

Orientierungshilfe

aus dem Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte

zur Belastungseinschätzung und Einstufung in Belastungsgrade von genetisch veränderten Maus- und Rattenlinien

**Stand: 01. Mai 2017
Version 1.1**

Inhaltsverzeichnis

Hintergründe zur Einstufung	4
I. Einstufung in einen Belastungsgrad	5
II. Erhebung und Beurteilung der Belastungen	7
Beispiele für die Einstufung von Symptomen genetisch veränderter Maus- und Rattenlinien in Belastungsgrade	14
1 Letalfaktoren	16
2 Verhaltensstörungen.....	17
3 Veränderungen der Haut und des Haarkleides.....	19
4 Veränderungen der Sinnesorgane.....	21
5 Erkrankungen des Nervensystems	22
6 Erkrankungen des Immunsystems	26
7 Kardiovaskuläre und hämatologische Erkrankungen	28
8 Atemwegserkrankungen	29
9 Erkrankungen des Verdauungssystems.....	29
10 Metabolische Erkrankungen.....	30
11 Reproduktionserkrankungen.....	31
12 Tumorerkrankungen.....	31
13 Erkrankungen der Niere	34
14 Veränderungen des Bewegungsapparats.....	35
Glossar	38
Autoren.....	41
Impressum.....	41
Referenzen	42
Anhang A - Empfehlung zur notwendigen Tierzahl für die Einschätzung einer erhöhten genetischen Belastung in Maus- und Rattenlinien	47

Genetische Veränderungen des Erbguts sind in der biomedizinischen Forschung ein wichtiges Werkzeug, um Genfunktionen, deren Auswirkungen im Organismus sowie Krankheitsmodelle zu untersuchen. Die phänotypischen Ausprägungen sind vielfältig und können je nach Art der genetischen Manipulation zu einer Beeinträchtigung des Wohlbefindens bei den Tieren führen. Mit der neuen Richtlinie 2010/63/EU¹ ist die Erhebung und Beurteilung von genetisch bedingten Belastungen in den Fokus gerückt. Im Sinne der 3R-Prinzipien (Replacement, Reduction, Refinement) müssen die Belastungen charakterisiert und abhängig vom Versuchszweck auf ein notwendiges Minimum reduziert werden.

Die vorliegende Orientierungshilfe spiegelt erste Erfahrungen mit der Belastungseinstufung in Schweregrade bei genetisch veränderten Linien wider und soll bei der Belastungseinstufung unterstützen. Linienspezifische Besonderheiten, unterschiedliche Ausprägungen der Symptome und einrichtungsspezifische Haltungsbedingungen müssen bei der Wahl des Belastungsgrades berücksichtigt werden. Deshalb können Einstufungen bestimmter Krankheitsbilder von dieser Empfehlung abweichen.

Fachliche Diskussionen zu Schweregradeinstufungen und die Einsendung weiterer Beispiele sind ausdrücklich erwünscht an info@ak-tierschutzbeauftragte.berlin. Die Orientierungshilfe soll auf dieser Grundlage kontinuierlich weiterentwickelt werden.

Hintergründe zur Einstufung

Als belastender Phänotyp sind im Sinne des deutschen Tierschutzrechts die Schmerzen, Leiden oder Schäden zu verstehen, die bei einem Tier als Konsequenz einer genetischen Veränderung vorhanden sind.

Der Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte bezieht sich bei der Belastungsbeurteilung auf artgemäße Bedürfnisse unter Laborbedingungen gezüchteter und gehaltener Maus – und Rattenlinien.

Abweichungen vom Normalverhalten und von Körpermerkmalen müssen unter tierexperimentellen Haltungsbedingungen beurteilt werden. Es wird die Konsequenz für das Ausüben der artgemäßen Verhaltensweisen beurteilt. Die Einstufung erfolgt unter versuchstierkundlichen und pathozentrischen Gesichtspunkten und berücksichtigt alle Faktoren, die zu Schmerzen oder Leiden führen. Schäden werden als belastend beurteilt, wenn diese Schmerzen oder Leiden verursachen. Die Beurteilung orientiert sich nach dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse und den Prinzipien der Five Freedoms².

Ist eine mögliche Belastung aufgrund der genetischen Veränderung zu erwarten, gilt der Stamm phänotypisch als belastet, bis die systematische Belastungsbeurteilung das Gegenteil ergibt.

Genetisch veränderte Tiere sind alle Tiere mit einer bekannten genetischen Veränderung gegenüber dem unveränderten Hintergrundstamm. Diese schließen Endonuklease-vermittelt erzeugte Linien, Linien mit stabiler Integration eines Transgens entweder über homologe Rekombination (in embryonalen Stammzellen) oder über zufällige Integration, durch physikochemische Behandlungen erzeugte Linien und Linien, die durch Identifizierung und Selektion einer spontanen Mutation entstanden sind, mit ein.

I. Einstufung in einen Belastungsgrad

Die Einschätzung des Belastungsgrades einer genetisch veränderten Linie ist oftmals eine Herausforderung, da es an objektiven Beurteilungskriterien für die unterschiedlichen phänotypischen Veränderungen fehlt. Die vorliegende Sammlung soll dazu dienen, die Einschätzung vergleichbar und fundiert zu gestalten, um ähnlichen Veränderungen einen adäquaten Belastungsgrad zuzuweisen. Die Einstufung basiert auf den Einschätzungen von Wissenschaftlern, Tierschutzbeauftragten und verfügbarer Literatur.

Kriterien für die Wahl des Belastungsgrades

Phänotyp ohne Belastung

Als Schwellenwert für Belastungen werden gemäß der Richtlinie 2010/63/EU Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden verstanden, die bei dem Tier in einem Ausmaß verursacht werden, die dem eines Kanüleneinstichs gemäß guter tierärztlicher Praxis gleichkommen oder darüber hinausgehen¹. Phänotypische Veränderungen müssen also eine Erheblichkeitsschwelle überschreiten, um für das Wohlbefinden des Tieres und auch tierschutzrechtlich relevant zu sein. Wird diese Schwelle nicht überschritten, kann eine Veränderung als Phänotyp ohne Belastung eingestuft werden.

Gering

Die Richtlinie 2010/63/EU stuft genetische Veränderungen, die bei den Tieren zu kurzzeitig geringen Schmerzen, Leiden oder Ängsten führen ohne wesentlich das Wohlergehen oder den Allgemeinzustand der Tiere zu beeinträchtigen, als „gering“ ein¹.

Mittel

Die Richtlinie 2010/63/EU stuft genetische Veränderungen, die bei den Tieren zu kurzzeitig mittelstarken Schmerzen, mittelschweren Leiden oder Ängsten oder lang anhaltend geringen Schmerzen führen und das Wohlergehen oder den Allgemeinzustand mittelschwer beeinträchtigen, als „mittel“ ein¹.

Der Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte betrachtet Tiere als mindestens mittelgradig belastet, wenn eine deutliche Abweichung des Allgemeinzustandes des Tieres klinisch beobachtet werden kann^{3,4}.

Eine Belastung muss mindestens als mittelgradig eingestuft werden, wenn

- die Lebensdauer verglichen mit dem genetischen Hintergrundstamm reduziert ist,
- eine normale Nahrungsaufnahme und die Fortbewegung beeinträchtigt sind,
- eine systemische Erkrankung auftritt, die zu einer erkennbaren Abweichung in einem Parameter, wie z.B. der Wachstumsrate, Körpergröße, Anatomie oder des Verhaltens, führt⁵.

Der Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte empfiehlt, im Einzelfall zu prüfen, ob bei den Tieren hierdurch Schmerzen oder Leiden auftreten.

Schwer

Die Richtlinie 2010/63/EU stuft genetische Veränderungen, die bei den Tieren zu starken Schmerzen, schweren Leiden oder Ängsten oder lang anhaltend mittelstarken Schmerzen, mittelschweren Leiden oder Ängsten führen und das Wohlergehen oder den Allgemeinzustand der Tiere schwer beeinträchtigen als „schwer“ ein¹.

Der Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte teilt diese Einschätzung.

Für die **Einstufung genetisch bedingter Belastungen** gelten prinzipiell dieselben Indikatoren wie für tierexperimentell induzierte Krankheitszustände^{1,6,5,7-9,4,10}. Auf einen gestörten Allgemeinzustand können hinweisen^{3,4,6,9}:

- Äußeres Erscheinungsbild, z.B. Fell (Piloerektion, stumpfes Fell, ungepflegt), Hautverfärbungen (blass, gelblich, gerötet), Augen (trüb, eingesunken, geschwollen, verklebt, Tränenfluss)
- Schmerz, z.B. anhand des Gesichtsausdrucks^{11,12}, der Körperhaltung (gekrümmter Rücken), Verhaltensänderungen, oder veränderte Reaktion auf Manipulation (erhöhte Aggressivität, Vokalisation), Automutilation
- Mobilität, z.B. bewegungsarm, auch von Gliedmaßen, Gewichtsverlagerungen, unkoordinierte Bewegungen, eingeschränkter Righting-Reflex
- Verhaltensänderungen, z.B. Isolation von Käfiggenossen, reduziertes Spontanverhalten,
- Signifikanter Körpergewichtsverlust
- Reduzierte Futter- und Wasseraufnahme

II. Erhebung und Beurteilung der Belastungen

Zur praktischen Umsetzung der Belastungsbeurteilung dienen als Orientierungshilfe die vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) zur Verfügung gestellten Formulare^{13,14}:

- Beurteilung neugeborener Wurf
- Beurteilung Wurf beim Absetzen

- Beurteilung adultes Einzeltier
- Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien

Die empfohlenen Zeitpunkte und Untersuchungsparameter sollten an die prospektive Belastungseinschätzung einer Linie angepasst werden. Mit der systematischen Untersuchung über alle Altersstufen soll der erwartete und unerwartete belastungsrelevante Phänotyp charakterisiert werden. Diese Basisuntersuchung ist die Grundlage für die Zuordnung zu einem Belastungsgrad. Weiterführende Informationen zu den Untersuchungskriterien und Formularvorlagen sind der Empfehlung des BfR¹⁴ zu entnehmen.

Informationen zum genetischen Hintergrund und den Haltungsbedingungen (insbesondere zum Hygienestatus) sollen dokumentiert werden, damit Unterschiede in der phänotypischen Ausprägung von genetisch veränderten Linien adäquat beurteilt werden können. Die Benennung der Linien soll nach den international gültigen Nomenklaturregeln erfolgen.

[Guidelines for Nomenclature of Mouse and Rat Strains¹⁵](#)

[Nomenclature Tutorial¹⁶](#)

[ILAR Laboratory Codes¹⁷](#)

Belastungsrelevante Charakteristika sollen in der „Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien“ zusammengefasst werden und die Tiere bei einer Abgabe zusammen mit Informationen zur genetischen Veränderung begleiten.

a. Welche Linien müssen nach den BfR-Empfehlungen systematisch über alle Altersstufen beurteilt werden, wenn eine Belastung erwartet wird?

