva od označivanja životinje ²	ne	ne	da		DA	O metodi uzorkovanja tkiva izvješćuje objekt u kojem je uzorkovano tkivo životinje.
Invazivna metoda uzorkovanja tkiva – ne iz viška tkiva od označivanja životinje	da	ne	ne		DA	O uzorkovanju tkiva izvješćuje se kao o jedinom korištenju u godišnjim statističkim izvješćima u okviru održavanja ili stvaranja – stvarna težina uzorkovanja tkiva navodi se i u stupcu „T” i „Z” ³ .
Invazivna metoda uzorkovanja tkiva – ne iz viška tkiva od označivanja životinje	ne	da, stalno korištenje za koje je potreban taj genotip	ne		DA	Za tu će se životinju izvijestiti o dvjema težinama: za glavno korištenje i za uzorkovanje tkiva. O stvarnoj težini cijelog postupka (uključujući učinak invazivnoga genotipiziranja) izvješćuje se u stupcu „T”. Težina u stupcu „Z” trebala bi se odnositi samo na stvarnu težinu uzorkovanja tkiva ³ .
Invazivna metoda uzorkovanja tkiva – ne iz viška tkiva od označivanja životinje	ne	da, u drugom postupku za koji nije određen genotip	ne		DA	Invazivno uzorkovanje tkiva je prvo „korištenje”, a naknadna upotreba „ponovno korištenje”. Prvi korisnik mora izvijestiti o stvarnoj težini uzorkovanja tkiva i u stupcu „T” i „Z”. O uzorkovanju tkiva izvješćuje se kao o prvom korištenju u godišnjim statističkim izvješćima u okviru održavanja ili stvaranja ³ .
Invazivna metoda uzorkovanja tkiva – ne iz viška tkiva od označivanja životinje	ne	ne	da, stalno korištenje za koje je potreban taj genotip		DA	O uzorkovanju tkiva izvješćuje se samo na kraju cijelog postupka, a izvješćuje objekt koji je dovršio „korištenje”. Za tu će se životinju izvijestiti o dvjema težinama: za glavno korištenje i za uzorkovanje tkiva. O stvarnoj težini cijelog postupka (uključujući učinak invazivnoga genotipiziranja) izvješćuje se u stupcu „T”. Težina u stupcu „Z” trebala bi se odnositi samo na uzorkovanje tkiva ³ . Informacije o invazivnom uzorkovanju tkiva (metoda i stvarna težina) trebale su biti dostavljene sa životinjom.
Invazivna metoda uzorkovanja tkiva – ne iz viška tkiva od označivanja životinje	ne	ne	da, u drugom postupku za koji nije potreban određen genotip		DA	O uzorkovanju tkiva kao o „prvom korištenju” izvješćuje objekt u kojem je uzorkovano tkivo životinje (u okviru stvaranja ili održavanja) – stvarna težina u stupcima „T” i „Z” stoga se odnosi na stvarnu težinu uzorkovanja tkiva ³ . Informacija o tome da je životinja već prvi put korištena trebala bi se slati sa životinjom. Primjenjuju se uvjeti za ponovno korištenje.

1. Prvo korištenje: uzorkovanje tkiva provedeno je neinvazivnom metodom ili upotrebom viška tkiva od označivanja životinje, pa se uzorkovanje ne smatra postupkom te će se potencijalni naknadni postupak smatrati prvim korištenjem.

Stalno korištenje: tkivo životinje uzorkovano je invazivnom metodom, predviđeni genotip potvrđen je i životinja je korištena (= stalno korištenje) u postupku za koji je bio potreban taj genotip.

Ponovno korištenje u drugom postupku: tkivo životinje uzorkovano je invazivnom metodom (= prvo korištenje), ali se životinja zatim koristi u postupku za koji nije potreban predviđeni genotip.

2. Neinvazivno uzorkovanje tkiva / korištenje viška tkiva od označivanja životinje ne smatra se postupkom / korištenjem životinje.
3. Stvarna težina koja se navodi u stupcu „Z” trebala bi se odnositi samo na stvarnu težinu uzorkovanja tkiva, za razliku od stvarne težine koja se navodi u stupcu „T” i koja bi trebala odražavati najveću težinu koju životinja iskusi tijekom cijelog korištenja (tj. uključujući učinke genotipa, genotipizacije i težine koju životinja iskusi za vrijeme drugih elemenata postupka).

Preporuke:

- Države članice trebale bi na vrijeme odrediti kriterije uzorkovanja za „reprezentativne podatke” za prikupljanje podataka o uzorkovanju tkiva i o tome obavijestiti odgovarajuća nadležna tijela i znanstvenu zajednicu.
- Države članice trebale bi osigurati da odgovarajuća nadležna tijela i znanstvena zajednica imaju najnovije alate i informacije o zahtjevima za prikupljanje podataka o uzorkovanju tkiva.

Dodaci

Dodatak I.: Primjeri baza podataka genetski izmijenjenih linija

Poveznice provjerene u ožujku 2020.

1. Nepotpuni popis primjera baza podataka genetski izmijenjenih linija:

- <http://www.informatics.jax.org/>
- <https://www.infracontier.eu/>
- <https://archive.har.mrc.ac.uk/index>
- <https://www.mousephenotype.org/>
- <http://zfin.org/>
- <https://www.xenbase.org/gene/static/geneNomenclature.jsp>.

2. Stranica za probir (screening) ljudskih gena i genetskih poremećaja: <https://omim.org>

Dodatak II.: Zahtjev za projekt i procjena projekta za stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih linija

Uvod

U člancima od 36. do 44. Direktive 2010/63/EU utvrđeni su zahtjevi za prijedlog, procjenu i odobrenje projekta.

Dio A ovog Dodatka (na temelju Priloga VI. Direktivi) odnosi se i na podnositelje zahtjeva za projekt i na procjenitelje. U njemu su utvrđeni zahtjevi za informacije koje su posebno važne za razmatranje u zahtjevu za stvaranje i/ili održavanje genetski izmijenjenih linija.

U članku 37. utvrđeni su elementi koje treba uključiti u zahtjev za odobrenje projekta:

- prijedlog projekta
- netehnički sažetak projekta i
- podaci o elementima iz Priloga VI. Direktivi.

Dio B ovog Dodatka uglavnom je namijenjen procjeniteljima projekta. Usmjeren je na postupak procjene projekta i u njemu se ističu glavna pitanja koja se razmatraju i način na koji se ona mogu sagledati za vrijeme procjene. Taj dio može biti koristan i podnositeljima zahtjeva za projekt jer omogućuje bolje razumijevanje pitanja koja se moraju uzeti u obzir u postupku procjene kako bi se osiguralo da su ispunjene obveze iz Direktive.

Više informacija o zahtjevima iz Direktive dostupno je u [Smjernicama EU-a za procjenu projekata i retroaktivnu ocjenu](#).

Dio A: Ogledni primjeri ključnih informacija u zahtjevu za projekt s genetski izmijenjenim životinjama

Prijedlog projekta

U prijedlogu se utvrđuju ključna znanstvena pitanja na koja treba odgovoriti, uključujući namjenu projekta (kako je utvrđeno u članku 5.). Prijedlog projekta je podnesak nadležnim tijelima koji sadržava pojedinosti o planiranim aktivnostima i u kojem se traži odobrenje za taj projekt. Ako je to primjereno i dopušteno u predmetnoj državi članici, trebalo bi razmotriti upotrebu višekratnih generičkih projekata

(https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Consensus_document.pdf) i pojednostavnjenih administrativnih postupaka kako je određeno u članku 40. stavku 4. i članku 42.

Ako se uzgajaju i održavaju samo genetski izmijenjene linije s neštetnim fenotipom, ali se primjenjuju invazivne metode uzorkovanja tkiva, potrebno je odobrenje projekta. Takav projekt može biti jednostavan, s glavnim fokusom na poboljšanje i predviđenu klasifikaciju tih postupaka po težini.

Projekti za stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih životinja obično su potrebni u svrhu temeljnog ili primijenjenog istraživanja. U tim projektima trebalo bi utvrditi trenutačno stanje znanstvenih spoznaja na kojima se projekt temelji. Prema potrebi trebalo bi uključiti ciljeve ostvarene u prethodnim projektima i odrediti točne ciljeve koje bi trebalo ostvariti u tom projektu. Znanstveni slučaj trebalo bi prikazati precizno i poduprijeti glavnom literaturom / preglednom literaturom. Iako neće biti moguće navesti detaljne znanstvene ciljeve ako se genetski izmijenjene linije proizvode za druge, podnositelj zahtjeva mora dobiti informacije o linijama koje treba stvoriti i njihovoj svrsi od korisnika/kupaca životinja ako mu to nije poznato.

U prijedlogu treba objasniti zašto nije moguće ostvariti znanstvene ciljeve bez upotrebe genetski izmijenjenih životinja, koliko će se životinja koristiti, zašto su potrebne nove genetski izmijenjene linije te potvrditi da nisu dostupne druge primjerene linije. Možda će za uslužne projekte trebati uspostaviti sustav (vidjeti u nastavku) ako informacije dostavljaju klijenti i ako ih treba preispitati.

Netehnički sažetak projekta

Predložak za netehnički sažetak projekta nalazi se u dijelu A Priloga I. Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569, a smjernice za podnošenje bit će dostupne naknadno na stranici https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pubs_guidance_en.htm.

Popis elemenata iz članka 37. stavka 1. točke (c) i Priloga VI.

U tablici u nastavku navedeni su elementi iz Priloga VI. koji se moraju uzeti u obzir u zahtjevu za projekt. Oni se zatim razrađuju u nastavku u kontekstu genetski izmijenjenih životinja kako bi se osiguralo da zahtjev procjeniteljima projekta daje dovoljno informacija kako bi mogli odlučiti trebaju li preporučiti odobrenje.

	Element iz Priloga VI.	Numerirani odjeljci u kojima se u nastavku raspravlja o elementu
I.	Primjerenost i opravdanost sljedećeg: (a) korištenja životinja uključujući njihovo podrijetlo, procijenjen broj, vrstu i stupanj razvoja	1.a, 1.b, 1.c, 1.d, 1.e, 2., 3.
	(b) postupaka.	1., 2.
II.	Upotreba metoda za zamjenu, smanjenje i poboljšanje korištenja životinja u postupcima.	1.f, 1.g, 1.h, 3.
III.	Planirana upotreba anestezije, analgezije i drugih metoda za ublažavanje bolova.	3.c.i.
IV.	Smanjenje, izbjegavanje i ublažavanje svih oblika patnje životinja, od rođenja do smrti, kad je to potrebno.	3.c, 1.f, 1.g, 1.h
V.	Korištenje humanih metoda okončanja.	3.c.v.

VI.	Eksperimentalna ili opservacijska strategija i statistički plan za smanjenje broja životinja, boli, patnje, stresa i utjecaja na okoliš, kad je potrebno.	3., 4., 5.
VII.	Ponovna upotreba životinja i kumulativni učinak upotrebe na životinje.	3.b.iv., 3.c.vii.
VIII.	Predložena klasifikacija po težini postupka.	4.
IX.	Izbjegavanje neopravdanog dupliciranja postupaka kad je primjereno.	3.a.i.
X.	Uvjeti smještaja, uzgoja i skrbi za životinje.	3.c.iv.
XI.	Metode usmrćivanja.	3.c.vi.
XII.	Osposobljenost osoba uključenih u projekt.	6.a, 6.b

Elementi u nastavku obuhvaćaju i stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih linija, s namjerom da bi se mogli kombinirati u istom projektu, a treba ih koristiti prema potrebi. Redoslijed nije onakav kao iz prethodnog popisa, već je prikazan tako da se može lakše pratiti pri sastavljanju zahtjeva za projekt.

