

Stellungnahme der Kommission zur Erstellung von Abbruchkriterien in Projektanträgen (Dezember 2023)

Inhalt

Inhalt.....	1
1. Einleitung:.....	3
1.1 Problemstellung und Zielsetzung	3
1.2 Gesetzliche Vorgaben über die minimale Belastung von Tieren um das Projektziel zu erreichen.....	3
1.3 Warum Abbruchkriterien wichtig sind	5
1.4 Schaden-Nutzen Analyse und Abbruchkriterien	6
1.5 Klinische Endpunkte	7
2. Überlegungen zur Erstellung „möglichst schmerzloser Endpunkte“	9
2.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	9
2.2 Pilotstudien.....	9
2.3 Der Tod als Endpunkt (Mortalität).....	10
2.4 Wie human ist der Endpunkt (Präfinalität, moribund)?.....	10
2.5 Festlegen von Abbruchkriterien	11
2.6 Unterstützende Maßnahmen und Abbruchkriterien	13
2.7 Unvorhergesehene Ereignisse und Abbruchkriterien	14
2.8 Kombination von Abbruchkriterien.....	15
2.9 Kumulative Belastung und Abbruchkriterien	15
3. Score Sheets:	17
3.1 Objektivierung von Abbruchkriterien – wie wird die Belastung gemessen?	17
3.2 Welfare Assessment vs. Abbruchkriterien (aka. Score Sheet vs. Score Sheet).....	18
3.3 Überwachungszeitpunkte und Zeitplan	20
3.4 Gewichtung von Abbruchkriterien	21
3.5 Abbruchkriterien einmal anders betrachtet.....	21
3.6 Body Condition Score (BCS), Grimace Scale (GS) und Pain Scale	22
4. Rückblickende Analyse der Abbruchkriterien	25

4.1	Evaluierung und Verfeinerung.....	25
4.2	Vorgangsweise bei Überschreitung.....	26

Diese Stellungnahme und deren Empfehlungen sind im Kontext des TVG 2012 und seiner Verordnungen zu lesen. Es ergeben sich aus diesen Empfehlungen keine darüber hinausgehenden Verpflichtungen.

1. Einleitung:

1.1 Problemstellung und Zielsetzung

Die Autorinnen und Autoren sind regelmäßig mit der Beurteilung von Antragsunterlagen zur Genehmigung von Tierversuchen betraut und verfügen über Expertise in speziellen Tiermodellen, Methoden und Fachgebieten. Kontinuierliche Fort- und Weiterbildung führt in den letzten Jahren zu einem besseren Verständnis der Anforderungen bei der Projekterstellung und damit zu einer ausführlicheren Darstellung des Projektvorhabens. So werden vermehrt, nicht nur die wissenschaftliche Bedeutung der Projekte, sondern auch die Eingriffe und Prozeduren inklusive Anästhesie und Analgesie detaillierter und ausführlicher beschrieben. Viel Erfahrung ist vor allem für die projektspezifische Zuordnung des Schweregrades und die Formulierung sinnvoller und geeigneter humaner – möglichst schmerzloser - Endpunkte oder Abbruchkriterien (*humane endpoints*) notwendig. Sind Abbruchkriterien zu vage formuliert, nicht projektrelevant oder aus anderen Quellen kopiert, sind sie für das Tier wirkungslos. Gut formulierte, effektive und auch objektivierbare Abbruchkriterien sind für anspruchsvolle Tierversuchsprojekte ebenso wichtig wie die wissenschaftliche Idee, korrekte Belastungseinschätzungen und konsequente Anwendung der 3R Prinzipien. Zu dem Thema Abbruchkriterien gibt es bereits eine Reihe von Ressourcen, Stellungnahmen, Webseiten oder Abhandlungen (Liste 1). Diese sind zum Teil sehr allgemein bzw. formal gehalten und nicht direkt in Projekten umzusetzen.

Diese Stellungnahme hat daher zum Ziel, bei der Ausformulierung zweckmäßiger Abbruchkriterien zu helfen und Verbesserungen anzuregen. Hier soll mit Beispielen (positiven und negativen), Überlegungen, Anregungen, Verweisen und Strategien zu einer neuen Herangehensweise an die Formulierung von Abbruchkriterien ermutigt werden, die helfen soll geeignete Endpunkte zu identifizieren und im Sinne der 3R zu implementieren. Die angeführten Beispiele (Tabellen und Abbildungen) sollen als Anregung dienen und für die eigenen Projekte neu formuliert werden. Diese Stellungnahme soll die obengenannten Abhandlungen des Themas nicht ersetzen, sondern als Ergänzung dienen.

1.2 Gesetzliche Vorgaben über die minimale Belastung von Tieren um das Projektziel zu erreichen

Die EU-Richtlinie 2010/63/EU ebenso wie das österreichische Tierversuchsgesetz TVG 2012 sollen den Schutz und das Tierwohl von Tieren, die zu wissenschaftlichen oder pädagogischen Zwecken verwendet werden, gewährleisten. Ein wichtiges Werkzeug hierfür stellen die Abbruchkriterien dar. Sie sollen sicherstellen, dass rechtliche, ethisch-moralische, aber auch wissenschaftliche Rahmenbedingungen erfüllt sind. Das Gesetz sieht vor, dass die Tierart, das

verwendete Modell und der Versuchsablauf selbst während eines Tierversuchs so gewählt werden müssen, dass die Belastung¹ für das einzelne Tier, bei maximalem Wissensgewinn, so gering wie möglich gehalten wird (siehe Schaden-Nutzen-Analyse).

Begriffserklärung

Sowohl die **Schaden-Nutzen-Analyse**, als auch die **Risiko-Nutzen-Analyse** sowie die **Güterabwägung** meinen in ihrer Kernaussage dasselbe, werden aber in aller Regel in unterschiedlichen Zusammenhängen (Tierstudien vs. Humanstudien), oder von unterschiedlichen Institutionen verwendet. So wird in der Schweiz häufig der Begriff der Güterabwägung verwendet. Im EU-Raum wird im Zusammenhang mit Tierversuchen zumeist der Begriff der Schaden-Nutzen-Analyse (*harm benefit analysis*) verwendet, der Begriff der Risiko-Nutzen-Analyse bei Humanstudien. Im Rahmen der Schaden-Nutzen-Analyse im Kontext von Tierversuchen soll hinterfragt werden, ob die (potenziellen) Schäden für die Tiere in Form von Leiden, Schmerzen und Ängsten unter Berücksichtigung ethischer Erwägungen durch das erwartete Ergebnis gerechtfertigt sind und letztlich Menschen, Tieren oder der Umwelt zugutekommen können. Ein Tierversuch ist nur dann zulässig, wenn der Nutzen, zumeist ein Erkenntnisgewinn, den potenziellen Schaden überwiegt (Brønstad et al., 2016).