- Neu generierte Linien und neue Kreuzungszuchten genetisch veränderter Linien
- Importierte genetisch veränderte Linien, die noch nicht systematisch beurteilt wurden. Es sind alle Informationen des letzten Züchters und Verwenders zu berücksichtigen.

- Neue Linien, die durch die gezielte Weiterzucht von Spontanmutationen entstehen.

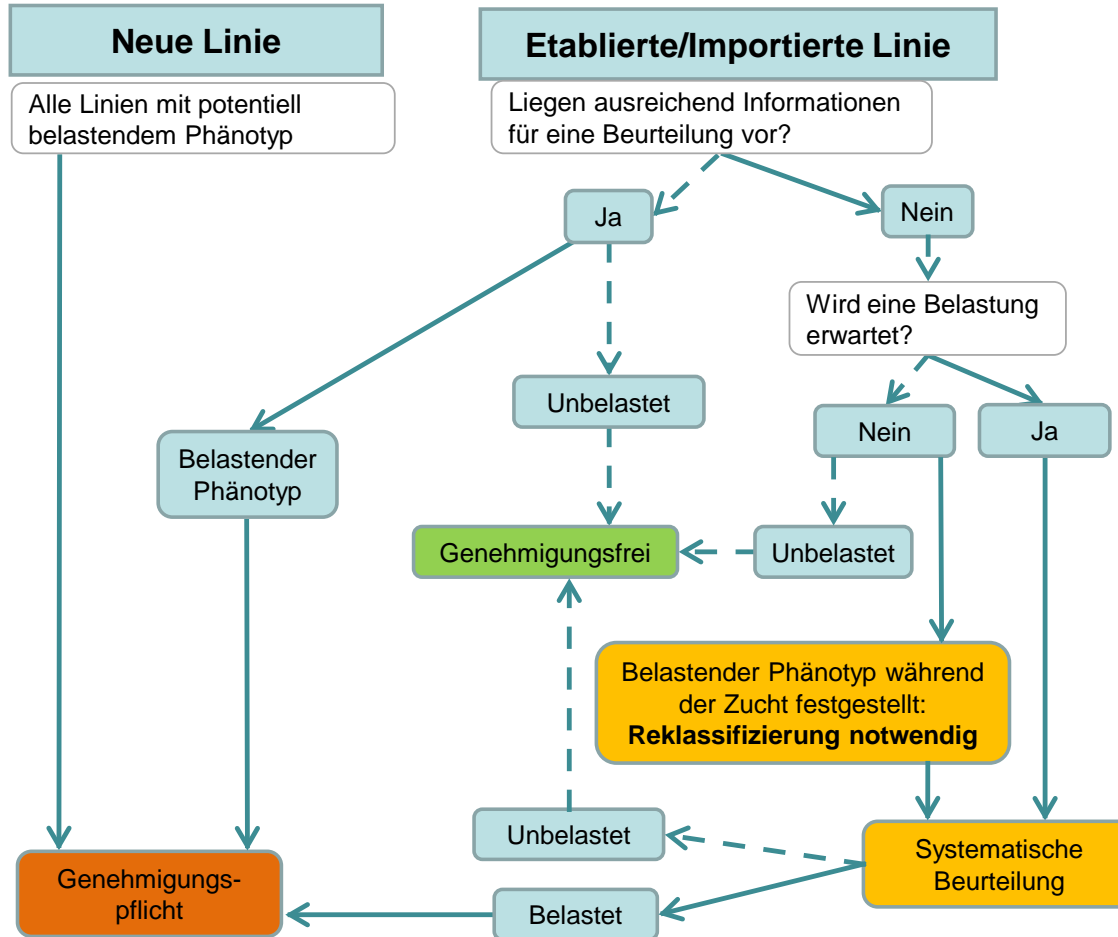
Der Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte empfiehlt eine Linie beim Wechsel des genetischen Hintergrundstammes erneut zu beurteilen.

b. Welche Linien müssen nach den BfR-Empfehlungen nicht systematisch beurteilt werden?

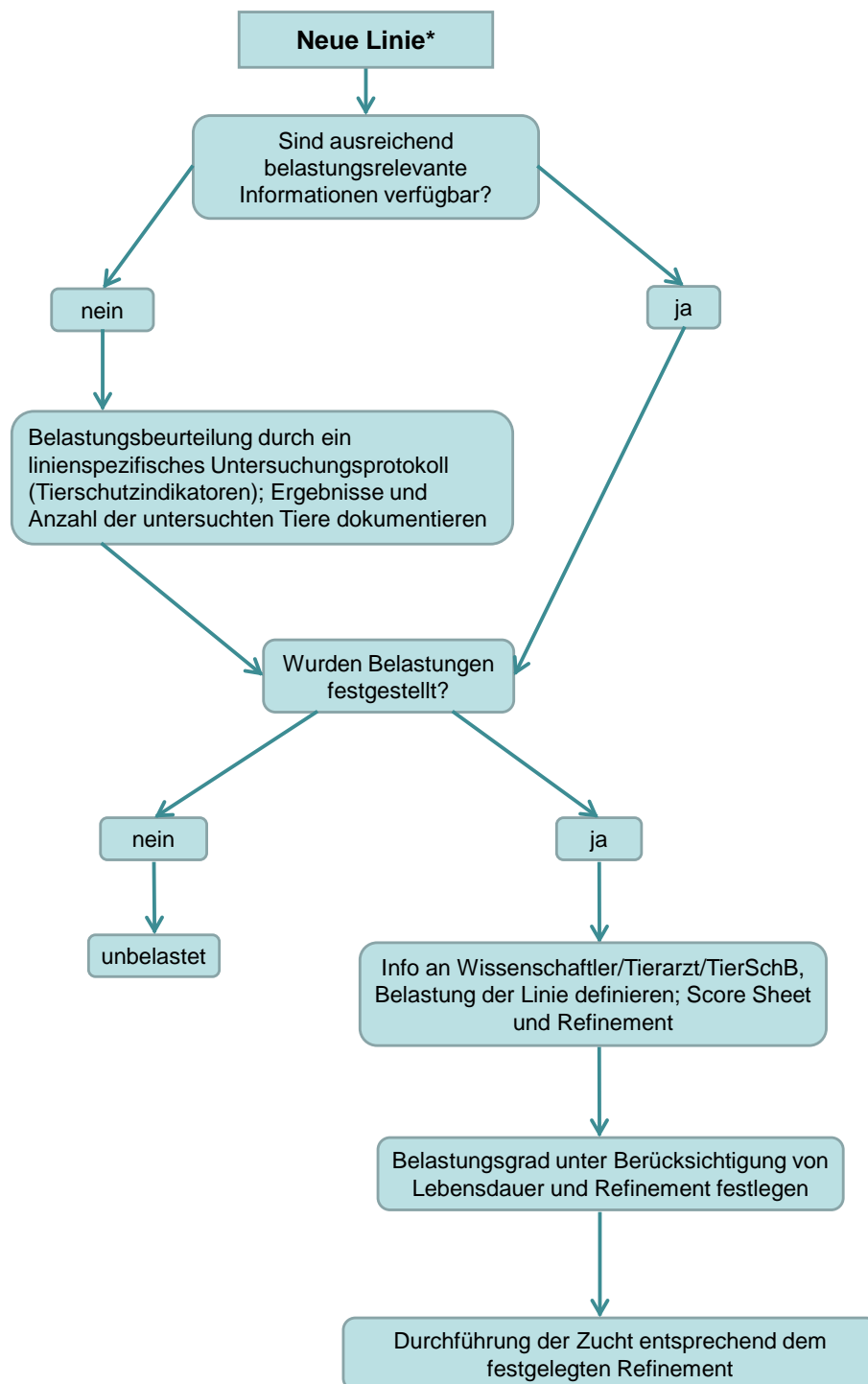
- Linien, bei denen die Gabe von Induktoren den veränderten Phänotyp auslöst (vor der Induktion durch z.B. Tamoxifen).
- Linien, bei denen die Art der genetischen Veränderung keine Belastung hervorruft (z. B. Cre/loxP-System vor Kreuzung der Cre mit LoxP (gefloxt) Maus oder Reporterlinie).
- Wildtyp-Linien mit oder ohne standardisierten Hintergrund oder rekombinante Inzuchtstämme

Eine Abschlussbeurteilung sollte für jede genetisch veränderte Linie in der Einrichtung vorliegen.

Gesetzliche Vorgaben zur Belastungsbeurteilung



Praktisches Vorgehen bei der Belastungsbeurteilung



* Gilt auch für importierte Linien.

Trifft eine neue Linie in einer Einrichtung ein, sollten linienspezifische Informationen bei der Übernahme der Tiere geprüft werden. Insbesondere sollte hinterfragt werden, woher diese Informationen stammen (z.B. aus Publikationen, Datenbanken oder systematischen Untersuchungen) und unter welchen Bedingungen sie erhoben wurden, um sie vor dem Hintergrund der lokalen Gegebenheiten zu bewerten.

c. Welche Tiere sollen für die Beurteilung genutzt werden?

- Tiere des gewünschten Genotyps über den gesamten Zucht- und Haltungszeitraum
- Keine zusätzliche Zucht oder längere Haltung als für den Versuchszweck geplant

Die Anzahl der zu beurteilenden Tiere pro Linie beträgt gegenwärtig mindestens 14 Tiere mit dem entsprechenden Genotyp (7 ♂, 7 ♀) aus unterschiedlichen Würfen umfassen^{18,14}.

Diese empfohlene Anzahl von 14 zu untersuchenden Tieren basiert jedoch auf keiner statistischen Analyse. Unter Berücksichtigung der zu erwartenden Allelfrequenzen, der wahrscheinlichen Penetranz und der Erbgänge wurde auf der Basis eines Fisher's Exact Conditional Testes für zwei Auftretswahrscheinlichkeiten die Tierzahl ermittelt, die für das sichere Erkennen einer erhöhten Belastung in der modifizierten Linie erforderlich ist (**Anhang A**). Dabei wurde deutlich, dass bereits mit der Untersuchung von 10 Tieren eine erhöht belastete Linie mit einer Power von über 80% ausgewiesen werden kann. Lediglich für Sonderfälle (extrem hohe Grundbelastung in der Ausgangslinie, Imprinting, nachgewiesen geringere Penetranz) kann eine höhere Anzahl zu untersuchender Tiere erforderlich werden.

Als Kontrollen dienen Tiere des entsprechenden Hintergrund- oder Zielstammes. Während der Etablierungsphase eignen sich besonders gut Wildtyp-Wurfgeschwister, wenn ein undefinierter genetischer Hintergrund genutzt wird und die Erstellung einer kongenen Linie noch nicht abgeschlossen ist.

d. Welche Rolle spielen Refinementmaßnahmen bei der Belastungsbewertung?