Trenutačno se u Europi stvaranje, uzgoj i korištenje genetski izmijenjenih životinja mogu razvrstati u četiri vrste kategorija:

- 1. Znanstveni projekt**, koji uključuje **uzgoj, održavanje i korištenje** životinja te **može uključivati stvaranje novih linija** (uključujući križanje postojećih genetski izmijenjenih linija). Sve relevantne informacije bit će dostupne podnositelju zahtjeva te bi postupci podnošenja zahtjeva i procjene trebali biti jednostavni.
- 2. Projekt za pružanje usluga tipa A – uzgoj i održavanje uspostavljenih štetnih genetski izmijenjenih linija radi dostave znanstvenim istraživačkim skupinama**, npr. ob/ob i lepr miševi. Te linije često će se uzgajati i održavati na komercijalnoj osnovi, **često izvan objekta za korištenje**. Štetni učinci linija bit će poznati pa se šteta uzima u obzir na odgovarajući način.
- 3. Projekt za pružanje usluga tipa B – u tom slučaju stvaranje, uzgoj i održavanje genetski izmijenjenih životinja obavljaju se kao centralizirana usluga unutar istraživačkog objekta**. Sve relevantne informacije lako su dostupne kod znanstvenika koji naručuje liniju i povratne informacije jednostavno se šalju pružatelju usluga.
- 4. Projekt za pružanje usluga tipa C – u tom slučaju skupina s visokom razinom stručnosti nalazi se u objektu, koji je neovisan od znanstvenog korisnika / istraživačkog objekta**, i može biti u potpunosti komercijalna. U tom se slučaju genski konstrukti šalju sa zahtjevom za stvaranje nove linije životinja i obavljanje svih potrebnih aktivnosti za proizvodnju uspostavljene genetski izmijenjene linije. To se zatim obično šalje korisniku za uzgoj i održavanje. Glavna je funkcija te vrste projekta **stvaranje novih linija iz genskih konstrukcija**.

Taj popis vrsta projekata nije sveobuhvatan i moguće su druge kombinacije postupaka.

U tekstu u nastavku s jedne se strane govori o znanstvenim projektima, a s druge strane o uslužnim projektima.

1. Primjerenost i opravdanost postupaka

Potrebne su popratne informacije kako bi se razumio kontekst zahtjeva unutar relevantnog znanstvenog područja (ili manje učestalo, regulatornog okvira).

- a. Opći cilj stvaranja i/ili održavanja genetski izmijenjenih linija trebao bi biti jasan tako da izgledna postignuća čine temelj za procjenu koristi koje će se vjerojatno ostvariti projektom. Treba osigurati da popratne informacije budu specifične i daju pregled područja upotrebe te navesti zašto su postupci potrebni iz znanstvenog, medicinskog, veterinarskog ili forenzičkog gledišta. Glavne točke treba poduprijeti literaturom (i/ili regulatornim smjernicama) i ishodima prethodnog rada.

Za uslužne projekte treba opisati uslugu koja će se pružati i kako će pružanje usluge koristiti korisnicima u smislu dodane prednosti u odnosu na situaciju u kojoj bi korisnici sami obavljali uslugu koju traže. Mora biti jasno koje su namjene relevantne za projekt i možda će trebati pribaviti informacije od klijenata kako bi se odredila namjena i dokazalo da je razumno očekivati koristi od uzgoja životinja.

- b. **Namjena** – za projekte za stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih životinja postupci se mogu odobriti samo za utvrđene namjene (članak 5. Direktive). Iz informacija navedenih u zahtjevu trebalo bi biti očito koja se od tih namjena primjenjuje:
 - (a) temeljna istraživanja
 - (b) translacijska ili primijenjena istraživanja s bilo kojom od sljedećih namjena:
 - i. zaštita, prevencija, dijagnosticiranje ili liječenje bolesti, boležljivosti ili drugih nepravilnosti ili njihovih učinaka kod ljudi, životinja ili biljaka
 - ii. ocjena, otkrivanje, reguliranje ili izmjena fizioloških stanja kod ljudi, životinja ili biljaka ili
 - iii. dobrobit životinja i poboljšanje proizvodnih uvjeta za životinje iz uzgoja za poljoprivredne potrebe
 - (c) za bilo koji cilj iz točke (b) pri razvoju, proizvodnji ili ispitivanju kvalitete, učinkovitosti i sigurnosti lijeka, prehrambenih proizvoda i hrane za životinje te drugih tvari ili proizvoda
 - (d) zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti ljudi ili životinja
 - (e) istraživanja usmjerena na zaštitu vrsta
 - (f) visokoškolsko obrazovanje ili osposobljavanje za stjecanje, održavanje ili unapređivanje strukovnih vještina
 - (g) forenzička ispitivanja.

O namjenama iz točaka od (d) do (g) vrlo se rijetko izvješćuje kad je riječ o upotrebi genetski izmijenjenih životinja. Ako se namjerava stvoriti genetski izmijenjene životinje za namjene iz točaka od (d) do (g), preporučuje se uspostava kontakta s nacionalnim/regionalnim/nadležnim tijelom kako bi se odredilo je li namjena točno određena. Za projekte koji uključuju samo održavanje postojećih linija u netehničkom

sažetku projekta i u statističkom izvješćivanju trebalo bi odabrati „održavanje”. Međutim, važno je objasniti opće područje upotrebe u dijelu zahtjeva za projekt s informacijama o kontekstu i u netehničkom sažetku projekta.

c. Ciljevi projekta

Za znanstvene projekte trebalo bi jasno navesti znanstvene ciljeve. Velika većina (> 95 %) novih genetski izmijenjenih linija proizvodi se u svrhu temeljnih istraživanja (ostatak za translacijska/primijenjena istraživanja). Te se linije koriste kao potpora za projekte odobrene za istraživanje specifičnih ciljeva u znanstvenoj disciplini. Kao primjer može se navesti neurološki projekt u kojem se istražuju geni koji sudjeluju u demijelinizaciji (oštećenje živaca) radi razvoja strategija za liječenje teških bolesti kao što je multipla skleroza. U tom se projektu može tražiti odobrenje za razvoj nekoliko novih genetski izmijenjenih linija radi istraživanja patogeneze (uzroka) demijelinizacije. Taj bi projekt mogao uključivati sve postupke potrebne za stvaranje, održavanje i naknadna znanstvena korištenja tih životinja u okviru jednog definiranog programa rada.

Za znanstveni projekt u zahtjevu trebalo bi odgovoriti na pitanja kao što su:

- Zašto su takve životinje/linije potrebne?
- Koji su razlozi za odabranu vrstu?
- U kojim će se studijama koristiti?
- Koji će se znanstveni ishodi/ciljevi ostvariti stvaranjem tih životinja?
- Zašto su potrebni svi postupci koji se traže za stvaranje, uzgoj i održavanje tih genetski izmijenjenih linija?

Za razliku od toga, za uslužne projekte u zahtjevu morat će se definirati ciljevi povezani s isporukom visokokvalitetne usluge koja će drugima omogućiti ostvarivanje znanstvenih koristi.

d. Ako je dostupno stručno znanje za razvoj genetski izmijenjenih životinja (unutar istraživačkog objekta kao uslužni projekt tipa B ili u drugom objektu kao uslužni projekt tipa C), moguć je zahtjev za projekt za stvaranje novih genetski izmijenjenih linija kojima će se ispunjavati potrebe više istraživačkih skupina. Treba razmotriti upotrebu tog stručnog znanja za pružanje učinkovite usluge koja odgovara na potrebe i interne i šire znanstvene zajednice. Za uslužni projekt u zahtjevu bi trebalo odgovoriti na pitanja kao što su:

- potražnja za uslugom
- vrste životinja koje će se nuditi i relevantno iskustvo sa svakom vrstom
- kako će podnositelj zahtjeva odrediti korištenje i namjenu životinja (prije stvaranja/održavanja)
- koje bi prednosti ta usluga pružila krajnjim korisnicima
- zašto su potrebni svi postupci koji se traže za stvaranje, uzgoj i održavanje tih genetski izmijenjenih linija?

e. Ako je to primjereno i dopušteno u predmetnoj državi članici, projekti s genetski izmijenjenim životinjama mogli bi se odobriti kao višekratni generički projekti kako je

utvrđeno u članku 40. Međutim, ti višekratni generički projekti i dalje moraju osigurati da se za svaku novu liniju može točno utvrditi namjena postupaka kako se zahtijeva člankom 5. Direktive (vidjeti prethodnu točku 1.b) u smislu odobrenja i da se ona evidentira. Za uslužne projekte u zahtjevu treba opisati interne operativne postupke za naručivanje novih linija od klijenta, uključujući organizaciju, upravljanje i preispitivanje zahtjeva unutar objekta. Ti bi postupci trebali pokazati pouzdano upravljanje i kontrolu kvalitete internog postupka odlučivanja. U tim slučajevima interni postupak jamči upravljanje razvojem nove linije kako bi se osiguralo da su lokalni postupci dovoljni da bi se ispunili zahtjevi odobrenja projekta. Dobro vođenje evidencije iznimno je važno i treba nastojati da evidencija o odlučivanju za sve linije naknadno bude dostupna i otvorena za inspekciju/pregled koje vrši nadležno tijelo kako bi se osigurala stalna učinkovitost internog nadzora. Važno je da se u zahtjevu i naknadnom odobrenju u potpunosti navedu ukupni predviđeni broj životinja i povezane težine postupaka. Nakon stvaranja i uspostave nove linije često je potrebno održavati te uspostavljene linije. Stoga, prije nego što se životinje premjeste za stalno korištenje u korisničkom projektu, treba razmisliti o projektu u kojem se kombiniraju stvaranje i održavanje. Ako je potrebno samo održavanje uspostavljenih linija, one se mogu uzgajati i održavati u specijaliziranom projektu uzgoja/održavanja (uslužni projekt tipa A) prije dostave drugom korisniku radi stalnog korištenja u okviru njegova odobrenog projekta. Odobrenje za usluge može se odnositi na višekratni generički projekt, ali nije izgledno da će se odobrenje projekta krajnjeg korisnika odnositi na višekratni generički projekt.

- f. Za znanstvene projekte trebalo bi razmotriti bi li bilo učinkovitije proizvoditi linije u specijaliziranom mjestu za stvaranje u kojem učinkovitost može biti veća, zbog čega u projekt za znanstvenu upotrebu ne bi bilo potrebno uključiti vazektomiju, superovulaciju ni postupke primanja embrija.
- g. Za znanstvene projekte u kojima se linije ne stvaraju u istom istraživačkom objektu u obzir treba uzeti stres koji uzrokuje prijevoz životinja, a koji bi trebalo smanjiti ako iz drugog objekta nije moguće uvoziti/donositi gamete/embrije. Kvaliteta izvora trebala bi biti na visokoj razini ako se koristi specijalizirana usluga, ali kupac treba primijeniti dužnu pažnju.
- h. Trebalo bi uključiti rasprave o tome može li doći do neciljnih učinaka i opservacijsku strategiju za njihovo otkrivanje (odjeljak 2. drugog dijela).

2. Značaj i učinak potencijalnih koristi

U zahtjevima treba jasno odgovoriti na sljedeća pitanja:

- a. Koje su koristi proizvodnje genetski izmijenjenih linija?
- b. Kome će ishodi biti korisni?
- c. Kako će oni imati koristi ili koji će biti učinak ishoda **tog projekta**?
- d. Kad će se ostvariti koristi (ako je moguće odrediti)?

Ako se traži odobrenje projekta koji je osmišljen za proizvodnju više genetski izmijenjenih linija, koje su možda raznolike, u različite istraživačke svrhe (obično kod uslužnih projekata), uključujući višekratne generičke projekte, glavne koristi mogu biti pružanje visokokvalitetne, učinkovite i djelotvorne usluge kupcima koju pružaju vrlo iskusni specijalizirani stručnjaci koji stvaraju precizne, visokokvalitetne genetski izmijenjene životinje, pri čemu se u okviru usluge maksimalno smanjuju šteta za dobrobit i broj životinja.