In Tierversuchen wird eine Belastung in Kauf genommen (das macht es zum Tierversuch), darum wird eine **Schaden-Nutzen-Analyse** durchgeführt. In Humanstudien ist ein Schaden ethisch nicht vertretbar, deswegen wird eine **Risiko-Nutzen-Analyse** vorgenommen. Weil ein großer Teil der präklinischen Forschung dem Menschen zugutekommen soll, sollten die Vorüberlegungen mit gleichem Respekt oder Umsicht erfolgen.

Abbruchkriterien, oder auch humane Endpunkte, sollen hierbei während des Versuches sicherstellen, dass die Belastung objektiv und nachvollziehbar ermittelt, und der Versuch einerseits vor Überschreiten der Maximalbelastung, oder andererseits bei Erreichen des Projektziels beendet wird. In dieser Stellungnahme soll einerseits vermittelt werden, warum diese Vorgehensweise nicht nur im Sinne des Tierwohls, sondern auch für die Qualität der Forschung selbst essenziell ist, und andererseits Hilfestellung zur Erstellung sinnvoller und effektiver Abbruchkriterien und die treffsichere Umsetzung rechtlicher Vorgaben geben.

Begriffserklärung

Die Begriffe „**Abbruchkriterium**“ oder „**Humaner Endpunkt**“ entsprechen definitionsgemäß (Hendriksen & Morton, 1999) dem ersten Anzeichen von potenziellen Schmerzen bzw. einer Belastung in einem Tierversuch, welches - innerhalb des Rahmens der zu erreichenden experimentellen Endpunkte - für das Treffen von Maßnahmen, wie das humane Töten des Tieres, den Abbruch oder die Reduzierung der schmerzhaften bzw. Stress erzeugenden Prozeduren verwendet werden kann (Hendriksen & Morton, 1999). Beide Begriffe bezeichnen daher jenen Moment während eines Versuchs, an dem die feststellbare Belastung

¹ Als **Belastung** sind in diesem Dokument Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden gem. TVG 2012 definiert

für das Tier den potenziellen Nutzen/Wissensgewinn überschreitet, die Ergebnisse an Aussagekraft verlieren, die Schaden-Nutzen-Analyse damit ungültig wird und der Tierversuch abgebrochen werden muss.

Williams und Baneux schlugen 2022 (Williams & Baneux, 2022) die Differenzierung des Begriffs „Endpunkt“ vor, um zu verdeutlichen, dass hier unterschiedliche Ansichten und Interessen zu unterscheiden sind: so soll der **Humane Endpunkt** (humane endpoint, HEP) vor allem tierschutzrechtliche Interessen abbilden, also den Punkt, an dem aus humaner und ethisch-moralischer Sicht ein Versuch beendet werden muss (William S. Stokes, 2000).

Der Experimentelle Endpunkt (experimental endpoint, EEP) hingegen beschreibt den Moment, an dem der erhoffte Erkenntnisgewinn eintritt, und damit eine Weiterführung des Versuches nicht mehr gerechtfertigt ist. Ziel soll es sein, dass HEP und EEP möglichst übereinstimmen.

Als **Humanen Interventionspunkt** (humane intervention point, HIP) bezeichnet man jene Punkte, an denen als Reaktion auf beobachtete Belastungen, unabhängig davon, ob diese Folge des Versuchs sind oder nicht, eine Intervention gesetzt wird. Ob diese Intervention präventiv, kurativ, rehabilitativ oder palliativ ist, ist im Einzelfall zu bestimmen und abhängig von der Art und Dauer der aufgetretenen Schäden und der Belastung.

1.3 Warum Abbruchkriterien wichtig sind

Um eine Schaden-Nutzen-Analyse durchführen zu können, muss nicht nur das gesamte Projekt, sondern auch die geplante Verwendung jedes einzelnen Tieres begründet werden. Dies gilt für jeden einzelnen Tierversuch (**= jede einzelne Intervention am Tier, die eine Belastung darstellt!!**) und dessen gesamte Dauer. Tiere können auf Eingriffe oder Prozeduren individuell unterschiedlich reagieren und eventuell schon vor Ende der geplanten Versuchs- oder Beobachtungsdauer einen Zustand erreichen, aufgrund dessen keine weiteren wissenschaftlichen Erkenntnisse zu erwarten sind. Ein Beispiel hierfür wäre die Unzuverlässigkeit von Daten, die von Tieren mit beginnendem Organversagen nach induzierter, fortgeschrittener Sepsis gewonnen werden. Somit würde die Begründung für eine Fortsetzung des Tierversuchs wegfallen und dieser unzulässig werden. Daher ist es auch notwendig, Tierversuche mit mess- oder beobachtbaren Merkmalen zu versehen, um die versuchsbedingten Belastungen vorab einzuschätzen und damit auch einzuschränken. Solche mess- oder beobachtbaren Merkmale sollen daher klar und eindeutig zeigen, ob die Durchführung bzw. Fortsetzung des Tierversuchs wissenschaftlich sinnvoll und rechtlich zulässig ist.

	Definition: Welche Hypothesen werden getestet?	Anwendung in jedem Experiment: Wann ist der Endpunkt in jedem Versuchsteil erreicht?	Ermittlung: Wer ermittelt wie, wann und wie oft diese Endpunkte?
Wissenschaftlicher Endpunkt	<ul style="list-style-type: none"> – Mit welchen Kriterien ist die wissenschaftliche Fragestellung beantwortet? 	<ul style="list-style-type: none"> – Welche spezifischen Daten werden mindestens benötigt? – Ab welchem Punkt werden keine Daten mehr benötigt? 	<ul style="list-style-type: none"> – Wie und wann wird die Sammlung der Daten gemacht und wie wird sie dokumentiert? – Wer entscheidet wann, dass der wissenschaftliche Endpunkt erreicht wurde?
Rechtlicher Endpunkt	<ul style="list-style-type: none"> – An welchem Punkt kann das Leiden der Tiere nicht mehr mit dem wissenschaftlichen Nutzen gerechtfertigt werden? – Wenn es zu Unverhältnismäßigkeit kommt, muss das Experiment beendet werden, auch wenn der wissenschaftliche Endpunkt noch nicht erreicht wurde! 	<ul style="list-style-type: none"> – Die Schaden-Nutzen-Analyse muss für jeden einzelnen Teilversuch oder Versuchsteil eine positive Bilanz zu Gunsten des Nutzens ergeben! 	<ul style="list-style-type: none"> – Wer ist geschult und damit qualifiziert die Belastung der Tiere rechtzeitig zu erkennen und einzuschreiten? – Wie, wann und wie oft wird die Belastung aufgezeichnet? – Welche Möglichkeiten der Belastungsreduktion sind vorhanden und können angewendet werden?
Unvorhergesehene Ereignisse	<ul style="list-style-type: none"> – Welche Unbekannten können im geplanten Projekt auftreten? 	<ul style="list-style-type: none"> – Gibt es bestimmte Bereiche oder Zeitspannen in denen besonders genau beobachtet werden muss? 	<ul style="list-style-type: none"> – Was passiert bei unvorhergesehenen Vorkommnissen? – Alle nicht projektbezogenen Vorkommnisse liegen außerhalb von Projektgenehmigungen!