Sobald Belastungen festgestellt werden (auch bei Einzeltieren) muss über Maßnahmen zur Verringerung der Belastung entschieden werden. Die Entwicklung und Implementierung von linien- und versuchsspezifischen Refinementmaßnahmen sollte stets in Zusammenarbeit der verantwortlichen Wissenschaftler, Tierschutzbeauftragten und Tierpfleger erfolgen.

Bei Phänotypen mit progredienter Belastung sollten frühzeitig Refinementmaßnahmen implementiert und Endpunkte für die Haltung in der Zuchteinrichtung definiert werden. Sofern mit dem Ziel des Experiments vereinbar, sollten die Tiere vor dem Auftreten einer genetisch bedingten Belastung verwendet werden.

Grundsätzlich kann eine Refinementmaßnahme zur Verringerung des Belastungsgrades führen. Somit können Einstufungen von Linien anhand der angewandten Refinementmaßnahmen an unterschiedlichen Einrichtungen voneinander abweichen. Ein Refinement führt jedoch nicht dazu, dass eine Linie aus der Genehmigungspflicht entlassen wird.

Refinementmaßnahmen in der Zucht und Haltung

Scoring und Abbruchkriterien, z.B.

- intensive Überwachung mittels Score Sheets und Definition von Symptomen, bei deren Auftreten eine Handlung erfolgt
- definierte Handlungsanweisungen, die eine bestmögliche Belastungsminimierung durch frühestmöglichem Abbruch gewährleisten

Ernährung, z.B.

- Gabe von Agarpacks, Futterbrei, Glukose, Probiotika oder Vitaminen

Medikamentöse Versorgung, z.B. mit

- Antibiotika oder Analgetika

Haltungsumgebung, z.B.

- zusätzliches Nistmaterial bei hypothermen Tieren

Beispiele für die Einstufung von Symptomen genetisch veränderter Maus- und Rattenlinien in Belastungsgrade

- 1 Letalfaktoren
- 2 Verhaltensstörungen
- 3 Veränderungen der Haut und des Haarkleides
- 4 Veränderungen der Sinnesorgane
- 5 Erkrankungen des Nervensystems
- 6 Erkrankungen des Immunsystems
- 7 Kardiovaskuläre und hämatologische Erkrankungen
- 8 Atemwegserkrankungen
- 9 Erkrankungen des Verdauungssystems
- 10 Metabolische Erkrankungen
- 11 Reproduktionserkrankungen
- 12 Tumorerkrankungen
- 13 Erkrankungen der Niere
- 14 Veränderungen des Bewegungsapparats

Die vorliegende Sammlung wird regelmäßig durch den Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte um Beispiele ergänzt und aktualisiert. Es können jederzeit weitere Beispiele und Anregungen zu den Einstufungen an info@ak-tierschutzbeauftragte.berlin gesendet werden.

Hinweise zum Umgang mit der Tabelle:

Die vorliegende Tabelle dient der Beurteilung von Mäusen und Ratten.

Die Tabelle ist eine Empfehlung für die Einstufung von Symptomen in Belastungsgrade bei Einzeltieren. Für die Einstufung einer Linie ist die höchste Belastung maßgeblich. Die Belastung des Einzeltieres muss nicht zwangsläufig mit der Einstufung der gesamten Linie übereinstimmen. Verschiedene Genotypen und Altersstufen können unterschiedliche Belastungsgrade aufweisen.

Die Einschätzung der jeweiligen Belastungen sollte unter den Aspekten Zeit und Ausmaß erfolgen.

Beim Auftreten mehrerer Symptome aus verschiedenen Kategorien ist der Akkumulationseffekt zu beachten, der zu einer Erhöhung des Belastungsgrades führen kann.

Die Kategorie „Phänotyp ohne Belastung“ umfasst Phänotypen, die keine Beeinträchtigung des Wohlbefindens unter Haltungsbedingungen nach aktuellen versuchstierkundlichen Standards hervorrufen.

Grau hinterlegte Felder bedeuten, dass bisher kein entsprechendes Beispiel bekannt ist.

Die nachfolgende Einstufung von Symptomen und Erkrankungen bezieht sich auf die Belastung ohne Refinementmaßnahmen. Die Belastungen können und sollen wenn immer möglich durch ein entsprechendes Refinement reduziert werden.

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
-----	--------------------	-------------------------	-------------------	--------------------	-------------------	---

1 Letalfaktoren¹⁹

1.1	Allgemein		Perakutes Versterben oder bis 5 Tage nach der Geburt (P5) (aufgrund veringerteter Schmerzverarbeitung und Leidenswahrnehmung ²⁰⁻²²)	Letal bis 2 Wochen nach der Geburt (z.B. unterentwickelt, Leukopenie, Anämie, Mikroenzephalie)	Verendete Tiere mit unbekannter ¹ Todesursache ab 2 Wochen nach der Geburt	
1.2	Letale Syndrome			z.B. Morbus Gaucher bei vollständig ausgeprägtem Krankheitsbild: wachstumsretardiert, struppiges Fell mit trockenem Schwanz, späte Augenöffnung an P7, ab P14 ein-		

¹ wenn eine schwere Belastung vor dem Tod nicht ausgeschlossen werden kann⁶

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
				geschränkte Motorik Abmagerung, Lähmungen, Überstreckung des Nackens, Krämpfe bei Berührung, Versterben im Alter von 3 Wochen		

2 Verhaltensstörungen

2.1	Veränderung des Aktivitätsverhaltens					
2.1.1	Gesteigerte Aktivität z.B. circling, wire-gnawing, backflipping		Geringgradig gestörtes Allgemeinbefinden, Körpergewichtsverlust < 10%	Mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden, Körpergewichtsverlust < 20 %	Hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden, Körpergewichtsverlust > 20 %	
2.1.2	Verminderte Aktivität z.B. Autismus					
2.2	Veränderung des Sozialverhaltens					
2.2.1	Gestörtes maternales Verhalten ²³					
	Für die Jungtiere		Reduziertes Nestbauverhalten der Mutter; längere Zeit der Abwesenheit	Kein Nestbauverhalten, aber Jungtiere beisammen; Stress durch Vokalisation	Verstreute Jungtiere; Infantizides Verhalten der Mutter; Versterben durch	Zusatz eines erfahrenen Muttertieres oder Jungtiere in Ammenhaltung, Zu-

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
			<p>von den Jungtieren bei regelrechter Jungtierentwicklung; keine ausgeprägte Laktationshaltung über den Jungtieren (Crouching); Wenig Zeit im Nest, aber Belecken durch Mutter nach dem Milchsaugen</p>	<p>der Jungtiere aufgrund von Kältestress; verminderte Flüssigkeits- und Nährstoffzufuhr durch eingeschränkte mütterliche Fürsorge</p>	<p>Unterkühlung aufgrund fehlender mütterlicher Fürsorge</p>	<p>fütterung mit Muttermilch oder Milchersatz</p>
2.2.2	<p>Erhöhte Stressanfälligkeit, führt z.B. zu Angststörung, Aggressivität^{II}</p>			<p>Bei Gruppenhaltung: Körpergewichtsunterschiede ab 15%^{III} durch Verdrängung vom Futterplatz (Dominanzverhalten)</p>	<p>Physischer Schaden, z.B. Automutilation oder Verletzung von Käfiggenossen</p>	

^{II} Verhaltensänderungen können fließend ineinander übergehen.

^{III} Vergleich unter Tieren des desselben Genotyps

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
2.2.3	Barbering ²⁴		Fehlende Tasthaare ohne Störung des Allgemeinzustandes, keine Verhaltensänderung	Fehlende Tasthaare mit zusätzlich gestörtem Allgemeinzustand oder Verhaltensänderung, Einstufung je nach Ausprägung		Trennung von betroffenen Tieren

3 Veränderungen der Haut und des Haarkleides

3.1	Veränderungen des Haarkleides ^{25,26}	Tiere mit fehlendem Haarkleid unter thermoneutralen Haltungsbedingungen (Haltungstemperatur, Gruppenhaltung, environmental refinement)	Fehlendes Haarkleid (z.B. Nacktmaus) und Haltung unter subthermoneutralen Bedingungen mit Einstufung je nach Käfig-Innentemperatur und Dauer ²⁷⁻²⁹			Haltung bei erhöhter Umgebungstemperatur, vermehrtes Angebot an geeigneter Einstreu und Nistmaterial ³⁰ , energiereiches Futter
3.2	Pruritus		Wiederholtes, kurzzeitiges Kratzen, z.B. bei schuppiger Haut		Nicht verheilende Wunden, permanentes Kratzverhalten	
3.3	Entzündliche Hauterkrankungen					
3.3.1	Lupus erythematodes (siehe auch 6.1 und 13.1)		Entzündliche Hautveränderungen v.a. am oberen Rücken, Nacken und an den Ohren, z.B. Alopezie, Erythem bis hin zu tiefgreifenden Hautverletzungen ³¹ ,			

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
			Einstufung je nach Ausprägung			
3.3.2	Comèl-Netherton Syndrom				Erythrodermie, starker Juckreiz, Hautablösung, Wachstumsretardierung ³²	
3.4	Dystrophische Epidermolysis bullosa				Hochgradige generalisierte Hautveränderungen (Bläschenbildung), die bis zum Verlust von Gliedmaßen führen können, Schleimhautveränderungen mit Störung der Nahrungsaufnahme, Hyperalgesie ³³	

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
-----	--------------------	-------------------------	-------------------	--------------------	-------------------	---

4 Veränderungen der Sinnesorgane^{IV}

4.1	Augen					
4.1.1	Erhöhte Lichtempfindlichkeit ³⁴ , z.B. bei Albinismus	Albinotische Linien soweit Beleuchtung an erhöhte Lichtempfindlichkeit angepasst ³⁵	Erhöhte Lichtempfindlichkeit mit tränenden Augen, Einstufung je nach Ausprägung			Haltung in abgedunkelten Bereichen
4.1.2	Fehlen von exokrinen Drüsen			z.B. Fehlen der Meibom-Drüsen ³⁶ , Einstufung je nach Grad der Folgesymptomatik (Keratokonjunctivitis sicca)		
4.1.3	Mikrophthalmie, Anophthalmie	Blindheit ^V (z.B. verkleinerte oder fehlende Augen) ohne Einschränkung des Normalverhaltens				Haltung in konstanter Umgebung

^{IV} Das Fehlen von mehreren Sinnen führt zu einer Beeinträchtigung im Sinne einer Belastung und ist in einen entsprechenden Belastungsgrad einzustufen.

^V Unter der Voraussetzung, dass die Haltung in konstanter Umgebung stattfindet.