Za zahtjeve za stvaranje (i održavanje) genetski izmijenjenih linija u svrhu temeljnih istraživanja (znanstveni projekti) trebalo bi uvesti obvezu širenja rezultata.

Za zahtjeve za odobrenje uslužnih projekata trebalo bi uvesti obvezu smanjenja viška životinja i dijeljenja linija ako je to izvedivo.

3. Uvođenje/uključivanje metoda za zamjenu, smanjenje i poboljšanje korištenja životinja u postupcima

Detaljne informacije o načinima primjene načela zamjene, smanjenja i poboljšanja dostupne su u drugom dijelu ovih smjernica. Vrlo je važno da podnositelj zahtjeva u zahtjevu dokaže da je uzeo u obzir sve relevantne aspekte.

O primjerima ključnih elemenata raspravlja se u nastavku.

a. Zamjena

U zahtjevu treba objasniti zašto je korištenje životinja nužno, koje su se alternative razmatrale i zašto se ne mogu koristiti. U tom odjeljku treba i smjestiti rad sa životinjama u kontekst cjelokupnog znanstvenog programa, tj. koje se alternative koriste za aspekte projekta i kakvi su njihovi doprinosi.

To primjerice može uključivati sljedeća pitanja:

- i. pretraživanja koja su provedena te će se i dalje provoditi kako bi se utvrdilo jesu li linije dostupne ili će postati dostupne negdje drugdje kako bi se izbjeglo nepotrebno udvostručivanje
- ii. razmatranja upotrebe drugih vrsta životinja koje su izvan područja primjene Direktive, kao što su *Drosophila* ili *Caenorhabditis elegans*.

b. Smanjenje

To bi trebalo uključivati razmatranje eksperimentalne ili opservacijske strategije / strategije uzgoja za smanjenje broja životinja. Statistički plan rijetko ima ulogu u **fazi stvaranja** genetski izmijenjenih životinja. Međutim, dobro upravljanje kolonijom u kojem se usklađuju ponuda i potražnja ključno je za smanjenje. Primjeri pitanja na koja treba odgovoriti:

- i. razmatranje najprimjerenije genske tehnologije za najučinkovitije ostvarenje znanstvenog cilja
- ii. način primjene praćenja životinja, gameta, potomaka itd. za učinkovito stvaranje i uzgoj životinja
- iii. razmatranje krioprezervacije radi smanjenja potrebe za održavanjem velikog broja živih životinja

- iv. pojedinosti o svim predloženim ponovnim korištenjima životinja i njihovim kumulativnim učincima na životinju – npr. nemutirani potomci koji su genotipizirani invazivnom metodom, a zatim se koriste za superovulaciju radi dobivanja nemutiranih jaja za genetsku manipulaciju
- v. korištenje životinja za dobivanje organa/tkiva
- vi. pojašnjenje načina na koji je procijenjen navedeni broj životinja koji se traži, npr. broj linija koje treba uzgojiti/stvoriti ili broj životinja za koje se traži kirurški postupak.

c. Poboljšanje

Opće izjave o tome da će se primijeniti poboljšanja neće biti dovoljne. Podnositelji zahtjeva trebaju objasniti kako će se korištenje životinja poboljšati u predviđenim postupcima, uključujući smanjenje, izbjegavanje i ublažavanje svih oblika patnje životinja, od rođenja do smrti, kad je to potrebno:

- i. Objasniti planirano korištenje anestezije, analgezije i drugih metoda ublažavanja boli kod kirurških postupaka potrebnih za stvaranje nove genetski izmijenjene linije: npr. vazektomija, kirurški prijenos embrija;
- ii. Objasniti životne faze koje će se koristiti – uključujući upotrebu vrlo mladih ženki za razmnožavanje / vađenje jajašaca.
- iii. Objasniti odabir metoda uzorkovanja tkiva – upotreba viška tkiva od označivanja životinja ili, ako se predlažu invazivne metode, opravdanje zašto nisu primjerene neinvazivne metode i koje će se metode lokalne anestezije/analgezije koristiti.
- iv. Objasniti uvjete smještaja, uzgoja i skrbi za životinje – npr. imunokompromitirane životinje držat će se u uvjetima koji osiguravaju prepreku kako bi se smanjila vjerojatnost infekcije, koristit će se posebna hrana, npr. dulje davanje vlažne kaše ako se očekuje da će mladunci biti mali za svoju dob u odnosu na ono što je uobičajeno, povećanje temperature u nastambi za životinje bez dlake.
- v. Objasniti primjenu humanog usmrćivanja – posebno važno za štetne fenotipe, osobito ako šteta ima veliki učinak. Važno može biti humano usmrćivanje povezano s dobi – npr. usmrćivanje prije dobi od šest mjeseci kad se [fenotip] prvi put očituje.
- vi. Objasniti metode usmrćivanja – mora se odabrati najhumanija metoda usmrćivanja, npr. metoda iz Priloga IV. koristi se za usmrćivanje majki primateljica nakon odbijanja legla dobivenog kirurškom implantacijom. U nekim će se slučajevima, ako su potrebna tkiva genetski izmijenjenih životinja, u odobrenje uzgoja i održavanja kao izuzeće možda morati uključiti metoda koja nije navedena u Prilogu IV. ako je to jedino „korištenje”. Za metode koje nisu navedene u Prilogu IV. treba navesti posebno opravdanje, npr. potrebna je upotreba perfuzijske fiksacije kako bi se očuvala mikroanatomija u nekim znanstvenim slučajevima.

- vii. Objasniti ostale sudbine životinja – sudbina životinja za uzgoj koje se više ne koriste, ponovno korištenje nemutiranih životinja.
- viii. Opisati postupke uspostavljene kako bi se osiguralo korištenje novih tehnika poboljšanja za trajanja projekta.

4. Klasifikacija postupaka po težini

Nakon dovršetka postupaka, zajedno s poboljšanjima koja treba primijeniti, trebalo bi biti moguće svakom postupku dodijeliti predviđenu težinu.

Za znanstvene projekte kod predviđene težine morat će se uzeti u obzir razmatranje težine stalnog korištenja i učinci same linije. U nekim slučajevima, ako odobrenje ne obuhvaća uzgoj ili održavanje, trebalo bi raspraviti o postupku za određivanje težine do trenutka isporuke od uzgajivača jer su te informacije potrebne za izvješćivanje o stvarnoj težini na kraju postupka.

U zahtjev treba uključiti informacije o postupcima koji će se koristiti u stvaranju i održavanju genetski izmijenjenih linija, štetnim učincima do kojih može doći i metodama koje će se primjenjivati za smanjenje učinaka na životinje.

Za uslužne projekte tipa A trebat će uzeti u obzir štete koje uzrokuje invazivna genotipizacija koja se ne koristi za identifikaciju te održavanje u kojem će postojati učinak na dobrobit zbog samih genetski izmijenjenih linija.

Za uslužne projekte tipa B i C, uz štete opisane za uslužne projekte tipa A za uzgoj i održavanje, u obzir treba uzeti i štete koje proizlaze iz postupaka stvaranja (uključujući nepredvidljivost šteta u novim genetski izmijenjenim linijama).

Za sve postupke treba predložiti klasifikaciju težine, koja odražava najveću očekivanu težinu. Informacije o ciljnom genu trebale bi omogućiti donošenje utemeljene odluke o vjerojatnom najgorem scenariju za sve pojedinačne životinje. Predviđena težina trebala bi se odrediti kao „teška” iz predostrožnosti samo ako se ne može donijeti utemeljena odluka, ali trebalo bi opisati rano usmrćivanje kako bi se štete što više smanjile.

Za postupke koji se primjenjuju na životinje potrebne su informacije o:

- učestalosti/trajanju postupaka
- vjerojatnosti štetnih učinaka
- stupnju težine i metodologiji za njezino smanjenje
- planu praćenja, protokolima procjene dobrobiti
- humanom usmrćivanju i pokretačima intervencija.

Za rutinski potrebne postupke, kao što su prijenos embrija, superovulacija i kirurška implantacija embrija, potomke koji se proizvode sa štetnim fenotipom ili invazivno uzorkovanje tkiva treba objasniti moguće štetne učinke, metode koje se primjenjuju za njihovo smanjenje, kao što je analgezija, te osigurati primjenu najhumanijih metoda.

Pri stvaranju novih linija treba razmotriti moguće štetne učinke na potomke. Oni se mogu predvidjeti na temelju informacija o genima koji se mijenjaju ili informacija o drugim linijama

sa sličnim izmjenama. Međutim, kod nekih se linija mogu javiti neočekivani štetni učinci – ako njihova težina bude veća od predviđene, možda će trebati tražiti izmjenu projekta.

Težinu bi trebalo odrediti u skladu s odgovarajućim kriterijima za klasificiranje iz odjeljka II. i primjerima iz Priloga VIII. te smjernicama EU-a o okviru za težinu, koje uključuju primjer slučaja genetski izmijenjenih životinja ([model 6., 62. stranica](#)).

Uz najveću težinu svakog postupka (predviđena klasifikacija postupaka po težini) važno je dokazati koje su realistične očekivane štete cijelog projekta, pri čemu treba uzeti u obzir cijeli projekt i sve postupke. To će procjenitelju projekta olakšati provedbu procjene štete i koristi. Tablica iz netehničkog sažetka projekta može biti korisno sredstvo za sažimanje tih informacija.

Navedite vrste i broj životinja koje se planiraju koristiti. Navedite stupanj težine postupka i broj životinja u svakoj kategoriji težine (po vrsti).	Vrsta	Predviđen i ukupni broj	Predviđeni broj po težini postupka			
			Nepovratna	Blaga	Umjerena	Teška
	Miš	5400	0	5000	300	100
	Zebrica	10 500	0	7500	2500	500

5. Učinak na okoliš

Prema potrebi treba smanjiti učinak na okoliš – osim nemogućnosti puštanja genetski izmijenjenih životinja na slobodu to gotovo nikad nije značajno za ovu vrstu projekta.

6. Analiza štete i koristi

Analiza štete i koristi koju obavljaju procjenitelji uključuje određivanje vjerojatnosti uspješnog ostvarenja predloženih koristi. U zahtjevu treba dokazati da su koristi veće od štete.

- a. Područje genetskih izmjena životinja brzo se razvija i potrebno je specifično stručno znanje i iskustvo osoba koje sudjeluju u projektu. To se nadovezuje na opće zahtjeve za osposobljenost i pruža potrebne informacije koje omogućuju procjenu vjerojatnosti uspjeha. Uključuje vještine, znanje i iskustvo za učinkovito i djelotvorno vođenje projekta, uključujući iskustvo koje će omogućiti odabir metoda genske manipulacije / uređivanja gena i održavanje integriteta linija nakon njihove uspostave. Važni su prethodni rezultati istraživačke skupine te kvaliteta i pouzdanost rada koji je prethodio projektu. Iako prethodno iskustvo nije nužno, novi istraživač ima manju vjerojatnost za uspjeh i procjenitelji bi to trebali uzeti u obzir u analizi štete i koristi, pri čemu treba uzeti u obzir stručno znanje dostupno u projektu. Nove istraživače u tom području neće se sprečavati da traže odobrenja

ako je vjerojatnost uspjeha onoga što traže dovoljno velika. Zahtjevi za uslužne projekte, uključujući one klasificirane kao višekratni generički projekti, moraju dokazati da postoji dovoljna razina vještina i iskustva za odlučivanje o tome može li se rad koji drugi traže (za tip B unutar ili tip C izvan objekta) opravdano obaviti u okviru predloženog projekta (vidjeti odjeljak 1., u kojem se nalaze primjeri vrsta odluka koje će podnositelj zahtjeva možda morati donijeti).