Tabelle 1 Endpunktmatrix adaptiert (Ashall & Millar, 2014)

1.4 Schaden-Nutzen-Analyse und Abbruchkriterien

Das TVG 2012 verlangt bei jedem Projekt obligatorisch eine Schaden-Nutzen-Analyse, also eine Abwägung des Nutzens des Projektes mit dem Schaden, der den Tieren entsteht. Diese Schaden-Nutzen-Analyse gilt aber nicht nur für das Projekt insgesamt, sondern für jeden Projektteil, damit auch für jedes Experiment und für jedes einzelne Tier.

Bei der Induktion von Krankheitsmodellen ergibt sich oft eine Normalverteilung (siehe Abbildung 1) mit einem angepeilten Belastungsphänotyp, und einigen Tieren mit geringerer Reaktion sowie einigen wenigen Tieren mit sehr starker Ausprägung und hohen Belastungswerten. Wenn also bei der Induktion eines Krankheitsmodelles die Tiere in Kohorten nach Belastung eingeteilt werden, wäre die Anzahl der Tiere jener Gruppen mit den höchsten

Belastungswerten zu gering, um eine erwartbare, statistische Aussagekraft zu besitzen. Der Tierversuch sollte daher vor Erreichen der maximalen Belastung abgebrochen werden. Projektleiterinnen und Projektleiter sollten daher zuerst den höchsten zu erwartenden Belastungsphänotyp festlegen und gleichzeitig überlegen, ob von einzelnen Individuen mit darüber hinaus gehenden Belastungsphänotypen noch wissenschaftliche Erkenntnisse zu erwarten sind (über den Schaden hinausgehend), die statistisch relevante Interpretationen der Ergebnisse erlauben.

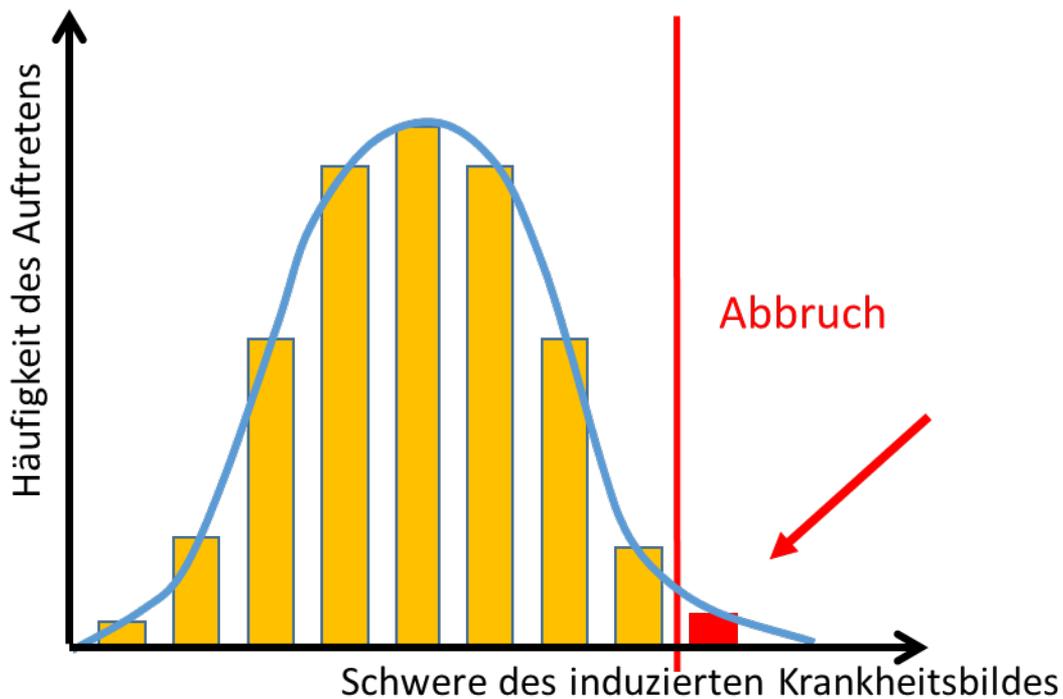


Abbildung 1 : Normalverteilung bei Induktion von Krankheitsmodellen

Tiere mit dem schwersten induzierten Krankheitsbild (rote Fläche) sind statistisch kaum relevant und haben wenig Aussichten auf eine im Projekt getestete Therapie anzusprechen und sollten im Sinne der 3R euthanasiert werden.

1.5 Klinische Endpunkte

Grundsätzlich bedeutet das Erreichen von Abbruchkriterien das Ergreifen von Maßnahmen, jedoch nicht unbedingt die Euthanasie. Wenn eine Maßnahme erfolgreich ist, kann der Tierversuch durchaus fortgesetzt werden. Es kann daher sehr hilfreich sein, sich Praktiken und Begriffe aus klinischen Versuchen am Menschen vor Augen zu führen. Es stehen humane Patienteninteressen und Sicherheit gegenüber dem wissenschaftlichen Interesse im Vordergrund. Hier wird daher nicht von einer Schaden-Nutzen-Analyse gesprochen, sondern von einer Risiko-Nutzen-Analyse. Ein derartiger Perspektivenwechsel kann auch bei Tierversuchsprojekten lehrreich sein, da bei vielen biomedizinischen Projekten das Ziel ohnehin die Fortsetzung der vorklinischen Studien in der Klinik ist.

Es sollte auch bedacht werden, dass in klinischen Studien die Probanden zusätzlich unterstützende Maßnahmen erhalten. Solche begleitenden Interventionen wären sinnvollerweise auch bei Versuchstieren einzusetzen (siehe unten, Punkt 2.6).