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
4.2	Störung des Gehörsinns	Taubheit ^v ohne Einschränkung des Normalverhaltens				
4.3	Störung des Geruchsinns		Verminderte Futtermittelaufnahme durch Einschränkung oder Verlust des Geruchsinns. Einstufung je nach Folgesymptomatik, v.a. Körpergewichtsverlust.			
4.4	Störung des Tastsinns		Fehlende Tasthaare ohne Störung des Allgemeinzustandes, keine Verhaltensänderung	Fehlende Tasthaare mit zusätzlich gestörtem Allgemeinzustand oder Verhaltensänderung, Einstufung je nach Ausprägung		

5 Erkrankungen des Nervensystems

5.1	Motorische Defizite - Allgemein	Verändertes Gangbild ohne motorische Einschränkungen	Geringe motorische Einschränkungen ohne Körpergewichtsverlust	motorische Einschränkungen ohne Lähmungen, mit Körpergewichtsverlust < 20 %	Lähmungen, die zur Beeinträchtigung der Futter- und Wasseraufnahme führen	Feuchtfutter am Käfigboden, erhöhte Energiezufuhr, z.B. Glukosegabe
-----	---------------------------------	--	---	---	---	---

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
5.2	Veränderte Schmerzempfindlichkeit	Hypalgesie			Hyperalgesie bei der das Tier kein Putzverhalten mehr ausübt und verminderte Aktivität zeigt, Vokalisation beim Handling	
5.3	Krämpfe		Fokale periodische Krämpfe ⁶	Generalisierte spontan auftretende und kurzzeitige Krämpfe, wenn nach dem Anfall höchstens kurzzeitig geringgradige Symptome auftreten und eine vollständige Erholung zwischen den Episoden erfolgt, z.B. induziert durch Handling; Epilepsie mit letalem Ausgang bei voll-	Anhaltender Tremor mit Gewichtsreduktion, Länger anhaltende generalisierte Krämpfe mit Wiedererwachen ^{6,5}	Ruhiger Umgang, keine lauten Geräusche

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
				ständigem Bewusstseinsverlust ^{VI,6}		
5.4	Morbus Huntington		Einstufung je nach Schwere der Symptomatik, z.B. Körpergewichtsverlust, Koordinationsverlust, unwillkürliche und unkontrollierbare Bewegungen bis hin zu Bewegungsarmut			
5.5	Rett-Syndrom ³⁸		Motorische- und Verhaltensdefizite und frühes Versterben (11. Lebenswoche bis 12. Lebensmonat), Einstufung je nach phänotypischer Ausprägung			

^{VI} Nicht weckbar durch Geräusche und taktile Reize, keine Reaktion auf Schmerzreize (Zwischenzehenreflex), Definition zum Bewusstseinsverlust siehe auch AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals, 2013³⁷

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
5.6	Spontane Autoimmune Encephalomyelitis mit aufsteigender Paralyse ^{39-42,4,43,44}	Keine klinischen Symptome	Schlaffer Schwanz, schwerfälliger Gang ohne Körpergewichtsverlust	Parese der Hintergliedmaße ohne Beteiligung der Vordergliedmaße für mehr als 24h, Körpergewichtsabnahme bis 20%	Paralyse der Hintergliedmaße und Parese/Paralyse der Vordergliedmaße, Umdrehreflex über 5 sec, Probleme beim Kot/Urinabsatz Körpergewichtsverlust >20%, keine selbstständige Futter- und Wasseraufnahme mehr möglich	Verlängerte Flaschenkappen, Feuchtfutter am Käfigboden, zusätzliches Nistmaterial aber kein Unterschlupf (Verletzungsgefahr), Glukosegabe, Flüssigkeitssubstitution, Kontrolle und ggf. manuelles Entleeren der Blase, häufigerer Käfigwechsel ^{39,42}
5.7	Alzheimer-Krankheit	Motorische und kognitive Abweichungen nur durch spezielle Tests feststellbar; keine Beeinträchtigung in der normalen Käfigumgebung			Paralyse der Gliedmaßen mit gekrümmter Körperhaltung, keine selbstständige Futter- und Wasseraufnahme mehr möglich ⁴⁵	
5.8	Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) Einstufung am Beispiel von transgenen Mäusen		Geringe motorische Einschränkungen ohne Körpergewichtsverlust	Muskelschwäche, Parese von einem oder von beiden Hinterbeinen für	Starre, spastische Paralyse oder minimale Gelenkbeweglichkeit, Bein	Feuchtfutter am Käfigboden, zusätzliches Nistmaterial, aber kein Unter-

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
	mit dem humanen SOD1 ^{G93A 46-49}			mehr als 24h, eingeschränktes Putzverhalten Körpergewichtsverlust bis 20%	wird nicht für die Fortbewegung genutzt, Umdrehreflex > 5 sec, Körpergewichtsverlust von > 20%, keine selbstständige Futter- und Wasseraufnahme mehr möglich	schlupf (Verletzungsgefahr) Glukosegabe, Kontrolle und ggf. manuelles Entleeren der Blase, häufigerer Käfigwechsel
5.9	Holoprosenzephalie ⁵⁰		Fehlbildung des Vorderhirns und des Gesichtsschädels (verkürzte Nase, abgeflachter Vorderkopf), Mikrophthalmie oder Anophthalmie, keine Einschränkung des Allgemeinbefindens oder des Normalverhaltens			

6 Erkrankungen des Immunsystems

6.1	Lupus erythematoses ⁵¹		Einstufung je nach Ausprägung der Hautveränderungen (3.3.1) und Glomerulonephritis (siehe 13.1)			regelmäßiges Monitoring auf Nierenin-
-----	-----------------------------------	--	---	--	--	---------------------------------------

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
						suffizienz mit Urin-Teststreifen
6.2	Rheumatoide Arthritis siehe 14.3.1					
6.3	Immundefizienz ^{VII}	Ohne infektiöse Erkrankung ^{VIII}	Einstufung je nach Schwere der Symptomatik, z.B. Durchfälle (siehe 9.4), Darmvorfälle (siehe 9.1), Pneumonie (siehe 8.2)			Spezielles Hygienemanagement (z.B. SPF-Haltung), Tötung bei Darmvorfall und Fokus auf Analregion bei Routinekontrolle, Antibiose
6.4	Vergrößerte/Verkleinerte lymphatische Organe	unverändertes Allgemeinbefinden, keine erhöhte oder verfrühte Morbidität oder Mortalität				

^{VII} Immundefiziente Mäuse, die Pathogene nicht kontrollieren können, z.B. Knock-Outs diverser Zytokine und Tiere mit Immundefizienzen, -dysfunktionen oder -einschränkungen

^{VIII} Kann nur durch entsprechendes Hygienemanagement erreicht werden.

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
-----	--------------------	-------------------------	-------------------	--------------------	-------------------	---

7 Kardiovaskuläre und hämatologische Erkrankungen

7.1	Kardiale Arrhythmien, z.B. asymptotische kardiale Kanalopathie mit strukturell normalem Herz ⁵²		Kurzzeitige Arrhythmie mit perakutem Herztod			
7.2	Blutgerinnung	Gerinnungsstörung je nach Lokalisation, Ausprägung und Folgesymptomatik				
7.3	Bluthochdruck am Beispiel Spontan Hypertensiver Ratten (SHR) ^{53,54}	Leichte Erhöhung bis 150 mmHg systolischer Blutdruck	Hypertonie bis 160 mmHg ^{IX} systolischer Blutdruck ohne Störung des Allgemeinbefindens und ohne Schlaganfälle	Kurzzeitige Hypertonie > 180 mmHg systolischer Blutdruck mit gestörtem Allgemeinbefinden und spontanen Schlaganfällen	Progressive Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit Versterben aufgrund eines Hypertonie bedingten Endorganschadens	Für jede Linie sollten retrospektiv Werte für den Blutdruck festgelegt werden, die belastungsrelevant sind

^{IX} Beginnende Endorganschäden

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
7.4	Dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathie		Nach normaler Aktivität im Käfig vorübergehend kurzzeitig verstärkte Atmung, keine permanente Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens	Kardiale Dekompensation mit permanenter Atemnot und Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, Einstufung je nach Ausprägung		

8 Atemwegserkrankungen

8.1	Asthma ⁵⁵		Je nach Atemwegssymptomatik und Folgeerscheinungen wie zum Beispiel Einschränkung der Aktivität			
8.2	Pneumonie aufgrund von Immundefizienz			Wachstumsretardiert, keine Atemnot, Körpergewichtsverlust < 20%	Permanente Atemnot mit Versterben, Körpergewichtsverlust > 20%	Antibiose

9 Erkrankungen des Verdauungssystems

9.1	Rektumprolaps		< 5 mm, feucht, keine Nekrosen, nicht blutig		> 5 mm, permanent	
9.2	Hyperplasie des Darms (in Durchmesser und		Vergrößertes Abdomen ohne Beein-	Vergrößerter Darm mit Beeinträchtigung der Organfunktion und umliegender Organe,		

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
	Länge)		trächtigung der Organfunktionen	Einstufung je nach Symptomatik		
9.3	Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse			Pankreatitis ⁵⁶ : Einstufung je nach Symptomatik		Kontrolle der Serumwerte zur Erkennung der beginnenden Pankreatitis
9.4	Entzündliche Darmerkrankungen; Colitis ⁵⁷		Weicher Kot ohne beeinträchtigtes Allgemeinbefinden, Körpergewichtsverlust <10%, Haarkleid sauber	Breiiger Kot, Körpergewichtsverlust 10-20%, reduzierte Aktivität, zeitweise gekrümmter Rücken	Anhaltend flüssiger Kot mit Spuren am After, Blutbeimengungen, Körpergewichtsverlust > 20%, permanente Anzeichen für abdominalen Schmerz (Zehenspitzenengang, gekrümmter Rücken)	regelmäßiges Monitoring auf Dehydratation, z.B. Hautfaltentest, häufigerer Käfigwechsel, Probiotika

10 Metabolische Erkrankungen

10.1	Hyperglykämie		Polydipsie, Polyurie ohne beeinträchtigtes Allgemeinbefinden	Polydipsie, mäßige Polyurie, Körpergewichtsverlust < 20%	Unstillbare Polydipsie, hochgradige Polyurie, Körpergewichtsverlust > 20 %	häufigerer Käfigwechsel, ggf. zwei Wasserflaschen bei Gruppenhaltung
------	---------------	--	--	--	--	--

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
10.2	Hypoglykämie (z.B. übermäßige Insulinproduktion durch Beta-Zell-Hyperplasie)				Reduzierte Aktivität als Folge der Hypoglykämie	10% Glukose im Trinkwasser, regelmäßige Kontrolle des Blutzuckers
10.3	Fettleibigkeit ⁵⁸	Zucht auf Übergewicht ohne Beeinträchtigung des Normalverhaltens oder des Allgemeinbefindens	Nachweis von Komponenten des metabolischen Syndroms (Fettleibigkeit, gestörter Fettstoffwechsel, erhöhte Blutglukose, Bluthochdruck), Einstufung je nach Störung des Allgemeinbefindens			Diätfutter, Futter am Käfigboden, weiche Einstreu bei Einschränkungen der Fortbewegung, Überwachung der Genitalgesundheit, häufigerer Käfigwechsel, Ratte: normalgewichtiges „Putzertier“