- b.** Uspješni ishodi vjerojatno će biti izgledniji i ako se u projektu raspolaže odgovarajućim resursima u smislu osoblja, opreme i financijskih sredstava.
- c.** Dokazati da su koristi veće od štete jednostavnije je za zahtjeve za specifična znanstvena područja. To može biti teže ako se zahtjev podnosi za višekratni generički projekt. U tom bi slučaju trebalo dokazati vrijednost same usluge, zajedno s vjerojatnim koristima za znanost genetski izmijenjenih linija koje će se uključiti u odobrenje projekta.

Dio B: Ogladni primjer procjene prijedloga projekta s genetski izmijenjenim životinjama

Riječ je o postupku u dva koraka. Kad procjenitelj daje mišljenje o zahtjevu, trebao bi provjeriti jesu li prethodno opisane informacije uključene u zahtjev. To je provjera prikazana u prvoj tablici u nastavku. Ako su uključene sve informacije, može se prijeći na procjenu (iz druge tablice), ali potpuna procjena nije moguća bez dovoljno informacija. Za svaki relevantni odjeljak treba unakrsno usporediti prethodne elemente kako bi se osiguralo da kvaliteta dostavljenih informacija omogućuje donošenje odluke o svim kriterijima i da je u skladu s pravnim zahtjevima. Razmatranja i ishodi u nastavku razlikovat će se prema vrstama odobrenja kako je opisano u dijelu A. U nekim slučajevima pitanja i primjeri ishoda procjene primjenjuju se na sve vrste. Navedeni su neki primjeri u kojima postoje razlike.

1. U procjeni projekta treba **provjeriti** ispunjava li projekt sljedeće kriterije:

	Kriteriji potrebni u procjeni projekta:	Razmatranja načina na koji procjenitelji projekta mogu ispuniti zahtjeve za provjeru	Primjeri ishoda procjene u kojima se obrađuju potrebni ključni elementi
(a)	projekt je utemeljen sa znanstvenog ili obrazovnog stajališta ili se zahtijeva zakonodavstvom	<p>Za znanstvene projekte procjenitelj projekta treba dovoljno informacija kako bi mogao odlučiti je li znanost „vrijedna truda“.</p> <p>ILI</p> <p>Za uslužne projekte, uključujući višekratne generičke projekte, procjenitelji trebaju dovoljno informacija:</p> <ul style="list-style-type: none"> - o načinu na koji će se opravdanje za korištenje životinja odrediti tijekom životnog ciklusa projekta za svaku liniju ili skupinu i <ul style="list-style-type: none"> - o načinu utvrđivanja znanstvenih (ili drugih) koristi i - o koristima specijalizirane usluge koja se pruža drugima. 	<p>U projektu će se na životinjama izvesti mutacije u putovima za koje se zna ili pretpostavlja da su povezani s razvojem demijelinizacije. Životinje proizvedene na taj način koristit će se za daljnje opisivanje putova u nadi da će se utvrditi terapijski ciljevi za daljnji razvoj. Očekuje se da će se za vrijeme tog petogodišnjeg projekta utvrditi nekoliko tih ciljeva. Ti će se ciljevi obznaniti drugim znanstvenicima i potencijalnim farmaceutskim ili biotehničkim društvima objavom u znanstvenim časopisima. Za taj je rad dostupna visoka razina znanstveno ocijenjenih sredstava. Skupina je dosad objavljivala u eminentnim časopisima i pokazala je dobre dokaze napretka u proteklih pet godina, što ukazuje na to da je vjerojatnost uspjeha velika.</p> <p>ILI</p> <p>Za uslužni projekt tipa A sve linije koje treba uzgojiti i održavati jesu uspostavljene linije povezane s pretilosti. Preuzeta je obveza da će se životinje dobavljati samo odobrenim objektima koji imaju odobrenje projekta za taj rad, a to će dokazati dostavom broja</p>

			<p>odobrenja projekta. Skupina je iskusna u učinkovitim postupcima uzgoja u kojima se usklađuju ponuda i potražnja.</p> <p>III</p> <p>Za uslužne projekte tipa B i C podnositelj zahtjeva poznati je stručnjak u području transgene tehnologije i pridonio je izradi smjernica o najboljoj praksi u tom području. Svi postupci koji se traže obavljali su se u proteklih 10 godina i postoje dokazi o poboljšanjima i mjerama koje su smanjile višak životinja. Ta je skupina ostvarila veliko poboljšanje u osiguravanju kvalitete linija i genetskog integriteta. Opisani su sustavi dobrog upravljanja kako bi se osiguralo da nijedna nova linija nije već dostupna negdje drugdje i da će koristi proizvodnje svih linija biti veće od štete koja se očekuje u potrebnim postupcima stvaranja. Proizvodnju svih linija financira klijent, a njega će se provjeriti kako bi se potvrdilo da je stvaran znanstvenik/korisnik s visokim očekivanjem kvalitetnog znanstvenog ishoda. Predložci evidencije o internim postupcima trebali bi dati sve potrebne informacije za odlučivanje i navedeno je da će biti dostupni za inspekciju.</p>
(b)	svrha projekta opravdava korištenje životinja i	Ovdje odluka uključuje razmatranje očekivanih koristi i određivanje potencijalne upotrebe alternativa.	<p>Budući da demijelinizacija uzrokuje niz bolesti koje dovode do invaliditeta od mlade dobi, a često i preuranjene smrti, te da taj projekt pruža mogućnost utvrđivanja mogućih terapijskih ciljeva za poboljšanje ishoda, u tu su svrhu opravdani stvaranje, uzgoj i održavanje te korištenje genetski izmijenjenih životinja.</p> <p>Podnositelj zahtjeva dokazao je pretraživanjem, i procjenitelji se slažu, da ne postoje alternativne metode koje mogu zamijeniti korištenje genetski izmijenjenih životinja za taj projekt.</p>
(c)	projekt je osmišljen tako da omogućuje provođenje postupaka na što je više moguće human i okolišno osviješten način.	Procjenitelj treba biti uvjeren da nije svjestan nikakvih poboljšanja koja bi se mogla uključiti (a da se i dalje ostvare znanstveni/obrazovni/regulatorni ishodi). Učinak	Navedeno je dovoljno informacija o praćenju životinja kako bi se uočili znakovi povezani s demijelinizacijom i uključene su primjerene krajnje točke za obavljanje procjene (vidjeti u nastavku).

		na okoliš vjerojatno neće biti relevantan za tu vrstu projekta.	
<i>U nekim slučajevima ranije verzije projekta neće sadržavati dovoljno informacija da bi se mogla provjeriti ta pitanja. U tim bi slučajevima podnositelju zahtjeva trebalo vratiti konkretne napomene i trebalo bi ga pozvati da dopuni/izmijeni zahtjev. U većini slučajeva te bi napomene trebalo kombinirati sa svim dodatnim informacijama koje su potrebne da bi se omogućio dovršetak procjene projekta.</i>			

2. Procjena projekta posebno uključuje sljedeće:

	Elementi potrebni u procjeni projekta:	Primjeri razmatranja načina na koji procjenitelj projekta može ispuniti zahtjeve za procjenu	Primjeri ishoda procjene u kojima se obrađuju potrebni ključni elementi
(a)	procjena ciljeva projekta, predviđene znanstvene koristi ili obrazovne vrijednosti	<p>Procjenitelj projekta iz informacija iz zahtjeva treba odrediti je li znanost „vrijedna truda“. Na primjer, hoće li opisano stvaranje genetski izmijenjenih životinja dati uvid u tijek ili posljedice bolesti? Kad bi znanje bilo dostupno, je li izgledno da bi to dovelo do napretka u terapijama za bolesnike koji pate od te bolesti? Je li izgledno da će modeli biti valjani? Što bi se izgubilo ako se aktivnosti ne bi provele?</p> <p>II</p> <p>Za uslužne projekte, uključujući višekratne generičke projekte – koje su prednosti upotrebe centralizirane usluge?</p> <p>Hoće li stvaranje i održavanje biti djelotvorniji i učinkovitiji ako se obavljaju na taj način? Hoće li biti prednosti za dobrobit životinja?</p> <p>Je li odlučivanje o linijama koje bi trebalo proizvesti pouzdano? Hoće li se opravdanje za korištenje životinja odrediti na temelju pojedinačne linije/skupine i kako će se odrediti znanstvena (ili druga) korist svake linije?</p>	<p><i>Za znanstveni projekt:</i></p> <p>U okviru projekta stvorit će se linije genetski izmijenjenih miševa koje će se koristiti za ispitivanje putova povezanih s taloženjem mijelina i/ili povezanih upalnih procesa. Očekuju se napreci u znanju na kojima će se temeljiti potencijalni načini liječenja. Iako se ne očekuje da će se za vrijeme projekta razviti način liječenja, postojeće znanje u literaturi trebalo bi se znatno proširiti, što će drugima omogućiti da se usmjere na vjerojatne ciljeve koji bi dugoročno mogli poboljšati kvalitetu i trajanje života tih bolesnika.</p> <p><i>III</i></p> <p><i>Za uslužni projekt:</i></p> <p>Vještine tog tima trebale bi osigurati učinkovitu i djelotvornu uslugu stvaranja i održavanja visokokvalitetnih genetski izmijenjenih linija, što će biti osnova za razvoj znanosti, i temeljne i primijenjene za specifična područja bolesti. Navedeno je da će se sve linije proizvoditi samo nakon pažljivog razmatranja specifičnih koristi (u okviru definiranog područja bolesti) do kojih će vjerojatno doći, a namjene proizvodnje definirat će se kako je navedeno u članku 5. i zatim se o njima može izvijestiti kako je opisano u Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569.</p>
(b)	procjena usklađenosti projekta sa zahtjevom za: i. zamjenu ii. smanjenje	Svi ti zahtjevi trebali bi se razmatrati zasebno. Upućuje li podnositelj zahtjeva na neke od baza podataka navedenih u (<i>drugom dijelu, Prilogu 1.</i>) ili na drugi način dokazuje da je svjestan načela zamjene, smanjenja i poboljšanja u tom području?	