Begriffserklärung:

Ein **Biomarker (oder biologischer Marker)** ist ein Merkmal, welches objektiv gemessen und evaluiert wird, und als ein Indikator für normale biologische Vorgänge, pathogene Prozesse oder eine pharmakologische Antwort auf eine therapeutische Intervention gilt. Diese können Merkmale für die Diagnose und den Fortschritt einer Krankheit (Krankheitsstadium), des weiteren Krankheitsverlaufes oder der Voraussage eines Therapieverlaufes sein (z.B. Tumormarker oder Blutbild)(Atkinson et al., 2001; Strimbu & Tavel, 2010).

Ein **klinischer Endpunkt** ist ein Merkmal oder eine Variable, welche(s) anzeigt, wie sich ein Patient fühlt, funktioniert (seinen Alltag bewältigen kann) oder überlebt. Ein **primärer Endpunkt** bezeichnet das primäre (erstrangige) Ziel der Studie und besteht aus vorher festgelegten möglichst messbaren und klar definierten Kriterien. Im Gegensatz zu den primären Endpunkten werden für die **sekundären Endpunkte** oft auch weiche, das heißt nicht-messbare, Kriterien festgelegt. Beispiele für typische sekundäre Endpunkte von Studien sind Schmerzen und die Lebensqualität der Patienten.

Ein **Ersatzendpunkt (surrogate endpoint)** ist ein Biomarker, der als Ersatz für einen klinischen Endpunkt dienen soll und entsprechend validiert ist (Feigin, 2004). Die FDA hat auf ihrer Webseite (unter <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/ucm613636.htm>) eine Liste an Ersatzendpunkten veröffentlicht (Updates alle 6 Monate), die bei klinischen Studien eingesetzt wurden, die zur Zulassung von Therapien führten.

2. Überlegungen zur Erstellung „möglichst schmerzloser Endpunkte“

2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Um zusätzliche Belastungen für die Tiere zu vermeiden, sollten bereits während der Projektplanung Ausschlusskriterien festgelegt werden. Sofern es der Versuchszweck nicht anders vorsieht, sollten nur gesunde Tiere in ein Projekt miteinbezogen werden. Eine Beschreibung der gewählten Ein- und Ausschlusskriterien wie genetische Merkmale oder Geschlecht sind im Projektvorschlag anzugeben. Ebenso ist die Begründung der Herkunft entweder von kommerziellen Züchtern (z.B. Tauben) oder Agrarbetrieben (z.B. Hühner, Schweine oder Ziegen), oder bei Verwendung von Tieren aus freier Wildbahn, anzugeben.

Weiters sollten Tiere mit **Stereotypien, Tiere die besonders aggressiv, gestresst oder ängstlich sind, sich isolieren oder apathisch wirken** ausgeschlossen werden, sofern stressmindernde oder ähnliche Maßnahmen keine Verbesserungen bringen bzw. eine nicht-experimentelle Verwendung nicht möglich oder sinnvoll ist (Organentnahme etc.).

2.2 Pilotstudien und Milestones

Nicht immer ist bei der Projektplanung absehbar, einerseits welche Belastungen bei den Tieren auftreten könnten, und andererseits, welche Erkenntnisse gewonnen werden könnten. Dies kann beispielsweise der Fall sein, wenn ein neues Tiermodell phänotypisiert, oder eine neue Methode etabliert werden soll. Hier ist es sinnvoll eine Pilotstudie mit einer geringen Anzahl an Tieren zu beantragen, oder einen (neuen) Versuchsablauf in Milestones zu unterteilen, die einzeln analysiert und evaluiert werden.

Durch das „kleinere“ Design (kleinere Kohorten, kompaktere Versuchsabläufe, überschaubarere Ziele) soll ermöglicht werden, sowohl die Belastung der Tiere als auch Probleme (z.B. betreffend Logistik, Dosierungen, Konzentrationen, Untersuchungs- oder Applikationszeitpunkte ...) während des Versuchs besser und schneller abzuschätzen bzw. aufzuzeigen, und für anschließende, größere Studien zu optimieren. Hierzu sind folgende Punkte zu berücksichtigen:

- Sind allen beteiligten Mitarbeiterenden die Versuchsabläufe klar und ist das Know-How und Equipment vorhanden, um diese adäquat durchführen zu können?
- Sind die ausgewählten Tiere, Versuchsabläufe und Modelle für das Projekt geeignet (Vgl. Ausschlusskriterien)?

- Ist das Studiendesign geeignet, die gewünschten Daten zu liefern? Sind die gewählten Parameter gut und objektiv messbar, und wenn ja, wie? Wie oft wird gemessen, und von wem?
- Wo und wann müssen Interventionspunkte gesetzt werden? Sind diese effektiv genug? Wann ist mein experimenteller Endpunkt erreicht?
- Gibt es (unvorhergesehene) adverse Effekte? Wie geht man damit um?
- Sind die gewählten Abbruchkriterien effektiv?

Die aus einer Pilotstudie gewonnenen Erkenntnisse sollen vor allem dazu beitragen, sowohl das Tierwohl, als auch die Versuchsdurchführung zur Erzielung des größtmöglichen Erkenntnisgewinns zu optimieren.

2.3 Der Tod als Endpunkt (Mortalität)

Einzelne Projekte bzw. Tierversuche erfordern den Tod des Versuchstieres als Endpunkt. Dennoch sollte gerade der „spontane“ Tod von Versuchstieren im Experiment vermieden werden, da dieser meist mit vermeidbarem Leid einhergeht.

Im TVG 2012 steht dazu folgender Satz: „Der Tod ist als Endpunkt eines Tierversuchs möglichst zu vermeiden und durch frühe und möglichst schmerzlose Endpunkte zu ersetzen.“ Der Tod als Endpunkt ist nicht nur aus ethischen, sondern auch aus wissenschaftlichen Gründen fragwürdig. So ist bei Auffindung toter Tiere im Käfig weder der genaue Zeitpunkt, noch die genaue Ursache bekannt. Außerdem stehen die aufgefundenen Tiere weder für Blut-, Gewebe- und Organentnahmen, noch für viele andere Untersuchungen wie Zytokin-, Antikörperbestimmungen oder Messung von Pathogenkonzentrationen zur Verfügung. Letztendlich sollte aus jedem verwendeten Tier so viel wissenschaftlich sinnvolle Information gewonnen werden, wie möglich. Soll aus wissenschaftlichen Gründen der Erkenntnisgewinn maximiert und aus ethischen Gründen das Leiden der Tiere minimiert werden, ist „spontane“ Mortalität auf Grund des Versuchs möglichst zu vermeiden (Franco et al., 2012).