11 Reproduktionserkrankungen

11.1	Fruchtbarkeitsstörung	Sterilität				
------	-----------------------	------------	--	--	--	--

12 Tumorerkrankungen

12.1	Allgemein		Ohne Körpergewichtsverlust und ohne Störung des	Tumore, bei denen Tiere nach dem Feststellen des Tu-	Tumorerkrankungen, bei denen die Tiere über die konventio-	Anwendung des Body condition score ^{60,61} , regelmä-
------	-----------	--	---	--	--	--

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
			Allgemeinbefindens	mors weiterleben, aber innerhalb der konventionellen humanen Endpunkte getötet werden ^{5,59}	nellen humanen Endpunkte hinaus leben, Kriterien sind z.B. Body condition score=1 (Kachexie), Tumordurchmesser, das Auftreten von Anämie oder Aszites, Beeinträchtigungen durch das Tumorwachstum, Nekrose oder Tumorzulzeration ⁵⁹ ; fortschreitende tödliche Krankheit, die mit lang andauerndem mittelstarkem Schmerz, mittelschweren Ängsten oder Leiden einhergeht. Beispielsweise Kachexie verursachende Tumore, invasive Knochentumore, metastasierende Tumore und	ßiges Palpieren, Überwachung von Organfunktionen durch Blut- oder Urinuntersuchung, Monitoring durch bildgebende Verfahren

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
					Tumore, die bis zur Geschwürbildung belassen werden und die Tiere daran versterben ⁵ .	
12.2	Äußerlich sichtbare oder palpierbare Tumore (benigne, maligne): Schweregrad von Wachstum, Größe und Lokalisation abhängig		Palpierbare Tumoren ohne signifikanten Körpergewichtsverlust (< 10%), ohne Störung des Allgemeinbefindens und ohne Funktionseinschränkungen ^{59,62}		Ulzerierende Tumore	
12.3	Tumore der inneren Organe (benigne, maligne)		Einstufung je nach Lokalisation, Tumorgröße oder Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens			z.B. Monitoring durch bildgebende Verfahren, Kontrolle des Kot- und Urinab-satzes
12.4	Maligne Lymphome und Leukämien			Manifeste klinische Symptome der Tumorerkrankung mit Störung des Allgemeinbefindens, bei denen Tiere nach		Palpieren von Lymphknoten und Milz, Bauchumfang monitoren, regelmäßige Blutuntersuchung ⁶³

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
				dem Feststellen der Erkrankung weiterleben, aber innerhalb der konventionellen humanen Endpunkte getötet werden ⁵⁹		

13 Erkrankungen der Niere

13.1	Niereninsuffizienz (z.B. durch Glomerulonephritis ⁶⁴ , Hydronephrose, Nierenfibrose),		Polydipsie, geringgradige Polyurie ohne Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes	Polydipsie, mittelgradige Polyurie mit gestörtem Allgemeinzustand, ohne Ödeme und Proteinurie	Ödeme, Proteinurie und/oder > 20% Körpergewichtsverlust, Polydipsie, hochgradige Polyurie, Aszites, mit gestörtem Allgemeinzustand	regelmäßige Urinuntersuchung, angepasster Käfigwechsel
------	--	--	---	---	--	--

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
-----	--------------------	-------------------------	-------------------	--------------------	-------------------	---

14 Veränderungen des Bewegungsapparats

14.1	Muskelerkrankungen					
14.1.1	Parese		Von max. einem Körperteil bis zu 24h	Von mehr als einem Körperteil > 24h	Von mehr als einem Körperteil > 24h mit Einschränkung der Futter und Wasseraufnahme	Feuchtfutter am Käfigboden, Agarpads, zusätzliches Nestbaumaterial; evtl. Rückzugsmöglichkeit entfernen (Verletzungsgefahr), ggf. subkutane Glukosegabe
14.1.2	Paralyse				Paralyse der Hintergliedmaße und/oder Vordergliedmaße ungeachtet der Dauer	
14.1.3	Erhöhter Muskelansatz	Zucht auf erhöhten Muskelansatz ohne Einschränkung der Fortbewegung				
14.1.4	Duchenne Muskeldystrophie ⁶⁵⁻⁶⁷			Bewegungsarmut ab 3-4 Monaten, später Adipositas ab 12 Monaten		

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
14.2	Knochenerkrankungen					
14.2.1	verkürzte Gliedmaßen	verkürzte Gliedmaßen ohne Einschränkung der Mobilität			Erheblich eingeschränkte Mobilität, Keine selbstständige Futter- und Wasseraufnahme möglich	Futter am Käfigboden, verlängerte Flaschenkappen CAVE Folgeerkrankungen
14.2.2	Polydaktylie	Ohne Einschränkung der Mobilität z.B. Klettern				
14.2.3	Deformation von Knochen					
14.2.3.1	Brachycephalus	Brachycephalus ohne Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens oder des Normalverhaltens	Einstufung je nach Schwere der Einschränkung der Futteraufnahme oder der Atmung			
14.2.3.2	Deformation des Brustkorbs				progressive Atembeschwerden bis zum Erstickten aufgrund von Brustkorbdeformationen	

Nr.	Symptom/Erkrankung	Phänotyp ohne Belastung	geringe Belastung	mittlere Belastung	schwere Belastung	Monitoring, Refinement, besondere Haltungsanforderungen
14.2.3.3	Hydrocephalus			Wachstumsretardierung	Orientierungslosigkeit, stark eingeschränkte Futter- und Wasseraufnahme	
14.2.4	Zahnfehlstellungen	Wenn Futteraufnahme ohne Einschränkung möglich		Zahnfehlstellung, die zu Einschränkungen der normalen Futteraufnahme führt, Einstufung je nach Ausprägung des Körpergewichtsverlusts		Zähne kürzen, Fütterung von aufgeweichtem Futter
14.2.5	Zahntwicklungsstörungen (fehlende Zähne)				Keine Aufnahme von Futterpellets möglich	Fütterung von aufgeweichtem Futter
14.2.6	Osteoporose, Osteopetrose	Geringgradige Ausprägungen die mittels Bildgebung sichtbar wird, aber symptomfrei sind			Frakturen als Folge	
14.3	Gelenkserkrankungen					
14.3.1	Rheumatoide Arthritis ^{68,69}	Keine Anzeichen für Schwellungen und Erythem, Mobilität nicht beeinträchtigt			Spontane Polyarthritiden aller vier Gliedmaßen, Schwellungen, Erythem	Weiche Einstreu, zusätzliches Nistmaterial ⁷⁰

Glossar

abdominal	Den Bauchraum betreffend
Anämie	Blutarmut
Automutilation	Selbstverletzendes Verhalten
Back-flipping	Stereotypie bei der das Tier wiederholt sprunghafte Bewegungen nach hinten ausführt
Barbering	Stereotypie bei der systematisch Fell und/oder Tastaare herausgezogen werden. Betrifft Individuum selbst oder Käfiggenossen.
Brachycephalus	Kurzer Schädel durch gestörtes Längenwachstum, hat oftmals gestörte Funktion der oberen Atemwege zur Folge.
Circling	Stereotypie bei der das Tier im Kreis läuft.
Dehydratation	Austrocknung
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
Dysferlinopathie	Dysferlin-defiziente Muskeldystrophie
Dystokie	Gestörter Geburtsverlauf
Dystrophische Epidermolysis bullosa	Erblich bedingte Hautkrankheit
Erythem	Abgegrenzte Hautrötung

Erythrodermie	Rötung der Haut am gesamten Körper
Five Freedoms	umfasst Aspekte der Tiergesundheit und die Ausführbarkeit von natürlichen Verhaltensweisen <ul style="list-style-type: none"> - Freiheit von Hunger und Durst - Freiheit von haltungsbedingten Beschwerden - Freiheit von Schmerz, Verletzungen und Krankheiten - Freiheit von Angst und Stress - Freiheit zum Ausleben normaler Verhaltensmuster
Fokal	Örtlich begrenzt
Glomerulonephritis	Beidseitige Entzündung der Nieren, bei der die Nierenkörperchen (Glomerula) zuerst betroffen sind.
Holoprosencephalie	Fehlbildung des Vorderhirns und des Gesichtsschädels
Hydrocephalus	Flüssigkeitsansammlung („Wasserkopf“)
Infantizid	Töten von Nachkommen der eigenen Art
Katarrh	Entzündung der Schleimhäute
Leukopenie	verminderte Anzahl von Leukozyten
Mikroenzephalie	kleiner Schädel, einhergehend mit verkleinertem Gehirn.
Osteopetrose	gestörter Knochenabbau mit Folge einer mechanischen Instabilität des Knochengewebes.
Osteoporose	vermehrter Knochenabbau

Pankreatitis	Entzündung der Bauchspeicheldrüse
Parese	unvollständige Lähmung
Paralyse	vollständige Lähmung
Pathozentrisch	Vorausgesetzt wird Leidensfähigkeit von Tieren. Das Tier als Mitgeschöpf ist in seinem Wohlbefinden zu schützen, was ausschließt, dass ihm ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zugefügt werden (§ 1 Tierschutzgesetz)
Perakut	plötzlich auftretend
Pilorektion	Aufstellen der Haare
Pneumonie	Lungenentzündung
Polydipsie	vermehrtes Trinkverhalten als Folge einer Erkrankung
Polyurie	vermehrter Harnabsatz als Folge einer Polydipsie. Nicht Inkontinenz!
Righting-Reflex	Das Tier wird auf die Seite oder den Rücken gedreht und die Zeit erfasst wie lange es braucht, um sich wieder aufzurichten. Es ist ein einfacher Test, um motorische Defizite festzustellen, z.B. bei Muskelschwäche oder einem schlechten Allgemeinzustand.
Thrombembolie	Einschwemmen eines Blutgerinnsels
Wachstumsretardierung	Verzögertes Wachstum
Wire-gnawing	Stereotypie bei der am Käfiggitter genagt wird.