	<p>iii. poboljšanje</p>	<p>i. Jesu li provedena pretraživanja kako bi se pronašle postojeće linije? Je li dokazano da je stvaranje nužno? Jesu li procjenitelji svjesni nekih relevantnih alternativnih metoda koje podnositelj zahtjeva nije odbacio kao neprimjerene? Smatraju li procjenitelji da je podnositelj zahtjeva iznio valjanu i potpunu argumentaciju o tome da su životinje potrebne?</p> <p>ii. Je li podnositelj zahtjeva primjereno objasnio kako će uskladiti ponudu i potražnju? Raspravlja li se o strategijama upravljanja kolonijom, što upućuje na to da će kontrola kvalitete biti pouzdana i da će se smanjiti višak životinja i/ili da će se one prema potrebi ponovno koristiti?</p> <p><u>Za znanstvene projekte:</u> daje li se u tekstu zahtjeva jamstvo da će se za postizanje pouzdane znanosti koristiti što manje životinja?</p> <p>III</p> <p><u>Za uslužne projekte:</u> daje li se u tekstu zahtjeva jamstvo da će se za usklađivanje ponude i potražnje koristiti što manje životinja?</p> <p>iii. Razmatranja iz točke 1.c trebaju potvrditi da će se koristiti najhumanije metode. Ovaj odjeljak trebao bi slijediti nakon toga i procjenitelji bi trebali moći odrediti predviđene učinke svih uključenih postupaka. Podnositelj zahtjeva trebao je objasniti postupke i njihove štetne učinke na životinje kako bi se mogla odrediti ukupna šteta koja im se nanosi.</p>	<p>i. <u>Za znanstveni projekt:</u> skupina intenzivno radi sa staničnim linijama i miješanim kulturama, ali s obzirom na to da je živčano tkivo složena interakcija staničnih tipova, trenutačno se čak ni višestaničnim strukturno usmjerenim <i>in vitro</i> tehnikama ne mogu dobiti sve sastavnice koje se ispituju.</p> <p><u>Za sve vrste projekata:</u> skupina je uputila na baze podataka u kojima će se pretraživati postojeće linije.</p> <p>ii. <u>Za sve vrste projekata:</u> opisane su strategije koje pokazuju da će se poduzeti sve primjerene mjere, kao što su pozadinski soj i upravljanje uzgojem kolonije, kako bi se što više smanjio broj koji se traži, a da se pritom osiguraju genetski integritet i smanjenje genskog pomaka u proizvedenim linijama.</p> <p><u>Za znanstveni projekt i uslužni projekt tipa B i C:</u> raspravlja se o krioprezervaciji. Iz podataka o proizvodnji (stvaranje) jasno je da su sustavi jednako učinkoviti kao kod drugih skupina ili u mnogim slučajevima i bolji. Postoje dokazi da su u proteklih pet godina prakse ažurirane i poboljšane kako bi se povećala učinkovitost i smanjio višak. Očekuje se da će se s time nastaviti u sljedećih pet godina.</p> <p>iii. <u>Za znanstveni projekt:</u> ako će se koristiti demijelinizirane genetski izmijenjene linije, očekuje se slabost, osim ako se ona kontrolira/spriječi predloženim ispitnim tvarima koje mijenjaju bolest. Za kontrolne životinje i ako ispitivani proizvod nije djelotvoran, opisuje se podjela na faze, a faze se usklađuju sa znanstvenim rezultatima potrebnima za svaki cilj. Usmrćuje se pri pojavi slabosti prednjih udova koja se očituje slabom snagom stiska, što se očekuje za 80 % životinja iz tih genetski izmijenjenih linija. Zadržat će se 20 % životinja dok se ne jave prvi sigurni znakovi</p>
--	-------------------------	--	--

		<p><u>Za sve projekte:</u> procjenitelj bi trebao odrediti hoće li se primijeniti dovoljno poboljšanja za uzgoj životinja sa štetnim fenotipima. Trebao bi uzeti u obzir vjerojatnost neočekivanih štetnih učinaka u novim genetski izmijenjenim linijama.</p> <p><u>Za uslužne projekte tipa B i C i relevantne znanstvene projekte:</u> kako bi odredio hoće li se na superovulaciju, vazektomiju ili transplantaciju embrija u primatelje primijeniti dovoljna poboljšanja, procjenitelj mora razumjeti relevantne udjele životinja koje će patiti te koliko jako i dugo, a pri tom treba uzeti u obzir poboljšanja i usmrćivanje koji će se primijeniti. Korisna može biti 23. stranica Radnog dokumenta o procjeni projekata i retroaktivnoj ocjeni.</p> <p>Te bi informacije trebalo upotrebljavati u sljedećem odjeljku, koji omogućuje određivanje klasifikacije težine.</p>	<p>slabosti stražnjih udova. Ni u jednoj fazi ne smije doći do vidljivog učinka na sposobnost hranjenja, pijenja ili njegovanja. Ako je prisutna slabost stražnjih udova, smanjit će se sposobnost kretanja. Kad se uoči slabost prednjih udova, praćenje će se obavljati četiri puta dnevno kako bi se osiguralo ograničeno trajanje slabosti stražnjih udova (najviše 18 sati).</p> <p>S obzirom na dostupne detaljne informacije o sigurnosti ispitivanih terapeutika, učinci primjene ispitivanih proizvoda trebali bi biti blagi i prolazni jer su posljedica samo načina primjene.</p> <p>I/ILI</p> <p><u>Za znanstvene i uslužne projekte:</u> genotip većine životinja za uzgoj ne bi trebao uključivati nikakve štete ako biosigurnosna prepreka opisana u zahtjevu ostane netaknuta, što je dosad bio slučaj. Neke bi životinje pokazale slabost ako bi se držale dulje od šest mjeseci, no životinje koje se koriste treba premjestiti u projekt/protokol x u dobi od šest tjedana i bit će normalne u vrijeme procjene u kavezu do tog trenutka. Životinje za uzgoj iz te linije zamijenit će se kad napune šest mjeseci ili prije toga.</p> <p>Za sve linije sa štetnim fenotipom treba sastavljati izvješća o dobrobiti genetski izmijenjenih životinja kako bi se osigurali dobro praćenje i komunikacija.</p> <p><u>Za relevantne znanstvene projekte i za uslužne projekte tipa B i C:</u></p> <p>budući da treba prakticirati praćenje na skali facijalnih grimasa uz odgovarajuću analgeziju kako odredi imenovani veterinar, može se očekivati dobra kontrola boli za sve životinje, pa bi učinci implantacije i vazektomije trebali biti mali, a do potpunog povratka uobičajenih ponašanja trebalo bi doći u roku od 24 sata.</p> <p>Superovulacija uzrokuje trenutnu bol kod svih životinja pri svakoj injekciji, ali učinak bi trebao biti minimalan.</p>
--	--	--	---

(c)	procjena i dodjela klasifikacije po težini postupaka	Podnositelj zahtjeva dužan je dati mišljenje o predviđenoj klasifikaciji svih postupaka po težini. Procjenitelji projekta trebaju provjeriti ili odrediti i preraspodijeliti težine za sve postupke (ili nizove postupaka) tako da budu u skladu s Prilogom VIII., pri čemu ih trebaju prilagoditi konkretnom slučaju o kojem je riječ u skladu s odjeljkom II. tog priloga i svim dodatnim smjernicama EU-a i/ili država članica. Ako je riječ o postupku provjere, trebalo bi potvrditi da su navedene težine točne.	<p>Mi [procjenitelji] slažemo se sa stajalištem podnositelja zahtjeva o težinama dodijeljenima većini postupaka kako je navedeno. Međutim, vodila se rasprava o vjerojatnim težinama nekih demijelinizirajućih linija, posebno onih kod kojih izmjena i intervencije induciraju napredak do teškog kliničkog stanja. Argumente iznesene o praćenju, podjeli na faze i primjeni ranog usmrćivanja po fazama smatramo uvjerljivima te, nakon razmatranja relevantnih informacija za usporedbu iz Priloga VIII., smjernica EU-a o primjerima težine i publikacije autora Zintsch¹⁵, smatramo da bi postupku x trebalo dodijeliti predviđenu težinu „umjerena”, umjesto „teška” kako je odredio podnositelj zahtjeva. Slažemo se da postupke y i z treba klasificirati kao teške. Osoblje (znanstveno i tehničko) ima dovoljno iskustva u prepoznavanju tih znakova i očekuje se da će otkrivanje, kako je opisano, biti dobro.</p> <p>III</p> <p>Za uslužni projekt tipa B:</p> <p>slažemo se sa stajalištem podnositelja zahtjeva o težinama dodijeljenima postupcima kako je navedeno. Linije koje se održavaju neće premašiti umjerenu težinu jer će se sve linije za koje se očekuje pojava teške kategorije predati korisniku šest tjedana prije očekivane pojave težih znakova ili ranije. Preuzima se obveza dostave procjena dobrobiti zajedno sa životinjama kako bi se omogućilo primjereno izvješćivanje krajnjeg korisnika. Ako dođe do neočekivanih štetnih učinaka, životinje će se humano usmrtiti.</p>
(d)	analiza štete i koristi projekta, radi procjene je li šteta	To treba odrediti nakon dovršetka SVIH drugih aspekata procjene jer treba uključiti sve informacije.	Za znanstveni projekt:

¹⁵ Zintsch, A., Noe, E., Reißmann, M., Ullmann, K., Krämer, S., Jerchow, B., Kluge, R., Gösele, C., Nickles, H., Puppe, A., Rüllicke, T., [Guidelines on severity assessment and classification of genetically altered mouse and rat lines](#) (2017).

<p>nanesena životinjama u smislu patnje, boli i stresa opravdana s obzirom na očekivani rezultat i uzimajući u obzir etička načela te može li u konačnici koristiti ljudima, životinjama ili okolišu</p>	<p>Procjenitelji bi trebali pogledati stranice 25 – 27 Radnog dokumenta o procjeni projekata i retroaktivnoj ocjeni. Trebali bi osigurati da su koristi povezane s područjem znanosti programa realistične i specifične za opisane postupke stvaranja, uzgoja i korištenja genetski izmijenjenih životinja (ako je navedeno).</p> <p>Ako je to relevantno, treba procijeniti prednosti centralizirane usluge na temelju stručnog znanja i prethodnih rezultata skupine u odnosu na druge skupine koje stvaraju, uzgajaju i održavaju linije i koje obično imaju manje vještina.</p> <p>Procjenitelj zahtjeva za projekt dužan je uzeti u obzir štete koje životinje mogu ili će vjerojatno iskusiti za vrijeme projekta.</p> <p>Treba razmotriti prethodno navedene štete, a pritom treba uzeti u obzir:</p> <ul style="list-style-type: none"> - vjerojatnost štetnih učinaka kod potomaka, osobito kod stvaranja - plan praćenja; protokole procjene dobrobiti, uzimajući u obzir predložena poboljšanja - stupanj težine i metodologiju za smanjenje težine - humano usmrćivanje i pokretače intervencija - učestalost/trajanje postupaka. <p>Kako bi procijenili vjerojatnu ukupnu štetu u projektu, procjenitelji bi trebali uzeti u obzir i ukupan broj životinja koji se traži te broj životinja za koje se predviđa da će pretrpjeti predviđenu težinu (najveću) i udjele životinja koje će patiti u manjem stupnju.</p>	<p>podnositeljica zahtjeva dosad nije imala odobrenje, ali je radila u okviru druge skupine koja je iskusna u tom području i s tim vrstama, što povećava vjerojatnost uspjeha. Prošla je kroz sve potrebno osposobljavanje kako je utvrđeno u okviru za obrazovanje i osposobljavanje. Tim je malen, ali smatramo da se opisani ciljevi mogu ostvariti. Pretraživanjem podnositeljice zahtjeva na tražilici PubMed otkrivene su određene publikacije u tom području, među ostalim u dvama vrlo utjecajnim časopisima.</p> <p>Opisani stupanj praćenja i korištenje tablica za ocjenjivanje trebali bi osigurati primjenu odgovarajućeg usmrćivanja kako bi se šteta ograničila na najveću štetu opisanu u ovom zahtjevu. Podnositeljica se obvezala osposobiti nove članove osoblja za podjelu bolesti na faze i izravno ih nadzirati dok ne steknu potrebne kompetencije.</p> <p>Predviđa se da će se u projektu koristiti do 5400 miševa i 10 000 zebrica, oko 400 za kirurške postupke, a ostatak za uzgoj. Očekuje se da će približno samo 20 % životinja pokazati umjerene znakove, a 4 % teške, pri čemu će velik udio životinja izgledati normalno do procjene u kavezu ili akvariju.</p> <p>Smatramo da su koristi proširenja znanja o učinku manipulacije puta p na proces demijelinizacije za znanstvenike u tom području, koje će se širiti publikacijama, prezentacijama i suradnjama, veće od predviđenih opisanih šteta.</p> <p>Za uslužni projekt tipa B:</p> <p>podnositelj zahtjeva ima dobru povijest djelotvorne i učinkovite proizvodnje linija koje traže klijenti. Klijenti koji se vraćaju svjedoče o toj kvaliteti, posebno ako se uzme u obzir da su dostupne jeftinije opcije. Pretraživanje na tražilici PubMed malog broja linija stvorenih i dostavljenih u proteklih pet godina pokazuje visokokvalitetne rezultate u prestižnim časopisima i oni su korisni znanstvenoj zajednici u različitim područjima. Skupina je sudjelovala u osposobljavanju znanstvenika u području</p>
--	---	--