2.4 Wie human ist der Endpunkt (Präfinalität, moribund)?

Aus oben genannten Überlegungen sollte bei absehbarem Tod - also Präfinalität – das Tier zeitnah und fachgerecht euthanasiert werden. Die wissenschaftlichen Informationen, die von einem hochgradig moribunden Tier noch gewonnen werden können, sind nur bedingt verlässlich und reproduzierbar (Olsson et al., 2019; Rita A Trammell and Linda A Toth, 2011; Toth, 2000). Für die Formulierung von Abbruchkriterien sollte daher für jeden einzelnen

Tierversuch erwogen werden, welche Belastungen für die Tiere aufgrund der experimentellen Interventionen zu erwarten und für das Erreichen des Projektzieles unvermeidbar sind.

2.5 Festlegen von Abbruchkriterien

Im Rahmen der Projektplanung sollte eine Liste an möglichen Belastungsmerkmalen (Identifikation) erstellt und danach deren Ausmaße (Charakterisierung) in Übereinstimmung mit dem Schweregrad festgelegt werden. Weiters sollte geplant werden, wie die Abbruchkriterien anzuwenden sind (z.B. wann, wie oft und wie lange beobachtet wird) und wie sie für alle Projektmitarbeitenden vereinheitlicht werden können (Objektivierung siehe Punkt 3.1).

- i. **artspezifisch** Bei der Formulierung der Abbruchkriterien müssen artspezifische Eigenheiten berücksichtigt werden. Das Abbruchkriterium "Gewichtsverlust > 20%" eignet sich gut für adulte Mäuse, nicht jedoch beispielsweise für Mastschweine. Diese nehmen bei entsprechendem Futterangebot stark an Gewicht zu und daher wäre bereits eine geringere Gewichtszunahme als vorgesehen schon ein Hinweis auf eine Belastung.

Auch wenn Nager am häufigsten als Versuchstiere verwendet werden, gilt das Kriterium „artspezifisch“ besonders für andere Tiere wie z. B. Fische oder Amphibien.

Belastungsmerkmale für diverse Spezies sind in einer Stellungnahme der GV-SOLAS gesammelt (Dülsner et al., 2020). Beispiele für Kriterien von Belastungen bei Fischen sind in den Tabellen 11a und 11b gesammelt.

- ii. **Projektspezifisch** In jedem Fall sind Abbruchkriterien nicht nur an die Tierart, sondern auch an das Projekt anzupassen. Pauschales Übernehmen von standardisierten Abbruchkriterien oder vorgefertigten Maximallisten sollte in jedem Fall vermieden werden. Zum Beispiel verlieren alte Tiere an Gewicht, Muskelsubstanz, Beweglichkeit, Haltung und Pelzbeschaffenheit. Dies bedeutet jedoch nicht unbedingt, dass sie leiden. Tiere mögen alt, gebrechlich und fragil (*frailty*) sein, aber nicht unbedingt krank und leidend. Hier müssen die Abbruchkriterien angepasst werden und es muss genau überlegt werden, wie fragil Tiere werden sollen oder müssen, um die erforderlichen wissenschaftlichen Erkenntnisse zu erlangen und ab welchem Zustand die Tiere zu leiden beginnen (Ray et al., 2010; Trammell et al., 2012).

Sollten dennoch nicht-projektrelevante Probleme unerwartet auftreten, liegt es in der Verantwortung der Projektleitung entsprechend einzugreifen und unnötiges Leid zu vermeiden.

- iii. **experimentsspezifisch** Viele Projekte umfassen nicht nur ein Experiment (Tierversuch), sondern viele und auch sehr unterschiedliche Experimente, die mit unterschiedlichen

Schweregradzuordnungen einhergehen. Auf diese Vielfältigkeit muss auch bei der Formulierung der Abbruchkriterien eingegangen werden. Dies erfordert eine genaue Kenntnis des Tiermodells, Unterscheidungen zwischen akuten und chronischen Versuchen, Berücksichtigung von Genetik, Alter und zahlreicher anderer Faktoren. Bei einzelnen Experimentbeschreibungen im Projektvorschlag sollten spezifische Abbruchkriterien formuliert werden. Später im Text müssen nur noch solche, für das ganze Projekt geltende, gelistet bzw. Verweise angeführt werden. Zum Beispiel sollten allgemeine Abbruchkriterien wie Gewichtsabweichungen experimentsspezifisch angepasst werden: Angaben wie 20% Gewichtsverlust müssen mit einem Vergleichsgewicht/Ausgangswert, Häufigkeit der Messung oder Beobachtungszeitraum des Gewichtsverlusts in Zusammenhang gebracht werden.

- iv. ***schweregradspezifisch*** Die Abbruchkriterien dienen nicht dazu, moribunde Tiere von ihrem Leid zu erlösen, sondern viel mehr dazu, Schmerzen, Ängste und Leiden auf das für das Erreichen des Projektzieles notwendige Maß zu beschränken oder gänzlich zu vermeiden. Sie müssen daher mit den Schweregradzuordnungen übereinstimmen (Keubler et al., 2020).

Dies ist am einfachsten beim Schweregrad „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“ (kWL). Hier müssen alle Eingriffe und Messungen bzw. Interventionen am Tier in Narkose erfolgen. Nachdem diese abgeschlossen sind und sich das Tier noch in tiefer Narkose befindet, können Tötungsmaßnahmen und abschließende Maßnahmen eingeleitet werden.

Die Abgrenzung der Schweregrade „gering“, „mittel“ und „schwer“ voneinander erfordert genaue Beobachtung. Es muss daher festgelegt werden, wie und wie oft die Versuchstiere beobachtet werden. Bei höheren Schweregraden ist das Formulieren und Feststellen des Erreichens der Abbruchkriterien oft leichter, da die zu beobachtenden Merkmale offensichtlicher sind und es den Tieren schwerer fällt, diese zu verbergen.

Ein Vergleich mit den Definitionen der Schweregrade im § 3 TVG 2012 ist immer sinnvoll. Zusätzlich können die Beispiele aus dem Anhang VIII der Richtlinie 2010/63/EU helfen einzelne Tierversuche Schweregraden zuzuordnen. Hilfestellung bei der prospektiven und retrospektiven Zuordnung des Schweregrades können Stellungnahmen der Kommission (BMBWF Referat V/3b - Tierversuchswesen und Gentechnik) und das Working Document on a Severity Assessment Framework helfen. Letzteres enthält hypothetische, aber realistische Beispiele, um ein Projekt und einzelne Tiere den verschiedenen Schweregraden zuzuordnen.