Autoren

Anne Zintzsch, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in der Helmholtz-Gemeinschaft, Berlin-Buch

Dr. Elena Noe, Charité-Universitätsmedizin, Berlin

Dr. Monika Reißmann, Humboldt-Universität zu Berlin

Dr. Kristina Ullmann, Charité-Universitätsmedizin, Berlin

Dr. Stephanie Krämer, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke und Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in der Helmholtz-Gemeinschaft, Berlin-Buch

Dr. Boris Jerchow, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Dr. Reinhart Kluge, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke

Dr. Claudia Gösele, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in der Helmholtz-Gemeinschaft, Berlin-Buch

Dr. Hannah Nickles, Charité-Universitätsmedizin, Berlin

Astrid Puppe, Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, Berlin

Impressum

Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte

c/o.: Dr. Boris Jerchow

E-Mail: info@ak-tierschutzbeauftragte.berlin

Referenzen

1. Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union. RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.
2. FAWC. Second Report on Priorities for Research and Development in Farm Animal Welfare; Department of Environment, Food and Rural Affairs, Farm Animal Welfare Council (FAWC), London, 1993.
3. Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte e.V. Orientierungshilfe des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter zur Einstufung in Belastungsgrade (Tab. 1.6.7) für genehmigungspflichtige Tierversuche: Date: 21. September 2010.
4. European Commission Expert Working Group. Examples to illustrate the process of severity classification, day-to-day assessment and actual severity assessment, 11 January 2013.
5. Home Office. *Severity classification of genetically altered animals under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986*, https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/276015/AdviceSeverityAssessmentGA.pdf (accessed 22 June 2014).
6. Home Office. *Advisory notes on recording and reporting the actual severity of regulated procedures*, https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/276014/NotesActualSeverityReporting.pdf (accessed 22 June 2014).
7. Bundesamt für Veterinärwesen (BVET). Retrospektive Einteilung von Tierversuchen nach Schweregraden (Belastungskategorien): Information Tierschutz 1.05, 1994.
8. Bundesamt für Veterinärwesen (BVET). Einteilung von Tierversuchen nach Schweregraden vor Versuchsbeginn (Belastungskategorien): Allgemeine Leitsätze und Beispiele zur analogen Klassifizierung weiterer Versuche. Information Tierschutz 1.04, Bundesamt für Veterinärwesen (BVET), 19 November 1995.
9. Baumans V, Brain PF, Brugère H, Clausing P, Jeneskog T and Perretta G. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs: Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. *Lab Anim* 1994; 97–112.
10. European Commission Expert Working Group. Working document on a severity assessment framework, Brussels, 11 July 2012.
11. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 2010; 7: 447–449.
12. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 2011; 7: 55.

13. Grune B, Hensel A and Schonfelder G. Animal welfare: Rules for assessing pain in lab animals. *Nature* 2014; 512: 28, <http://dx.doi.org/10.1038/512028c> (2014).
14. Bundesinstitut für Risikobewertung. Definition of Criteria for Severity Assessment of Genetically Altered Laboratory Animals: Communications No. 029/2014 dated 25 July 2014.
15. The Jackson Laboratory. Guidelines for Nomenclature of Mouse and Rat Strains, <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/>.
16. The Jackson Laboratory. Nomenclature Tutorial, <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature>.
17. The Jackson Laboratory. ILAR Laboratory Codes, <http://dels.nas.edu/global/ilar/Lab-Codes>.
18. European Commission Expert Working Group. Working document on genetically altered animals, Brussels, 24 January 2013.
19. Turgeon B and Meloche S. Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases. *Physiol Rev* 2009; 89: 1–26, <http://physrev.physiology.org/content/physrev/89/1/1.full.pdf#zoom=75> (2009, accessed 31 October 2016).
20. Baccei ML, Bardoni R and Fitzgerald M. Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: glutamate release by capsaicin and menthol. *J Physiol* 2003; 549: 231–242.
21. Mellor, D.J., Diesch, T.J. and Johnson, C.B. Legal and animal welfare implications of when consciousness first appears in developing young and of the potential for delayed. In: *The Welfare of Animals – It's everyone's business. Proceedings of the Australian Animal Welfare Strategy International Conference, Conrad Jupiters, Gold Coast, Queensland, Australia, 31 August to 3 September 2008*.
22. Waldenstrom A, Thelin J, Thimansson E, Levinsson A and Schouenborg J. Developmental learning in a pain-related system: evidence for a cross-modality mechanism. *J Neurosci* 2003; 23: 7719–7725.
23. Wang Z and Storm DR. Maternal behavior is impaired in female mice lacking type 3 adenylyl cyclase. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 772–781.
24. Kalueff AV, Minasyan A, Keisala T, Shah ZH and Tuohimaa P. Hair barbering in mice: implications for neurobehavioural research. *Behav Processes* 2006; 71: 8–15.
25. Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 1966; 8: 295–309.
26. Runkel F, Marquardt A, Stoeger C, et al. The dominant alopecia phenotypes Bareskin, Rex-denuded, and Reduced Coat 2 are caused by mutations in gasdermin 3. *Genomics* 2004; 84: 824–835.
27. Hylander BL and Repasky EA. Thermoneutrality, Mice, and Cancer: A Heated Opinion. *Trends in Cancer* 2016; 2: 166–175.

28. Terrien, J., Perret, M., and Aujard, F. (2011). Behavioral thermoregulation in mammals: a review. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 16, pp. 1428–1444.
29. Cannon B and Nedergaard J. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J Exp Biol* 2011; 214: 242–253.
30. Speakman JR and Keijer J. Not so hot: Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans. *Mol Metab* 2012; 2: 5–9.
31. Furukawa F, Kanauchi H, Wakita H, et al. Spontaneous Autoimmune Skin Lesions of MRL/n Mice: Autoimmune Disease-Prone Genetic Background in Relation to Fas-Defect MRL/1pr Mice. *Journal of Investigative Dermatology* 1996; 107: 95–100.
32. Kasperek P, Ileninova Z, Haneckova R, Kanchev I, Jenickova I and Sedlacek R. A viable mouse model for Netherton syndrome based on mosaic inactivation of the Spink5 gene. *Biol Chem* 2016.
33. Nystrom A, Buttgerit J, Bader M, et al. Rat model for dominant dystrophic epidermolysis bullosa: glycine substitution reduces collagen VII stability and shows gene-dosage effect. *PLoS ONE* 2013; 8: e64243.
34. White DA, Fritz JJ, Hauswirth WW, Kaushal S and Lewin AS. Increased sensitivity to light-induced damage in a mouse model of autosomal dominant retinal disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 1942–1951.
35. GV-SOLAS. Tiergerechte Haltung von Labormäusen: Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung, 2014.
36. Cui C-Y, Smith JA, Schlessinger D and Chan C-C. X-Linked Anhidrotic Ectodermal Dysplasia Disruption Yields a Mouse Model for Ocular Surface Disease and Resultant Blindness. *The American Journal of Pathology* 2005; 167: 89–95.
37. Leary S, Underwood W, Anthony R, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition, American Veterinary Medical Association, 2013.
38. Guy J, Gan J, Selfridge J, Cobb S and Bird A. Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 2007; 315: 1143–1147.
39. Emerson, M. R., Gallagher, R. J., Marquis, J. G., & LeVine, S. M. Enhancing the Ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to Serve as a More Rigorous Model of Multiple Sclerosis through Refinement of the Experimental Design. *Comparative Medicine* 2009: 112–128.
40. Miller SD and Karpus WJ. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* 2007; Chapter 15: Unit 15.1.
41. Weissert R (ed). *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis -Models, Disease Biology and Experimental Therapy*: InTech, 2012.
42. Wolfensohn S, Hawkins P, Lilley E, et al. Reducing suffering in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2013; 67: 169–176.
43. Krishnamoorthy G, Lassmann H, Wekerle H and Holz A. Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest* 2006; 116: 2385–2392.

44. Pollinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, et al. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med* 2009; 206: 1303–1316.
45. Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 2007; 53: 337–351.
46. Guernsey ME, Pu H, Chiu AY, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994: 1772–1775.
47. Mead RJ, Bennett EJ, Kennerley AJ, et al. Optimised and rapid pre-clinical screening in the SOD1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS ONE* 2011; 6: e23244.
48. Hawkins P, Gimpel J, Rice AS, et al. Report of the 2012 RSPCA/UFAW Rodent Welfare Group meeting. *Animal Technology and Welfare* 2013: 49–58.
49. Leitner M, Menzies S and Lutz C. Working with ALS Mice. Guidelines for preclinical testing & colony management., PRIZE4LIFE and The Jackson Laboratory, 2009.
50. Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, et al. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93: 8460–8464.
51. Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng Y-Y and Morel L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 271694.
52. Fernandez-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Brugada J, Brugada R and Campuzano O. Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology (Basel)* 2017; 6.
53. Okamoto K and AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27: 282–293.
54. Okamoto K, Tabei R, Fukushima M, Nosaka S and Yamori Y. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1966; 30: 703–716.
55. Finotto S and Neurath MF. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 11-JAN-2002.
56. Seleznik GM, Reding T, Romrig F, et al. Lymphotoxin beta receptor signaling promotes development of autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology* 2012; 143: 1361–1374.
57. Martins GA, Cimmino L, Shapiro-Shelef M, et al. Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat Immunol* 2006; 7: 457–465.
58. Alberti, K. G. M. M. and Zimmet, P. and Shaw, J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006; 23: 469–480.

59. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 2010; 102: 1555–1577.
60. Ullmann-Culleré, Mollie H. and Foltz, Charmaine J. Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice. *Laboratory Animal Science* 1999: 319–323.
61. Hickman DL and Swan M. Use of a Body Condition Score Technique to Assess Health Status in a Rat Model of Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2010: 155–159.
62. Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT. Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten, Dezember 2009.
63. Nijmeijer B, Mollevanger P, van Zelderen-Bhola SL, Kluin-Nelemans HC, Willemze R and Falkenburg JF. Monitoring of engraftment and progression of acute lymphoblastic leukemia in individual NOD/SCID mice. *Experimental Hematology* 2001; 29: 322–329.
64. Lambert PH and Dixon FJ. Pathogenesis of the glomerulonephritis of NZB/W mice. *J Exp Med* 1968; 127: 507–522.
65. Bulfield G, Siller WG, Wight PA and Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1984; 81: 1189–1192.
66. Dangain J and Vrbova G. Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve* 1984; 7: 700–704.
67. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG and Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989; 244: 1578–1580.
68. Caplazi P, Baca M, Barck K, et al. Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. *Veterinary Pathology* 2015; 52: 819–826.
69. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB and Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2040–2044.
70. Hawkins P, Armstrong R, Boden T, et al. Applying refinement to the use of mice and rats in rheumatoid arthritis research. *Inflammopharmacol* 2015; 23: 131–150.

Anhang A - Empfehlung zur notwendigen Tierzahl für die Einschätzung einer erhöhten genetischen Belastung in Maus- und Rattenlinien

Ausgangssituation

Bei der Entwicklung neuer Maus- oder Rattenlinien (gentechnisch oder durch selektive Zucht auf Spontanmutationen) müssen diese Linien auf eine möglicherweise vorliegende genetische Belastung im Vergleich zur Ausgangslinie geprüft werden. Diese Prüfung erfolgt in zwei Schritten, wobei zunächst untersucht wird, ob in der neuen Linie belastete Tiere zu finden sind. Anschließend muss die mögliche Anzahl belasteter Tiere gegen die Häufigkeit belasteter Tiere in der Ausgangspopulation getestet werden, um festzustellen, ob es sich wirklich um eine erhöhte Belastung (verglichen mit der Ausgangspopulation) handelt.

1. Schritt: Bestimmung der Wahrscheinlichkeit, dass belastete Tiere in der Linie vorhanden sind

Um den Nachweis, dass in einer Linie belastete Tiere vorhanden sind, erbringen zu können, ist zunächst die Untersuchung einer repräsentativen Stichprobe auf Zeichen von Belastung erforderlich. Die Größe dieser Stichprobe hängt von verschiedenen Aspekten ab, die im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

Zu untersuchende Linie: Fall 1 (Definierter Genotyp)

Wenn eine Maus- oder Rattenlinie, die gezielt genetisch verändert wurde, einzuschätzen ist, liegt der interessierende Genotyp, der zu einer Belastung führen könnte, vor und kann molekulargenetisch nachgewiesen werden. Damit kann sichergestellt werden, dass alle in die Untersuchungen einfließenden Tiere auch wirklich den zu untersuchenden veränderten Genotyp aufweisen.