		<p>Trebalo bi procijeniti vjerojatnost uspjeha tako da se uzmu u obzir dostupno znanje i vještine te vjerojatnost da će skupina na odgovarajući način primijeniti poboljšanja i praćenje. Važna je povijest publikacija i/ili prethodna proizvodnja genetski izmijenjenih životinja. Predlažu li se neke nove promjene kod kojih je moguća manja vjerojatnost uspjeha nego kod etabliranih metoda? U nekim slučajevima, unatoč tome što je vjerojatnost uspjeha manja, mogući učinak koristi može biti vrlo velik ako projekt uspije, npr. nove tehnike.</p>	<p>genetskog integriteta i načina uzgoja linija koji osigurava najpouzdanije znanstvene rezultate.</p> <p>Riječ je o iznimno kvalitetnom timu s dokazanom sposobnošću ostvarivanja rezultata kojima se genetski izmijenjene linije učinkovito i djelotvorno dostavljaju subjektima manje sposobnima dobiti tako kvalitetne linije. Stupanj praćenja, osposobljavanje i korištenje tablica za ocjenjivanje osiguravaju primjenu odgovarajućeg usmrćivanja kako bi se šteta ograničila na najveću štetu opisanu u ovom zahtjevu. Predviđa se da će se u projektu koristiti do 5400 miševa i 10 000 zebrica, oko 400 za kirurške postupke, a ostatak za uzgoj. Očekuje se da će približno samo 20 % životinja pokazati umjerene znakove, a 4 % teške, pri čemu će velik udio životinja izgledati normalno do procjene u kavezu ili akvariju.</p> <p>Za uslugu je dokazana sposobnost ostvarivanja rezultata kojima se genetski izmijenjene linije učinkovito i djelotvorno dostavljaju subjektima manje sposobnima dobiti tako kvalitetne linije. Stupanj praćenja, osposobljavanje i korištenje tablica za ocjenjivanje osiguravaju primjenu odgovarajućeg usmrćivanja kako bi se šteta ograničila na najveću štetu opisanu u ovom zahtjevu. Predviđa se da će se u projektu koristiti do 5400 miševa i 10 000 zebrica, oko 400 za kirurške postupke, a ostatak za uzgoj. Očekuje se da će približno samo 20 % životinja pokazati umjerene znakove, pri čemu će velik udio životinja izgledati normalno do procjene u kavezu ili akvariju.</p> <p>Smatramo da su koristi koje korištenje ovog iznimno kvalitetnog tima za pružanje usluge drugim znanstvenicima ima za znanost, smanjenje i dobrobit životinja veće od predviđenih opisanih šteta.</p>
(e)	procjena svih opravdanja iz sljedećih odredbi:		
	članak 6. – metode usmrćivanja	Vjerojatno neće biti potrebna nikakva posebna opravdanja/izuzeća koja se razlikuju od onih potrebnih za sve projekte.	
	članak 7. – ugrožene vrste	Vjerojatno neće biti relevantno za projekte s genetski izmijenjenim životinjama.	

	članak 8. – primati osim čovjeka	Neuobičajeno, ali ako se traži, potrebno je pažljivo opravdanje (vidjeti https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/research_and_innovation/eg/eg_ethics_of_genome_editing-opinion_publication.pdf).	
	članak 9. – životinje uzete iz prirodnog okoliša	Nije relevantno za te projekte.	
	članak 10. – za korištenje u postupcima treba uzgajati životinje iz Priloga I., osim ako je opravdano drukčije	Ako se traži, potrebno je pažljivo opravdanje.	
	članak 11. – lutalice i divlje životinje	Vjerojatno neće biti relevantno za projekte s genetski izmijenjenim životinjama.	
	članak 12. – postupke treba provoditi u objektu	Nema razloga zbog kojeg bi se ta vrsta projekta provodila izvan objekta. Postoje drugi propisi koji zahtijevaju ograničavanje genetski izmijenjenih životinja.	
	članak 14. – upotreba anestezije i analgezije	To se može posebno opisati u odjeljku o poboljšanjima i/ili kod štetnih učinaka protokola. Procjenitelji projekta trebali bi odrediti je li jasno da će se za kirurške postupke koji se provode pri stvaranju (primatelji embrija, vazektomija) dati anestezija i analgezija. Primjenjuje se i za genotipizaciju, osim ako je metoda trenutna te bi davanje anestezije/analgezije bilo traumatičnije.	Jasno su opisane vrste anestezije/analgezije, zajedno s planovima praćenja, uključujući skale facijalnih grimasa. Opisano je da su savjeti imenovanog veterinarara prihvaćeni na pojedinačnoj osnovi. Veterinar je pokazao dobro i najnovije znanje o suvremenoj praksi u tom području. To ulijeva povjerenje da će se na životinje primjenjivati optimalni planovi anestezije i analgezije. Anestezija se razmatrala za označivanje ušiju i utvrđeno je da je u ovom slučaju traumatičnija od samog postupka, u kojem iskusno osoblje uho zarezuje samo jednom primjenom metode bušenja. Slažemo se s tim stajalištem.

	<p>članak 16. – ponovno korištenje</p>	<p>Sve životinje koje se uzgajaju radi korištenja prenosit će se u skladu s protokolom za korištenje (stalno korištenje, a ne ponovno korištenje). Ponovno korištenje moguće je, na primjer ako se životinje genotipiziraju invazivnom metodom, ali se pokaže da je riječ o nemutiranom tipu, a te životinje nisu potrebne kao kontrole. Ako bi se te životinje mogle koristiti u drugu svrhu, smanjio bi se broj životinja. Ako se to zatraži, mora se jasno dokazati da će se poštovati uvjeti iz članka 16. (ograničenja težine i određivanje koje provodi veterinar).</p>	<p>Planira se ponovno korištenje nekih nemutiranih životinja, što je neuobičajeno. Iako se životinje genotipiziraju obrezivanjem ušiju, ova skupina koristi identifikacijske čipove za olakšavanje izvješćivanja o stalnom praćenju, pa se metoda uzorkovanja tkiva za genotipizaciju smatra korištenjem. Nemutirane životinje za koje je stvarna težina određena kao „blaga” i koje bi se trebale ponovno koristiti pregledat će imenovani veterinar, koji će dati savjet o tome je li opće zdravstveno stanje životinja potpuno obnovljeno. Traži se ponovno korištenje samo onih životinja koje ispunjavaju ta dva kriterija, i to u postupcima čija težina neće biti veća od umjerene. To je u skladu s pravnim zahtjevima i može se odobriti.</p>
	<p>članak 33. – treba ispuniti zahtjeve za skrb i smještaj</p>	<p>Uz usklađenost s Prilogom III. Direktivi za sve životinje, ako se predlaže pojedinačni smještaj miševa na kojima je obavljena vazektomija, to treba opisati i opravdati.</p> <p>Trebalo bi navesti da će se sve životinje koje su imunokompromitirane ili bi mogle biti imunokompromitirane držati u pojedinačno ventiliranim kavezima (najhumanija metoda) ako je to primjereno.</p> <p>Treba navesti sve posebne zahtjeve za uzgoj i/ili skrb koji su važni za određenu genetski izmijenjenu liniju koju treba odobriti.</p>	<p>Navedeno je da će se sve životinje držati u skladu sa standardima iz Priloga III., uz sljedeće iznimke: pojedinačni smještaj zrelih odraslih mužjaka na kojima je obavljena vazektomija opravdan je jer razdvajanje za vrijeme parenja možda neće omogućiti ponovno miješanje sestrinskih skupina u razdobljima u kojima životinje nisu u rasplodnim parovima. Slažemo se da će to možda biti potrebno za neke jedinke i da istraživačka skupina poduzima mjere koje može kako bi zadržala zajednički smještaj kad je to moguće.</p> <p>Očekuje se pojedinačni smještaj nekih životinja nakon što se odrede za ispitivanje. Uparivanje s nemutiranim životinjama pokušava se unutar kriterija koncepta pokusa, ali to još nije usavršeno pa se u tom kontekstu očekuje da je pojedinačni smještaj zasad opravdan. To neće trajati dulje od tri tjedna jer će se dotad postići znanstvene krajnje točke.</p> <p>Za homozigotne mladunce iz linije x zna se da su posebno mali, stoga do odbijanja neće doći prije 28. dana.</p>
(f)	<p>određivanje je li i kad je potrebno provesti retroaktivnu ocjenu projekta.</p>	<p>To obično neće biti potrebno za tu vrstu projekta. Međutim, ako je potreban protokol uzgoja s teškim postupcima, bit će potrebna retroaktivna ocjena.</p>	<p>Za znanstveni projekt: retroaktivna ocjena (RA) potrebna je zbog teškog postupka y.</p> <p>Za uslužni projekt: nije potrebna retroaktivna ocjena (RA). [Ako nisu predviđeni nikakvi teški postupci, što je obično slučaj.]</p>

Dodatak III.: Literatura

Literatura koja bi mogla biti korisna pri promišljanju aspekata ovog dokumenta.

- Benavides, F., Rüllicke, T., Prins, J.B., Bussell, J., Scavizzi, F., Cinelli, P., Herault, Y., Wedekind, D., [Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats: FELASA Working Group Report](#), Lab Anim 54(2): 135–148 (2020).
- Bonaparte, D., Cinelli, P., Douni, E., Héroult, Y., Maas, M., Pakarinen, P., Poutanen, M., Santos Lafuente, M., Scavizzi, F., Radna skupina Europske federacije za znanost o laboratorijskim životinjama, [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 Jul 47(3): 134–45 (2013).
- Bussell, J., Wells, S.E., [Talking welfare: the importance of a common language](#) ; Mamm Genome 26: 482–485 (2015).
- Cui, Y., Xu, J., Cheng, M., Liao, X. i Peng, S., [Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools](#), Interdiscip Sci 10: 455–465 (2018).
- Eggel, M. i Walker, R., [Replacement or Reduction of Gene-Edited Animals in Biomedical Research: A Comparative Ethics and Policy Analysis](#), N. C. Law Rev. 97: 1241 (2019).
- Europska komisija, [Izvešće za 2019. o statističkim podacima o korištenju životinja u znanstvene svrhe u državama članicama Europske unije u razdoblju 2015.–2017.](#) (2020).
- Europska komisija, [Radni dokument službi Komisije SWD\(2017\) 353 final/2](#) (2017).
- Europska komisija, [Izvešće o provedbi Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe u državama članicama Europske unije](#) (2020).
- Europska komisija, [Examples to illustrate the process of severity classification, day-to-day assessment and actual severity assessment](#) (2013).
- Europska komisija, [Radni dokument o genetski izmijenjenim životinjama](#) (2013).
- Europska komisija, [Provedbena odluka Komisije 2012/707/EU kako je izmijenjena Odlukom 2014/11/EU](#) (2012).
- Savezni institut za procjenu rizika, [Severity Assessment of genetically altered mice and rats - Version 2: Recommendation no. 002/2016 by the National Committee \(TierSchG\)](#) (2016).
- Savezni institut za procjenu rizika, [Severity assessment of genetically altered fish \(bony fish, teleost fish\): Recommendation No. 001/2015 by the National Committee \(TierSchG\)](#) (2015).
- Fentener van Vlissingen, J.M., Borrens, M., Girod, A., Lelovas, P., Morrison, F. i Torres, Y.S., [The reporting of clinical signs in laboratory animals, FELASA Working Group Report](#), Lab Anim 49: 267–283 (2015).
- Grune, B., Hensel, A., Schönfelder, G., [Rules for assessing pain in lab animals](#), Nature 512: 28 (2014).
- Hawkins, P., Morton, D.B., Burman, O., Dennison, N., Honess, P., Jennings, M., Lane, S., Middleton, V., Roughan, J.V., Wells, S., Westwood, K., Zajednička radna skupina Ujedinjene Kraljevine za poboljšanje BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW, [A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of](#)