Besonderes Augenmerk soll auf Abbruchkriterien in Projekten mit dem Schweregrad „gering“ gelegt werden, da hier eine Belastung oft noch nicht mit metrischen Mitteln zu

messen ist und an subtileren Merkmalen (verändertem Verhalten/Verhaltensparametern) festzustellen ist. Beispiele sind in den Tabellen 2a und 2b angeführt.

2.6 Unterstützende Maßnahmen und Abbruchkriterien

Beim Erstellen von Abbruchkriterien ist gleichzeitig zu überlegen, ob präventive Maßnahmen getroffen werden können, damit die Abbruchkriterien gar nicht zur Anwendung kommen müssen. Eine Verpflichtung, die Belastung für die Tiere auf das notwendige Minimum zu beschränken, ergibt sich aus den 3R Prinzipien, sowie den gesetzlichen Vorgaben. Es sollten hier zusätzliche Maßnahmen überlegt werden, die über die standardisierte und sorgsame Pflege hinausgehen, wie z.B. unterstützende Maßnahmen bei operativen Eingriffen oder postoperativer Pflege. Es sollten konkrete Überlegungen angestellt werden, wie das Schlagend werden der Abbruchkriterien vermieden oder reduziert werden könnte. Dies wäre im Sinne der Erreichung des Projektzieles, da die Versuchstiere eventuell länger zur Verfügung stehen und mehr und bessere Daten liefern könnten. Ein konkretes Beispiel soll dies erläutern: Bei viralen Infektionen zeigen Mäuse im Versuch oft einen starken Verlust an Körpergewicht,

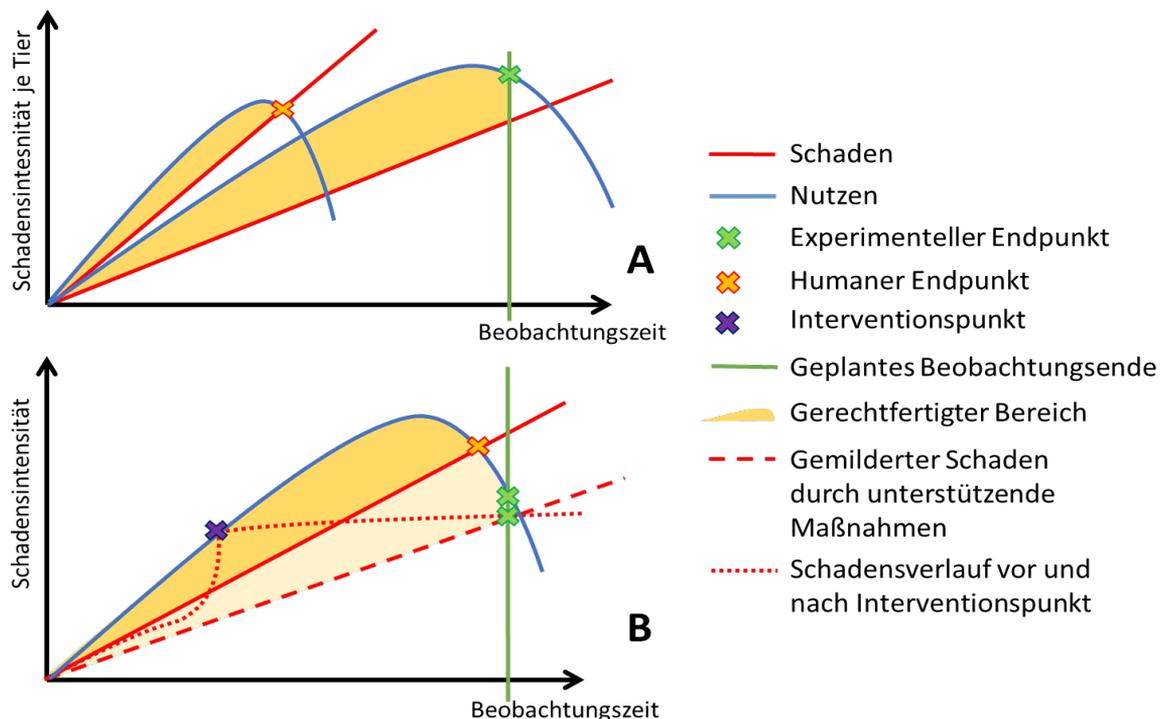


Abbildung 2: Fiktive Versuchsabläufe mit unterschiedlichen Szenarien

A) Beispielhafte Illustration des unterschiedlichen Schaden-Nutzenverlaufs an zwei fiktiven Tieren; für die Dauer des Versuchs muss der Nutzen den Schaden überwiegen; wenn dies vor geplantem Versuchsende nicht mehr gegeben ist, muss ein humaner Endpunkt gesetzt werden;

B) Beispielhafte Illustration der Auswirkung von unterstützenden Maßnahmen oder Intervention; durch unterstützende Maßnahmen oder Interventionen kann der Schaden im Versuchsverlauf gemindert und der humane Endpunkt durch einen experimentellen Endpunkt ersetzt werden.

vermindertes Allgemeinverhalten oder veränderte Körpertemperatur. Diese Symptome können abhängig vom Erreger nur temporär sein. Die infizierten Tiere verbrauchen viel ihrer Energie für die Arbeit ihres Immunsystems, die sie nicht für Temperatur- und Gewichtshomöostase verwenden können. Unterstützende prospektive oder zeitgerechte Maßnahmen, wie zusätzliche Wärmequellen, energiereiches Futter oder eine medikamentöse Behandlung können daher die Belastungsintensität bzw. –dauer möglicherweise verringern oder vermeiden.

2.7 Unvorhergesehene Ereignisse und Abbruchkriterien

Bei unvorhergesehenen Ereignissen ist zu klären, ob sie projektbezogen sind, oder nicht. Wenn tote Tiere im Käfig vorgefunden werden, ist eine Abklärung der Ursachen z.B. durch eine Nekropsie immer sinnvoll, um einen Zusammenhang mit dem Tierversuch festzustellen oder auszuschließen. Beispielsweise können Belastungen durch Fehlfunktionen und Defekte von Geräten oder von Krankheiten und Infektionen verursacht werden, die nicht auf den Tierversuch zurückzuführen sind. Ist ein Zusammenhang mit dem Tierversuch nicht auszuschließen, muss effektive Abhilfe überlegt werden (Einstellung des Projektteils, Änderung des Versuchsprotokolls, Verschärfung der Beobachtungsstrategien und Abbruchkriterien oder/und Erhöhung der Schweregradzuordnung des Projektes). Unerwartet auftretende tote Tiere sind immer ein Verlust für das Projekt, und da das nachträgliche Entwickeln von Abhilfen zu Verzögerungen führt, ist es im Interesse des Projektverantwortlichen, diesem Verlust bereits durch gründliche Planung (z.B. Pilotversuche) entgegenzuwirken.