Der wichtigste Parameter für die zu untersuchende Tierzahlbestimmung ist daher die Penetranz, mit der der vorhandene Genotyp auch im Phänotyp (hier als Belastung) manifest wird. Bei den meisten Erbfehlern liegt eine nahezu 100%ige Penetranz vor (Polydaktylie 90%¹), Piebalds-Stirnlocke 90%²), Chorea Huntington ab einer bestimmten ur-

sächlichen Repeatzahl nahezu 100%³⁾, Neurofibromatose, Phenylketonurie). Eine ähnliche Penetranz ist bei gentechnisch veränderten Linien anzunehmen, da auch hier vorrangig Einzelgenveränderungen (oder Veränderungen sehr weniger Gene) angestrebt werden. Da jedoch für solche Experimente häufig Kreuzungen den Ausgang bilden und auch bei Inzuchtlinien eine gewisse Variabilität bei Messdaten⁴⁾ vorliegt, kann es geschehen, dass aufgrund eines individuellen genetischen Hintergrundes der eigentlich belastete Phänotyp nicht ausgeprägt wird. Um diesem möglichen Hintergrundeinfluss Rechnung zu tragen, wird mit einem hohen Sicherheitszuschlag kalkuliert und eine relativ geringe Penetranz des Merkmals von nur 80% angenommen. Bei geringerer Penetranz muss von einem multifaktoriellen Erbgang bzw. einem starken Umwelteinfluss ausgegangen werden. Beide Ursachen können dann jedoch nicht mehr der genetischen Veränderung allein zugeschrieben werden.

Zu untersuchende Linie: Fall 2 (Selektion auf Spontanmutation)

Die Linien wurden nicht mittels Gentransfer oder anderer gentechnischer Methoden erstellt, sondern gehen auf eine unbekannte, jüngere Spontanmutation zurück. Ist eine solche spontan entstandene Besonderheit mit klar definiertem Erbgang die Grundlage zum bewussten Aufbau einer Speziallinie, muss eine Belastungsbeurteilung durchgeführt werden. In diesem Fall existiert jedoch kein Marker, um nur Tiere mit dem veränderten Genotyp für die Belastungsuntersuchungen auszuwählen. Die erfolgreiche Selektion zur Entwicklung einer solchen Linie setzt aber zwingend einen klar erkennbaren Phänotyp voraus, der eindeutig genetisch (wahrscheinlich monogen) bedingt ist und durch die beschriebene Art der Zuchtwahl/des Linienaufbaus häuft sich der gewünschte Genotyp sehr schnell an. Für die Auswahl von Tieren für die Belastungsuntersuchung werden dadurch bezüglich der interessierenden Mutation genetische Verhältnisse geschaffen, die mit einer Vorselektion auf den definierten Genotyp vergleichbar sind. Die Penetranz einer solchen Spontanmutation, die Diversität des genetischen Hintergrundes sowie die Wahrscheinlichkeit, belastete Tiere aufzufinden, sind daher mit dem oben beschriebenen Fall 1 vergleichbar und es gibt keine Unterschiede in der Anzahl der auszuwählenden Tiere, die auch hier genauso zufällig erfolgt. Das Restrisiko bei einem dominanten Erbgang zufällig ein homozygot rezessives Tier (aus einer zufälligen, unerkannten Heterozygotenanpaarung) auszuwählen, ist gering und wird mit der insgesamt

gering gewählten Penetranz von nur 80% (die im Fall einer Selektion auf eine Spontanmutation mit großer Wahrscheinlichkeit deutlich höher ausfällt) mit abgedeckt. Eine Linie, die auf einer Mutation mit rezessivem Erbgang aufgebaut wird, ist bereits nach einer Generation reinerbig.

Zu untersuchende Linie: Fall 3 (Syndrom)

Syndrome werden immer durch das kombinierte Wirken mehrerer Gene in Kombination mit einem erheblichen Umwelteinfluss hervorgebracht, wodurch die erkennbare Penetranz unter 80% liegt. In der Regel werden die Auswirkungen erst in speziellen Kombinationen unter bestimmten Bedingungen sichtbar. Das ist häufig der Tierversuch, für den diese Veränderungen dann auch genehmigt werden müssen. Die Erkrankung eines Tieres entspringt dabei nicht per se einer genetischen Veränderung der Linie.

Eine Linie mit einer Genveränderung, die in die Ausbildung eines Syndroms involviert ist, muss zunächst in der gleichen Weise wie eine Linie mit klaren Geneffekten untersucht werden. Dies ist schon deshalb notwendig, weil es in der Regel keine Vorinformation zum Belastungsumfang gibt. Unter den genannten Bedingungen wird die betrachtete Linie häufig nur eine geringe Anzahl belasteter Tiere ausweisen, was zunächst zu einer Einstufung als unbelastete Linie führt. Sollte es jedoch einen stärkeren Zusammenhang zwischen der Genveränderung und einer Belastung geben, wird dies bei der weiteren Etablierung und Haltung durch ein überdurchschnittliches Auftreten belasteter Tiere auffallen. Ein erstes Anzeichen für ein mögliches Syndrom ist ein knappes Verfehlen der Signifikanzgrenze bei der Untersuchung zur Linieneinstufung. Eine solche Linie muss noch einmal retrospektiv beurteilt werden. Entsprechend der nun sichtbaren Häufigkeit belasteter Tiere kann nun die erforderliche Tierzahl zur Ermittlung einer belasteten Linie korrekt kalkuliert werden. Mit dieser höheren Tierzahl wird noch einmal der Vergleich zur Ausgangslinie durchgeführt und die Linie ggf. als belastet eingestuft. Grundsätzlich gilt: Je kleiner der Anteil des veränderten Gens an der Gesamtvarianz ist, je unbedeutender wird seine gentechnische Veränderung für den Gesamtorganismus und desto weniger Tiere werden aufgrund der Genveränderung auffällig sein.

Zu untersuchende Ausgangslinie

Für die Bestimmung einer gegenüber der Referenzlinie möglicherweise erhöhten Belastung, ist es erforderlich, auch die Ausgangslinie hinsichtlich ihrer Belastung einzuschätzen. Hier würde man pauschal annehmen, dass diese Linie – aufgrund der fehlenden Mutation/gentechnischen Veränderung – nicht belastet ist. Da Spontanmutationen immer mit einer geringen Allelfrequenz auch in der Ausgangspopulation verbleiben oder in Genen, die gerade gentechnisch verändert werden, vorhanden sein können, soll ein gewisser „Belastungsbackground“ von 5% belasteter Tiere angenommen werden. Dieser Wert liegt über dem Auftreten bedeutender Erbfehler in der Tierzucht, das mit einer maximalen Defektallelfrequenz von 8%⁵⁾ im rezessiven Erbgang zu einer Frequenz von < 1% sichtbar belasteter Tiere führt. Hier soll aber berücksichtigt werden, dass Nagerinzuchtstämme möglicherweise eine etwas stärkere Grundbelastung aufweisen können. Unbekannte Ausgangslinien sollten daher pauschal mit 5% Belastung kalkuliert werden.

2. Schritt: Kalkulation der zu untersuchenden Tierzahl

Mit einem Signifikanztest kann überprüft werden, ob sich die neue Linie hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von belasteten Tieren deutlich von der Ausgangslinie unterscheidet. Daher müssen in der Ausgangspopulation auch einmalig die gleiche Anzahl von Tieren für den Vergleich untersucht werden. Als Ausgangspopulation ist hierbei der genetische Zielhintergrund oder die Rückkreuzungspopulation zu verstehen. Im Fall von F₁- oder F₂-Populationen sollte eine Population gleicher genetischer Konstruktion ohne die untersuchte genetische Veränderung zum Vergleich herangezogen werden.

Anmerkung: Beim Screening sind generell alle Auffälligkeiten und Formen von Belastung zu berücksichtigen, nicht nur die aufgrund der genetischen Veränderung erwarteten, da es im Zusammenspiel mit dem Gesamtgenom auch zu unerwarteten Folgen kommen kann.

Die Anzahl der zu untersuchenden Tiere wurde mit einer Stichprobenumfangsplanung für den Vergleich zweier Wahrscheinlichkeiten durchgeführt (Programm: proc power).

Folgende Bedingungen wurden gesetzt:

- Test: Fisher's Exact Conditional Test für zwei Wahrscheinlichkeiten
- Verteilung: exact conditional
- Einseitiger Test
- Alpha: 0,05
- Power: 0,8
- Wahrscheinlichkeit einer Belastung in der Ausgangspopulation: 5% (s. oben)
- Wahrscheinlichkeit einer Belastung in der veränderten Population: 80% (s. oben)

Bei den vorgegebenen Bedingungen ist zwischen den beiden Populationen eine Differenz in der Wahrscheinlichkeit, dass belastete Tiere auftreten, von 0,75 anzunehmen (80% minus 5%). Damit würden 7 Tiere für einen Analyse ausreichen, um diese Differenz mit einer Power von 0,8 signifikant zu sichern (Abb. 1). Da Tiere aber nur in ganzen Zahlen in die Berechnungen eingehen können, stellt ein belastetes Tier in der Ausgangspopulation bei 7 untersuchten Tieren bereits eine Auftrittswahrscheinlichkeit von 14,3% (im Vergleich zu den kalkulierten 5%) bzw. 5 belastete Tiere in der veränderten Linie von 71,4% (im Vergleich zu den kalkulierten 80%) dar. Damit ergibt sich für 7 Tiere eine realistische Differenz in den Auftrittswahrscheinlichkeiten von nur 57,1%. Dies zeigt, dass die Tierzahl zu knapp kalkuliert wurde und die Gefahr von falsch negativen Resultaten zu groß ist. Da 8 untersuchte Tiere ebenfalls eine zu geringe Differenz (62,5% zu 70% Nachweisgrenze) und 9 Tiere mit 66,7% gerade so die Nachweisgrenze (65%) erreichen, sollten 10 Tiere je Population untersucht werden, für die die zu erwartende Wahrscheinlichkeitsdifferenz von 70% mit einer Sicherheitszulage von 10% nachzuweisen ist. Außerdem lässt sich mit 10 Tieren bei einer wider Erwarten höheren Belastung der Ausgangslinie (bis 20%) unter den entsprechenden Umständen (Differenz von 65%) immer noch eine höhere Belastung nachweisen.