- [laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement](#) ; Lab Anim 45(1): 1–13 (2011).
- Međunarodni odbor za standardiziranu genetsku nomenklaturu miševa i Odbor za nomenklaturu genoma štakora, [Guidelines for nomenclature of mouse and rat strains](#) (2018).
 - Međunarodno društvo za transgene tehnologije (ISTT), [Advanced Protocols for Animal Transgenesis](#), Springer-Verlag (2011).
 - Međunarodno društvo za transgene tehnologije (ISTT), [Statement of Principles - Achieving the 3Rs through responsible work with animals](#) (2018).
 - Naranjo, A., Pintado, B. y el grupo de trabajo SECAL, [Guía práctica para la implementación de la Directiva 2010/63 aplicada a los animales genéticamente alterados](#) ; *Animales de Laboratorio* (2017).
 - Nadležna nacionalna tijela za provedbu Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, [Radni dokument o okviru za ocjenjivanje težine postupaka](#) (2012).
 - Nizozemski nacionalni odbor za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NCad), [Genetically modified animals killed in stock](#) (2015).
 - Odjel za istraživanje životinja RSPCA-a, [Implementing the 3Rs](#) (2014).
 - Rose, M., Everitt, J., Hedrich, H., Schofield, J., Dennis, M., Scott, E., Griffin, G., Radna skupina ICLAS-a za usklađivanje, [ICLAS Working Group on Harmonization: international guidance concerning the production care and use of genetically-altered animals](#) ; Lab Anim Jul 47(3): 146–52 (2013).
 - Tröder, S., Ebert, L., Butt, L., Assenmacher, S., Schermer, B., Zevnik, B., [An optimized electroporation approach for efficient CRISPR/Cas9 genome editing in murine zygotes](#), Plos One (2018).
 - Ministarstvo unutarnjih poslova Ujedinjene Kraljevine, [Efficient Breeding of Genetically Altered Animals Assessment Framework](#) (2018).
 - Wells, D.J., Playle, L.C., Enser, W.E.J., Flecknell, P.A., Gardiner, M.A., Holland, J., Howard, B.R., Hubrecht, R., Humphreys, K.R., Jackson, I.J., Lane, N., Maconochie, M., Mason, G., Morton, R., Raymond, V., Robinson, V., Smith, Watt, [Assessing the welfare of genetically altered mice](#), Lab. Anim. 40: 111–114 (2006).
 - Zintzsch, A., Noe, E., Reißmann, M., Ullmann, K., Krämer, S., Jerchow, B., Kluge, R., Gösele, C., Nickles, H., Puppe, A., Rüllicke, T., [Guidelines on severity assessment and classification of genetically altered mouse and rat lines](#), Lab. Anim. 51: 573–582 (2017).
 - Zintzsch, A., Noe, E., Grimm, H., [Navigating Uncertainties: How to Assess Welfare and Harm in Genetically Altered Animals Responsibly-A Practical Guideline](#), Animals 10(5): 857 (2020).

Dodatak IV.: Pojmovnik

Pojmovi	Značenje
Dob pojave	Dob u kojoj se kod jedinke počinju javljati znakovi bolesti ili poremećaja.
Alel	Jedan od nekoliko različitih oblika gena koji se nalaze na određenom lokusu na kromosomu.
AWB	Tijelo za dobrobit životinja.
Pozadinski soj	Soj nemutiranog miša koji se koristi za stvaranje gameta/embrija za genetsku modifikaciju i za povratno križanje.
CA	Nadležno tijelo.
Komenzalni organizam	Organizam koji živi na ili u drugom organizmu i ostvaruje korist od domaćina, a ne nanosi mu štetu niti mu donosi korist.
Uvjetna linija	Genetski izmijenjena linija koja sadržava mutacije koje se mogu uvesti/aktivirati na prostorno ograničen način (npr. CRE-LOX tehnologijom; vidjeti u nastavku).
Konvencionalno	Ovisno o kontekstu. Kod smještaja životinja to bi bili kavezi s otvorom na vrhu s nižim razinama higijenske kontrole bolesti i zdravstvenog pregleda te bez npr. pojedinačno ventiliranih kaveza ili presađivanja.
Stvaranje nove genetski izmijenjene životinje	Razvoj nove genetski izmijenjene linije namjernom genetskom izmjenom (npr. genetsko umetanje/brisanje/uređivanje, kemijska mutageneza ili druga manipulacija gamete ili embrija ili križanje dvaju postojećih linija).
CRE-LOX	Tehnika molekularne biologije koja se koristi za izvršenje brisanja, umetanja, translokacije i inverzije na specifičnim mjestima u genomu. Omogućuje uređivanje specifično za tkivo i/ili vremenski specifično uređivanje, što nije moguće kod metode CRISPR-Cas9. Potrebno je križanje dviju genetski izmijenjenih linija kako bi se aktivirala genetska promjena.
CRISPR-Cas9	Tehnika molekularne biologije koja omogućuje uređivanje genoma specifično za mjesto u gotovo svim organizmima.
Krioprezervacija	Strategija za očuvanje uzoraka životinjskoga genetskog materijala (obično sperme, oocita ili embrija) na vrlo niskim temperaturama.

Dpf	Dana nakon oplodnje.
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina – tvar od koje se sastoje geni.
Biopsija distalnog članka	Uklanjanje jednog distalnog članka na jednom nožnom prstu, koje se koristi u ograničenim opravdanim okolnostima radi genotipizacije i identifikacije nezrelih životinja.
Distocija	„Težak ili otežan okot“: kad fetus za vrijeme okota ne izlazi iz zdjelice zbog fizičkih čimbenika iako se maternica steže.
Biopsija uha	Prikupljanje tkiva uha.
Zarezivanje/probijanje uha	Tehnika za identifikaciju/genotipizaciju glodavaca u kojoj se koristi posebno šilo kako bi se napravio mali zarez (od 0,5 do 2 mm) blizu ruba uha ili probušila rupica na sredini uha. Položaj oznake određuje identifikacijski broj prema unaprijed određenom planu (npr. plan koji su Hogan i dr. opisali u publikaciji <i>Manipulating the Mouse Embryo – A Laboratory Manual</i> (CSH Laboratory Press, 1994) omogućuje identifikaciju do 99 različitih životinja).
ES stanice	Embrionalne matične stanice (ES stanice ili ESC-i) su pluripotentne matične stanice koje se dobivaju iz unutarnje stanične mase blastociste, embrija u ranoj fazi prije implantacije.
EWG	Stručna radna skupina.
Uspostavljena linija	Novi soj ili liniju genetski izmijenjenih životinja smatra se „uspostavljenima“ kad je prijenos genetske izmjene stabilan, za što su potrebne najmanje dvije generacije, te je dovršena početna procjena dobrobiti i određeno radi li se o štetnoj ili neštetnoj liniji.
GAA	Genetski izmijenjene životinje – uključuju genetski modificirane životinje (transgene životinje, životinje s „izbijenim“ genom (<i>knock-out</i>) ili drukčije genetske izmjene) i životinje s mutacijom koja se javlja prirodno ili životinje s izazvanom mutacijom.
Gamete	Gamete su zrele reproduktivne stanice organizma (spermiji, jajne stanice).
Genetska karakterizacija	Otkrivanje i opisivanje prisutnosti određenih genetskih značajki (npr. alela) u organizmu.

Genetski integritet	Kvaliteta koja se pripisuje modelu populacije životinja kad je njegov genetski sastav vjeran izvornoj liniji. Održavanje genetskog integriteta modela istraživanja životinja ključno je za poboljšanje obnovljivosti između istraživačkih pokusa. Integritet mogu ugroziti genetska kontaminacija, genski pomak, nenamjerni odabir i pogrešno označivanje. Integritet se može osigurati genetskim praćenjem (metode uključuju biokemijske markere, fenotipsku analizu i, odnedavno, analizu DNK mikrosatelita i jednonukleotidnog polimorfizma (SNP)) te pravilnim upravljanjem kolonijom.
Panel za genetski integritet	Skup definiranih i jedinstvenih točaka u genomu potrebnog pozadinskog soja koje treba kontrolirati genetskim praćenjem kako bi se procijenio genetski integritet. Baze i sljedovi bit će ravnomjerno raspoređeni na autosomnim kromosomima.
Genotipizacija	Postupak određivanja razlika u genetskom sastavu (genotipu) jedinke ispitivanjem slijeda DNK-a jedinke upotrebom bioloških testova i usporedbom s referentnim slijedom. Genotipizacija nije metoda identifikacije.
GFP	Zeleni fluorescentni protein: često se koristi kao reporter izražavanja (npr. u određenom staničnom tipu jer se GFP može vizualizirati fluorescentnom mikroskopijom).
Štetna linija	Linija životinja sa štetnim fenotipom.
Štetan fenotip	Životinja ili linija koja će zbog genetske izmjene vjerojatno iskusiti bol, patnju, stres ili trajno oštećenje u jednakoj ili većoj mjeri od uboda igle izvedenog u skladu s dobrom veterinarskom praksom.
Heterozigot	Jedinka s različitim alelima na određenom lokusu.
Homozigot	Jedinka s istim alelom na odgovarajućem lokusu na homolognim kromosomima.
Hidrocefalus	Stanje kod kojeg dolazi do nakupljanja cerebrospinalne tekućine u mozgu . Obično uzrokuje povećani pritisak u lubanji .
Imunokompromitirana linija	Linija koja je genetski izmijenjena tako da ne može razviti uobičajeni imunosni odgovor na prisutnost stranih antigena.

Inducibilna linija	Linija koja je genetski izmijenjena tako da sadržava tihe genetske informacije koje znanstvenik može inducirati (tj. aktivirati) na vremenski ograničen način. Gen koji se proučava izražava se tek nakon aktivacije u kojoj se životinji daje specifičan agens za indukciju (npr. tetraciklin). Sve dok se gen ne izrazi na taj način, genetska manipulacija neće uzrokovati nikakve štetne učinke.
IP	Ovisno o kontekstu. Intelektualno vlasništvo ili intraperitonealno.
Izogeno	Za dvije se linije kaže da su izogene ako imaju potpuno isti genetski sastav. Uključuje i slučajeve s istim genetskim sastavom, ali s jednim različitim genom (onim koji se proučava).
IVC-i	Pojedinačno ventilirani kavezi.
IVF	<i>In vitro</i> oplodnja.
Naslijeđena linija	Starija linija životinja koja je proizvedena na način koji ne može zajamčiti monoklonalnost.
Studije koje obuhvaćaju cijeli životni vijek životinje	Znanstveno opažanje i opažanje dobrobiti koji se vrše nad genetski izmijenjenim i kontrolnim nemutiranim životinjama tijekom cijelog životnog vijeka predviđenog za kontrolne nemutirane životinje.
Linija	Slijed generacija jedinki koje prenose i nasljeđuju niz genetskih čimbenika koji određuju individualne značajke.
LEPR	Miševi homozigotni za spontanu mutaciju šećerne bolesti (<i>Leprdb</i>) pokazuju morbidnu pretilost, kroničnu hiperglikemiju, atrofiju beta-stanica gušterače i postaju hipoinzulinemični.
DČ	Država članica.
Mendelov omjer	Omjer pojave različitih fenotipa u svim križanjima koja uključuju osobine pod kontrolom jednoga genetskog markera na jednom lokusu (Mendelova osobina). Primjer: ako se pare dva roditelja (generacija P) koja se razlikuju po jednoj genetskoj osobini za koju su oboje homozigotni (nose isti alel na oba kromosoma), svi potomci prve generacije (F1) jednaki su ispitivanoj osobini prema genotipu (svi su heterozigotni) i fenotip pokazuje dominantnu značajku. Ako se križaju jedinke iz generacije F1, potomci u generaciji F2 razlikuju