Vereinzelte Fälle von Bisswunden bei Mäusen fallen nicht darunter, da mit diesen auch in der nicht-experimentellen Haltung zu rechnen wäre und deren Versorgung im regulären Tierstall-Management geregelt sein sollte. Dies wäre dann nicht unter dem Punkt „Abbruchkriterien“ anzuführen. Bei gehäuften Fällen sollte jedoch eine mögliche Ursache abgeklärt werden und z.B. Haltungsdefizite oder genetische Komponenten ausgeschlossen werden.

Ebenso sollte das Entstehen von Tumoren unter Abbruchkriterien sinnvollerweise nur dann angeführt werden, wenn sie projektspezifisch zu erwarten sind. Spontane Tumore können bei einigen Inzuchtmauslinien auftreten und sind für das Projekt meist nicht relevant. Manche Linien wurden speziell dafür selektiert, die Häufigkeiten sind bekannt (MGI-Datenbank) und gelten als Schwelle. Bei neuen, zu etablierenden Modellen sollen solche Auffälligkeiten im Rahmen der Schweregraderfassung berücksichtigt und untersucht werden. Sind Schwellenwerte bekannt, ist keine Abklärung erforderlich, solange diese nicht überschritten werden.

Ein Beispiel für ein beim Tier selten auftretendes Verhaltensphänomen, das jedoch auf standardisierten Score Sheets häufig zu finden ist, ist die Automutilation. In Projekten mit

chirurgischen Eingriffen - vor allem am Nervensystem - wäre es möglich, dass vereinzelt Tiere an Operationswunden kratzen oder nagen, aber auch dies ist bei adäquater Operationstechnik und adäquatem Schmerzmanagement nicht häufig oder generell zu erwarten. Daher sollte Automutilation nicht automatisch in die Liste der Abbruchkriterien, eventuell aber in „Animal Welfare Assessment Sheets“ gelistet werden (Beispiel dazu siehe Tabelle 6). Bei Beobachtung muss die Ursache unbedingt abgeklärt werden.

Begriffserklärung:

Als **Automutilation/Selbstverletzung** (engl. self-mutilation, self attack, autotomy) wird ein Verhalten bezeichnet, das vorrangig bei Nagetieren beobachtet wird. Dabei werden Gliedmaßen von proximal (rumpfnah) benagt oder auch so lange gekratzt, bis die Haut Verletzungen aufweist. Es wurde gezeigt, dass die Inzidenz des Verhaltens art-, stamm-, und geschlechterspezifisch unterschiedlich sein kann. Das Verhalten tritt durchschnittlich vier Wochen nach einer Nervenverletzung auf (Vatine et al., 2000; Weber et al., 1993).

Die Ursache für Automutilation der Gliedmaßen wird diskutiert. Einerseits werden unangenehme und teilweise schmerzhaft gefühlte durch eine abnormale Impulsaktivität nach chronisch verletzten Nerven angenommen (Wall et al., 1979), andererseits wird das Verhalten als Neigung bestimmter Spezies interpretiert, ein funktionell beeinträchtigtes und gefühlloses Anhängsel abzustoßen (Rodin & Kruger, 1984).

Wenn selbstverletzendes Verhalten beobachtet wird und die eingeleiteten Maßnahmen zu keinen Verbesserungen führen, kann also davon ausgegangen werden, dass langanhaltende mittelstarke Schmerzen, mittelschwere Leiden oder Ängste oder schwere Beeinträchtigungen des Wohlergehens oder des Allgemeinzustands des Tieres aufgetreten sind. Damit wäre die Angabe dieses Kriteriums prospektiv mit einem Schweregrad von „schwer“ zu beurteilen.

2.8 Kombination von Abbruchkriterien

Publikationen zeigen, dass die Kombination zweier oder dreier Abbruchkriterien wesentlich prädiktiver und zu einem früheren Zeitpunkt hilfreich sein kann, als die einzelnen Endpunkte für sich (Hankenson et al., 2013; Takayama-Ito et al., 2017). Eine Validierung von Endpunkten sollte daher auch die Kombination von Endpunkten untersuchen und bei der Gewichtung berücksichtigen.

2.9 Kumulative Belastung und Abbruchkriterien

Versuchsprotokolle können eine ganze Reihe unterschiedlicher Eingriffe enthalten. Bei der Abschätzung der gesamten Belastung spielen die **Invasivität des Eingriffs**, die **Häufigkeit** in einem bestimmten Zeitraum, die **Belastungsdauer**, die **individuelle Erholungszeit** sowie eine mögliche **Belastung durch genetische Veränderung** eine wichtige Rolle.

Zur Minimierung kumulativer Belastung sollten bereits prospektiv – im Sinne des Refinements – Überlegungen zu Alternativen angestellt werden. Zum Beispiel kann bei häufiger Verabreichung einer Substanz die Verwendung eines implantierten Dosiersystems anstatt regelmäßiger mehrfacher Injektionen überlegt werden (Bateson, 2016; Hohlbaum et al., 2017; Nunamaker et al., 2021).

Die Abbruchkriterien limitieren die mögliche Belastung. Unterschätzt man die Belastung eines Protokolls mit mehrfachen Eingriffen, besteht das Risiko, dass Tiere früher aus dem Projekt genommen oder euthanasiert werden müssen. In manchen Projekten ist ein Pilotexperiment (siehe Punkt 2.2) mit einer kleinen Anzahl jener Tiere, die man als die Empfindlichsten (jene Kohorten oder Genotypen, bei denen die stärksten Auswirkungen zu erwarten sind) einschätzt, anzuraten. Falls notwendig, kann ein Projekt noch angepasst werden (Achtung: entsprechende Änderungen müssen beantragt werden!), bevor man mit dem eigentlichen Versuchsteil beginnt.