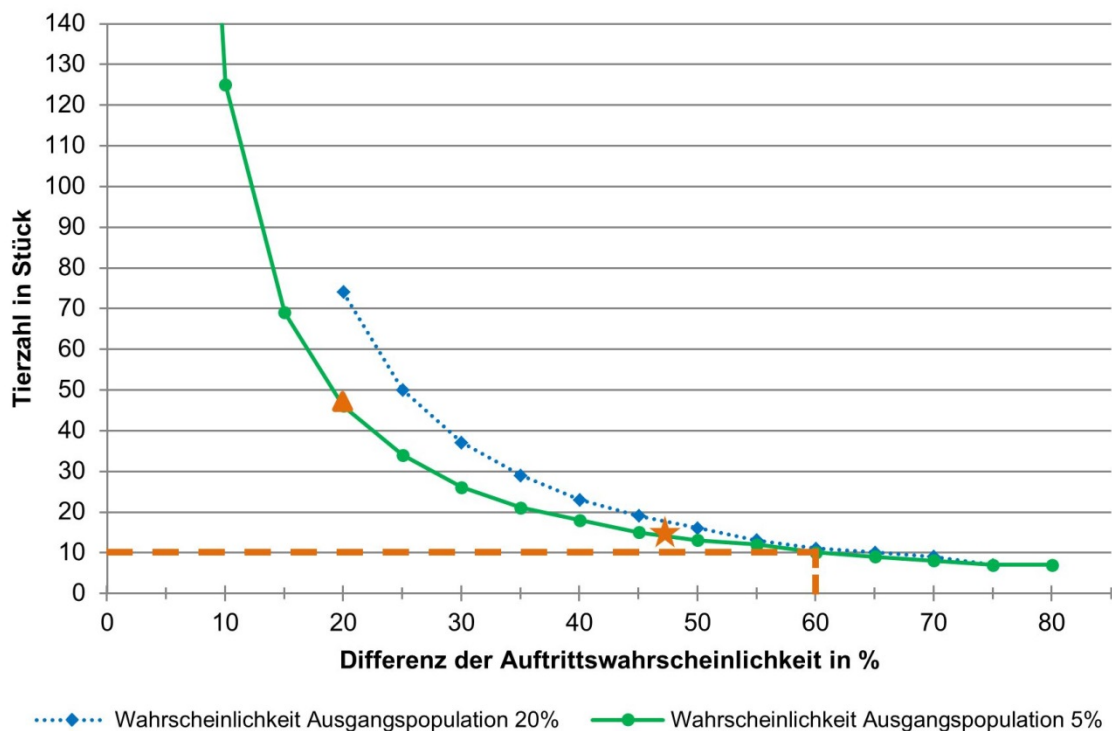


Abb. 1: Tierzahl, die erforderlich ist, um eine bestimmte Differenz in der Auftrittswahrscheinlichkeit belasteter Tiere zwischen den beiden Populationen bei unterschiedlicher Belastungswahrscheinlichkeit der Ausgangslinie von 5% (Grün) bzw. 20% (Blau) nachzuweisen. Bei einer Tierzahl $n = 10$ lässt sich noch eine Differenz von 60% als Unterschied nachweisen (braune Linien). Die gegenwärtig genutzte Anzahl von 14 zu untersuchenden Tieren ermöglicht es, bereits bei einer Differenz von 47,5% beide Linien signifikant zu differenzieren (Stern). Der Nachweis bei einer Differenz von 20% (z. B. bei einem Syndrom) macht allerdings eine Erhöhung der Tierzahl auf 46 notwendig (Dreieck).

3. Schritt: Signifikanzprüfung gegen die Ausgangspopulation

Nach der Untersuchung beider Populationen werden die Anteile belasteter Tiere für jede Population berechnet. Anschließend wird die Differenz zwischen dem Anteil belasteter Tiere in der veränderten Population zu dem in der Ausgangspopulation gebildet. Der Wert in Abb. 2 gibt an, ob eine signifikante Differenz bei einer Power von 0,8 und einem alpha von 0,05 besteht. Wenn ja, weist die genetisch veränderte Linie eine höhere Belastung auf und eine Weiterzucht bedarf der Genehmigung.

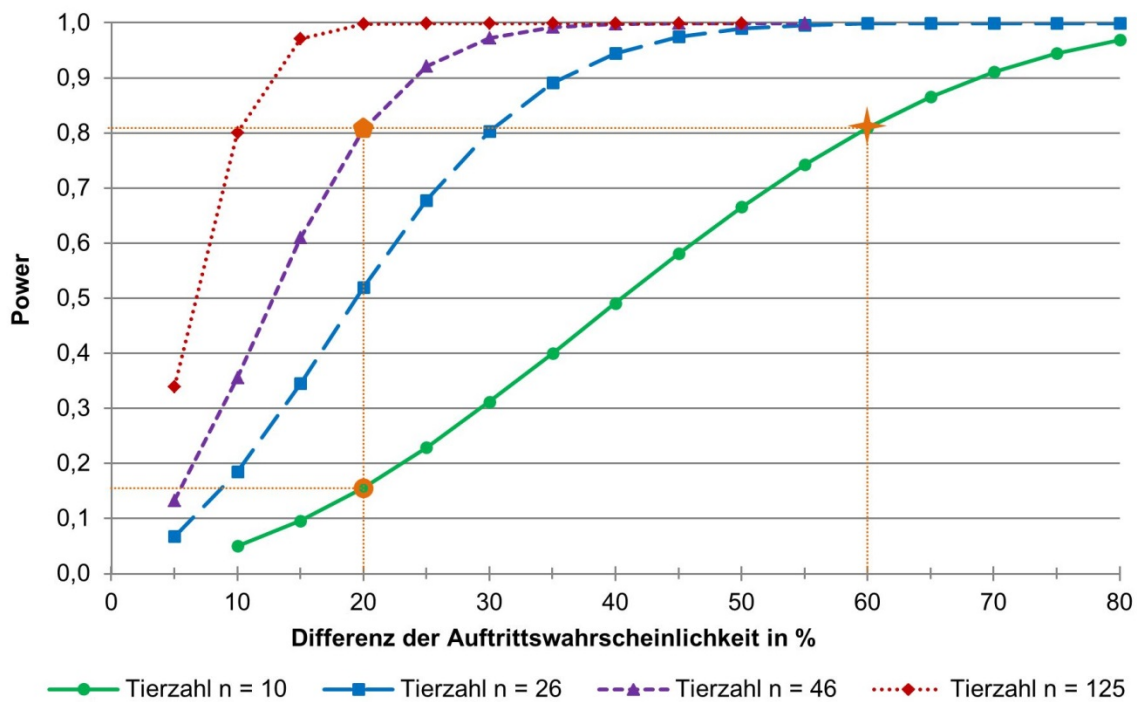


Abb. 2: Power zum Nachweis eines signifikanten Unterschiedes zwischen beiden Populationen in Abhängigkeit von der untersuchten Tierzahl. Bei 10 Tieren ist eine Differenz von >60% mit einer Power von 0,8 gesichert (Stern). Dagegen sind für die Sicherung von nur 20% insgesamt 46 Tieren erforderlich (Fünfeck), da bei 10 Tieren die Power unzureichend ist (Ring).

Beispiel 1: Bei der Untersuchung von 10 Tieren werden in der Ausgangspopulation ein belastetes und in der veränderten Population 8 belastete Tiere gefunden. Das entspricht einer Auftrittswahrscheinlichkeit von 10% Belastungen in der Ausgangs- bzw. 80% in der veränderten Population. Die Differenz liegt bei 70% und besitzt eine Nachweispower von >0,8. Damit ist die veränderte Population deutlich erhöht belastet.

Beispiel 2: In der Ausgangspopulation wird kein belastetes Tier entdeckt. In der veränderten Linie treten 2 belastete Tiere auf. Die Differenz zwischen beiden Auftrittswahrscheinlichkeiten liegt damit bei 20%. Für diese Differenz liegt die Power bei knapp 0,16. Damit ist die gentechnisch veränderte Linie nicht höher belastet.

Beispiel 3: In der Ausgangspopulation wird ein belastetes Tier entdeckt, in der veränderten sind es 4. Daraus ergibt sich eine Differenz von 30%. Diese Differenz reicht nicht aus, um beide Populationen hinsichtlich des Auftretens von belasteten Tieren sicher zu

trennen, da die Power nur bei 0,31 liegt. Diese Linie ist jedoch auch in der weiteren Haltung auffällig, was sich durch ein ständig erhöhtes Auftreten belasteter Tiere zeigt. Diese Gruppe muss einer retrospektiven Nachbetrachtung unterzogen werden. Da aus den Informationen der ersten Untersuchung eine Auftrittswahrscheinlichkeit von 30% angenommen wird, müssen nun 26 Tiere untersucht werden. In der Ausgangspopulation treten jetzt 2, in der neuen Linie 11 belastete Tiere auf. Daraus ergibt sich eine Differenz von rund 35%. Bei den untersuchten 26 Tieren lässt sich der Unterschied zwischen beiden Gruppen nun mit einer Power von 0,89 sichern und die Linie ist als belastet zu genehmigen. Hier handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Syndrom.

Zusammenfassung

Aus den dargelegten Berechnungen geht hervor, dass mit einer Zahl von 10 zu untersuchenden Tieren eine gute Sicherheit (Power 0,8) besteht, erhöht belastete Linien zu erkennen. Da die Genwirkung sowohl durch das Geschlecht als auch durch einen nicht vollständig reproduzierbaren genetischen Hintergrund modifiziert werden kann, sollten zur Untersuchung 5 männliche und 5 weibliche Tiere möglichst aus 5 verschiedenen Würfen verschiedener Eltern ausgewählt werden. Im Fall eines klar geschlechtsbegrenzten Erbgangs oder epigenetischer Einflüsse ist es erforderlich zehn Tiere des betroffenen Geschlechts auszusuchen, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. In Fällen mit geringer Penetranz (Syndrome) sollte eine zweite, retrospektive Beurteilung erfolgen. Insgesamt gesehen ermöglicht die gegenwärtig allgemein akzeptierte Anzahl von **14 zu untersuchenden Tieren** eine gute Sicherheit (bereits ab einer Auftrittswahrscheinlichkeit von 47,5%), eine erhöht belastete Linie zu erkennen.

Danksagung

Die Autoren danken Bärbel Kroschewski (Humboldt-Universität) für die Unterstützung bei der biostatistischen Berechnung.

Referenzen

- 1) Arbeitsmaterial „Formale Genetik III“ der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, 2016
- 2) Braun-Falko et al. (2005): *Dermatologie und Venerologie*. Springer Medizin-Verlag Heidelberg, 5. Auflage, S. 934
- 3) Clabough (2013): Huntington's disease: the past, present, and future search for disease modifiers. In: *Yale J. Biol. Med.* 86/2, S. 217-233

⁴⁾ Gärtner, K. (1991): Zur Variabilität von Meßdaten aus Tierversuchen, deren Ursachen und die Methoden, mit ihr umzugehen. In: K. Gärtner ed.) Qualitätskriterien der Versuchstierforschung. Verlag Chemie Weinheim, 1991.

⁵⁾ <http://www.agrarheute.com/news/fleckvieh-wichtigsten-erbfehler-ueberblick>, 20.04.2016