	<p>se prema genotipu i fenotipu. U dominantno-recesivnom nasljeđivanju prosječno 25 % potomaka homozigotno je s dominantnom značajkom, 50 % je heterozigotno i pokazuje dominantnu značajku u fenotipu (genski nosioci), a 25 % homozigotno je s recesivnom značajkom pa stoga u fenotipu izražava recesivnu značajku. Omjer genotipa iznosi 1 : 2 : 1, a omjer fenotipa iznosi 3 : 1.</p>
Mikroftalmija	<p>Razvojni poremećaj u kojem je jedno ili su oba oka neuobičajeno mala.</p>
Mozaicizam	<p>Prisutnost dviju ili više staničnih linija s različitim genotipima kod iste jedinke. Mozaicizam se može javiti kod jedne jedinke kao posljedica postzigotske mutacije. Međutim, može se javiti i zbog uvođenja embrionalnih matičnih stanica u blastocistu, što dovodi do razvoja jedne jedinke koja se sastoji od stanica iz različitih linija.</p>
Višekratni generički projekt	<p>U Radnom dokumentu o određenim člancima Direktive 2010/63/EU o članku 40. navodi se da „neki razredi projekata uključuju niz standardnih postupaka koji se primjenjuju u određenu svrhu. Oni se ponekad nazivaju ‚višekratnim generičkim projektima‘. Postupci su obično ustaljeni i vjerojatne posljedice za životinje dobro se razumiju te se mogu umanjiti na odgovarajući način. Nije izgledno da će se za vrijeme procjene projekta javiti neka nova ili sporna pitanja. Kao i kod pojednostavnjenog administrativnog postupka iz članka 42., postupci koji se razmatraju u okviru višekratnih generičkih projekata moraju ispunjavati regulatorne zahtjeve ILLI biti potrebni za proizvodnju ILLI u dijagnostičke svrhe s pomoću etabliranih metoda”.</p>
Netaknute životinje	<p>Životinje koje se koriste u planu pokusa koje se prethodno nisu koristile.</p>
NCP	<p>Nacionalna kontaktna točka.</p>
NSET	<p>Nekirurški prijenos embrija. Tehnika koja podrazumijeva umetanje meke fleksibilne cijevi putem cerviksa miša radi implantacije embrija (blastociste) u maternicu.</p>

NTS	<p>Netehnički sažetak projekta: kako bi se osiguralo informiranje javnosti, objektivne informacije o projektima u kojima se koriste žive životinje moraju se objaviti na jeziku razumljivom laicima.</p> <p>(Direktiva 2010/63/EU, članak 43.)</p>
OB/OB ili pretili miš	Mutirani miš koji previše jede zbog mutacija u genu odgovornom za proizvodnju leptina, pa postaje iznimno pretio. Služi kao životinjski model šećerne bolesti 2. tipa.
Učinak izvan ciljnog područja, OTE	Učinak izvan ciljnog područja: nespecifične i nenamjerne genetske modifikacije, uključujući aktivnost gena u neciljnom tkivu ili poremećaj potpuno različitoga gena nasumičnim umetanjem genetskog materijala koji uzrokuje njegov poremećaj.
Fenotip	Uočljiva fizička svojstva organizma; uključuju izgled, razvoj i ponašanje organizma.
Penetracija fenotipa	Udio jedinki koje pokazuju određenu značajku (fenotip) povezanu s alelom.
Postupak	<p>U članku 3. Direktive 2010/63/EU „postupak” se definira kao „bilo koja invazivna ili neinvazivna upotreba životinja u pokusne ili druge znanstvene svrhe [...] koja životinji može prouzročiti određenu razinu boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja u jednakoj ili većoj mjeri od uboda igle izvedenog u skladu s dobrom veterinarskom praksom”.</p> <p>Stoga se prema Direktivi stvaranje i održavanje genetski izmijenjenih životinja smatra <i>znanstvenim „postupkom”</i> ako rođenje ili valjenje može životinjama prouzročiti bol, patnju, stres ili trajno oštećenje u jednakoj ili većoj mjeri od uboda igle izvedenog u skladu s dobrom veterinarskom praksom.</p>
Klasifikacija postupaka po težini	<p>U završnom izvješću (2009.) stručne radne skupine za klasifikaciju znanstvenih postupaka na životinjama po težini navodi se: „Svakom se postupku dodjeljuje kategorija težine. To će pomoći u analizi štete i koristi projekta.</p> <p>Težina postupka određuje se u odnosu na očekivani stupanj boli, patnje, stresa ili trajnog oštećenja koje će životinja iskusiti tijekom trajanja postupaka. Postupak se sastoji od</p>

	<p>kombinacije jedne ili više tehničkih radnji koje se provode na životinji, a mogu joj prouzročiti bol, patnju, stres ili trajno oštećenje. Pri određivanju kategorije težine uzimaju se u obzir svi zahvati ili postupanje sa životinjama u okviru definiranog postupka. Kategorija težine dodjeljuje se na temelju najtežih učinaka koje će pojedinačna životinja vjerojatno iskusiti nakon primjene svih primjerenih tehnika poboljšanja.”</p>
Presadivanje	<p>Uklanjanje slučajnih organizama, kao što su virusi, bakterije i paraziti, iz linija životinja za istraživanje, što obično uključuje superovulaciju zaražene populacije i reimplantaciju embrija u zamjenske majke koje imaju dobar zdravstveni status.</p>
Gen reporter	<p>Geni reporteri jesu geni koji omogućuju otkrivanje ili mjerenje izražavanja gena. Mogu se spojiti na regulatorne sekvence ili gene koji se proučavaju kako bi se dobila informacija o mjestu i razinama izražavanja. Geni reporteri uključuju gene koji kodiraju za fluorescentne proteine i enzime koji pretvaraju nevidljive supstrate u svjetleće ili obojene proizvode.</p>
Reporterska linija	<p>Linija životinja koja nosi gen reporter kako bi se omogućilo praćenje izražavanja gena <i>in vivo</i>.</p>
Retroaktivna ocjena	<p>Procjena sljedećih pitanja na kraju projekta koju obavlja nadležno tijelo:</p> <ul style="list-style-type: none"> (a) jesu li postignuti ciljevi projekta (b) šteta nanosena životinjama, uključujući broj i vrstu korištenih životinja, i težina postupaka te (c) svi elementi koji mogu doprinijeti daljnjoj provedbi zahtjeva zamjene, smanjenja i poboljšanja. <p>Vidjeti članak 39. Direktive 2010/63/EU.</p>
Uslužni projekt	<p>Projekt za pružanje usluge drugim znanstvenim korisnicima radi stvaranja i karakterizacije genetski izmijenjenih linija do njihove uspostave i/ili radi uzgoja i održavanja uspostavljenih štetnih genetski izmijenjenih linija za dostavu znanstvenim istraživačkim skupinama.</p>
Soj	<p>Sinonim za „liniju”.</p>
Superovulacija	<p>Postupak kojim se kod ženke izaziva da otpusti više jajašaca nego obično.</p>

Potisnuta linija	Linija u kojoj je jedan gen deaktiviran (za razliku od „inducirane linije“).
Biopsija repa / rezanje vrhova repova	Stariji postupak za genotipizaciju transgenskih životinja koji uključuje rezanje distalnog dijela repa životinje.
TALEN-i	Efektorske nukleaze nalik aktivatoru transkripcije jesu restriksijski enzimi koji se mogu sintetizirati da presijeku specifične sljedove DNK-a.
Tri R / 3R	Zamjena, smanjenje, poboljšanje.
Korištenje, ponovno korištenje i stalno korištenje	<p>– „Korištenje” životinje u projektu traje od početka primjene postupka (ili prvog postupka/tehnike u nizu) do završetka opažanja ili prikupljanja podataka (ili drugih proizvoda) u određenu znanstvenu svrhu (obično jedan pokus ili ispitivanje).</p> <p>– „Ponovno korištenje” izraz je koji označava naknadno korištenje životinje na kojoj je već obavljen postupak (ili niz postupaka/tehnika) u određenu znanstvenu svrhu. U članku 16. o ponovnom korištenju definira se kao korištenje kad je moguće koristiti i drugu životinju na kojoj prethodno nije izveden nijedan postupak. U tom članku definiraju se i okolnosti u kojima je moguće ponovno korištenje životinje.</p> <p>– Izraz „stalno korištenje” nije uključen u Direktivu, ali može se upotrebljavati za opis situacije u kojoj se jedno „korištenje” životinje odvija u više projekata ili u različitim postupcima u okviru istog projekta. Dodatno se objašnjava u dijelu B točki 2.2.3. Priloga III. Odluci (EU) 2020/569. Tim je rješenjem moguće pojednostavniti zahtjeve za projekt i izbjeći nepotrebno ponavljanje. Stalno korištenje često se javlja kod genetski izmijenjenih životinja iz postupka „uzgoja” u postupku „korištenja”.</p>
Vazektomija	Kirurški postupak za sterilizaciju životinje u kojem se sjemenska vrpca presijeca kako bi se spriječio prolazak sperme, ali se zadržavaju sjemenici.
Procjena dobrobiti	Sveobuhvatna procjena dobrobiti omogućuje utvrđivanje dvojbi u pogledu dobrobiti. U njoj će se utvrditi potreba za specijaliziranim uzgojem/skrbi i može pomoći u razlikovanju

	štetnih i neštetnih linija. Detaljnija definicija dostupna je u odjeljku 5. drugog dijela ovih smjernica. Pojednosti o načinu provedbe procjene dobrobiti dostupne su u trećem dijelu ovih smjernica.
Nemutirani tip / divlji tip (u istraživačkim dokumentima može se skratiti kao WT)	Životinja na kojoj nisu izvršene genetske izmjene.
ZFN-i	Nukleaze cinkovih prstiju su sintetički proteini koji se koriste za ciljanje gena.

KONTAKT S EU-OM

Osobno

U cijeloj Europskoj uniji postoje stotine informacijskih centara *Europe Direct*. Adresu najbližeg centra možete pronaći na: https://europa.eu/european-union/contact_hr

Telefonom ili e-poštom

Europe Direct je služba koja odgovara na vaša pitanja o Europskoj uniji. Možete im se obratiti:

- na besplatni telefonski broj: 00 800 6 7 8 9 10 11 (neki operateri naplaćuju te pozive),
- na broj: +32 22999696 ili
- e-poštom preko: https://europa.eu/european-union/contact_hr

TRAŽENJE INFORMACIJA O EU-U

Na internetu

Informacije o Europskoj uniji na svim službenim jezicima EU-a dostupne su na internetskim stranicama Europa: https://europa.eu/european-union/index_hr

Publikacije EU-a

Besplatne publikacije EU-a i publikacije EU-a koje se plaćaju možete preuzeti ili naručiti preko internetske stranice: <https://op.europa.eu/hr/publications>. Za više primjeraka besplatnih publikacija obratite se službi *Europe Direct* ili najbližemu informacijskom centru (vidjeti https://europa.eu/european-union/contact_hr).

Zakonodavstvo EU-a i povezani dokumenti

Za pristup pravnim informacijama iz EU-a, uključujući cjelokupno zakonodavstvo EU-a od 1952. na svim službenim jezičnim verzijama, posjetite internetske stranice EUR-Lexa: <http://eur-lex.europa.eu>

Otvoreni podatci iz EU-a

Portal otvorenih podataka EU-a (<http://data.europa.eu/euodp/hr>) omogućuje pristup podatkovnim zbirkama iz EU-a. Podatci se mogu besplatno preuzimati i ponovno uporabiti u komercijalne i nekomercijalne svrhe.



Ured za publikacije
Europske unije