Ein weiterer Ansatz kann die Festlegung von „worst case scenarios“ sein. Dabei wird festgelegt, wie oft ein Tier maximal für einen Teilversuch verwendet werden soll (z.B. in einer Testbatterie von Verhaltenstests oder wie oft es bei wiederholten bildgebenden Verfahren maximal in Narkose gelegt wird) wie im Beispiel der Tabelle 3 aufgelistet. Hier wird also die Gesamtbelastung eines Versuchsprotokolls auf mehrere Tiere verteilt. Stopp- oder Terminationskriterien werden in den Tabellen 5 und 12 zugewiesen.

3. Score Sheets

3.1 Objektivierung von Abbruchkriterien – wie wird die Belastung gemessen?

Damit humane Endpunkte wirksam sein können, müssen sie klar definiert sein und auf objektiven Kriterien beruhen (siehe dazu auch Webseiten wie: <https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/humane-endpoints>). Das soll bedeuten, dass sie in einem Experiment von allen am Projekt beteiligten Personen für alle Tiere gleich angewendet werden sollen. Ein Kriterium ist dann objektiv, wenn die Beurteilung bei allen Personen zum gleichen Ergebnis führt und unabhängig von der Sicht, Meinung, Erfahrung oder Interpretation des Beurteilenden ist.

Dies bedeutet, dass alle Projektmitarbeitenden entsprechend informiert und geschult sein müssen. Es müssen eindeutige Kennzeichen vorliegen oder zahlenmäßig klare Grenzwerte definiert sein. Das der Tierart entsprechende Aktivitätsfenster, in welchem geänderte Verhaltensweisen am eindeutigsten beobachtet werden können, ist gelegentlich nicht immer durchgehend möglich. Beispielsweise sind manche Versuchstierarten nachtaktiv.

Endpunkte sollen (idealerweise), abhängig vom Versuch, folgende Kriterien erfüllen (siehe auch <https://www.humane-endpoints.info/de/entwicklung-und-validierung>):

- reproduzierbar, relevant (äquivalent) und zuverlässig (wenig Variation)
- einfach überwachbar und nicht arbeitsintensiv
- rechtzeitig / frühzeitig eine Verschlechterung erkennen; eine Schweregradüberschreitung oder ein tödlicher Verlauf sollte damit vermeidbar sein
- wirkungsvoll: maximale Reduktion von Schmerzen und Belastung gewährleisten.

Versuchsabhängig können jedoch durchaus komplexere oder aufwendiger zu ermittelnde Endpunkte sinnvoll sein (z.B. wenn ohnehin im Projekt Blutentnahmen vorgesehen sind, können ev. aussagekräftige Parameter zur Feststellung einer möglichen Belastung miterfasst werden). Manchmal haben solche Endpunkte sogar entscheidende Vorteile (siehe auch weiter unten), wie Objektivität, Spezifität, frühe Anwendbarkeit und höhere Aussagekraft.

Konkret sind folgende drei praktische Schritte zu durchlaufen, um geeignete humane Endpunkte bestimmen zu können:

1. objektive Definition und Darstellung der Anzeichen und Symptome bei Schmerzen, Leiden und Ängsten während des Tierversuchs
2. Selektion in Bezug auf die Signifikanz dieser Anzeichen und Symptome

3. Sicherstellung des wissenschaftlichen Werts (erfüllt in großem Umfang die oben genannten Kriterien).

Begriffserklärung

Typen humaner Endpunkte: Für die Feststellung eines humanen Endpunkts können verschiedene Arten von Merkmalen verwendet werden. **Metrische Merkmale** sind solche, die sich messen lassen (z.B. Körpergewicht und -temperatur) und haben den Vorteil, dass sie unabhängig vom Experimentierenden oder dem Versuchstier sind. **Parametrische Merkmale** sind solche, die sich nur in ja/nein Unterscheidungen, eventuell in Abstufungen, festlegen lassen.

Endpunkte lassen sich in folgende Kategorien unterteilen:

klinische Symptome (z. B. Tumorbildung)

pathophysiologische Veränderungen (z. B. Gewichtsverlust)

Verhaltensänderungen (z. B. Apathie)

biochemische Veränderungen (z. B. Insulinresistenz)

hormonelle Veränderungen (z. B. Stresshormon)

Entwicklungen im Bereich humaner Endpunkte richten sich hauptsächlich danach, das Auftreten von Schmerzen bzw. Belastung auf ein Minimum zu reduzieren oder selbst ganz auszuschließen.

Präklinische humane Endpunkte – Darunter wird die Verwendung verstanden, bevor Schmerzen und/oder Belastung /Unbehagen auftreten.

Dabei kann an die Verwendung molekularbiologischer Techniken, wie z. B. Transkriptomik oder Proteomik, oder nichtinvasiver Messmethoden, z.B. Ultraschalluntersuchungen oder andere Bioimagingmethoden, gedacht werden.

Nichtklinische humane Endpunkte – Hier werden Endpunkte verwendet, bevor klinische Symptome auftreten oder bevor sie Belastungen verursachen.

Bei nichtklinischen Endpunkten ist das Verfahren im Experiment, das schließlich zu klinischen Symptomen führen wird, durch ein Verfahren ersetzt worden, das nicht zu klinischen Symptomen führt, wie z.B. die serologische Prüfung eines Impfschutzes oder nach der Verabreichung von Endotoxinen.

3.2 Welfare Assessment vs. Abbruchkriterien (aka. Score Sheet vs. Score Sheet)

Grundsätzlich kann die Verwendung von Score Sheets bei der Evaluierung der Abbruchkriterien hilfreich sein, jedoch sollte darauf geachtet werden, dass eine projekt- und experimentspezifische Anpassung erfolgt. Um die Vielfalt solcher Evaluierungstools zu veranschaulichen, sind hier ein paar ausgewählte Beispiele gelistet.

„**Animal Welfare Assessment Sheets**“ (Beispiel dazu siehe Tabelle 6) sollten als **Ergänzung** zu „humane endpoint Score Sheets“ dienen, welche mit dem dezidierten Ziel konzipiert wurden, Endpunkte festzulegen, dem Projekt angepasst sind und konkrete Maßnahmen bzw. Aktionen

enthalten (Beispiel siehe Tabelle 15). Sie ersetzen daher keinesfalls projekt- oder experimentbezogene Abbruchkriterien.

Begriffserklärung

Score Sheets, Belastungstabellen, Care Sheets, Welfare Assessment Sheets und Maximallisten: Viele Projektanträge beinhalten Checklisten, in denen beobachtbare Parameter Punkten oder Kategorien zugeteilt und daraus folgende Maßnahmen festgelegt werden. Auch wenn solche Tabellen sich gut zur Objektivierung und Visualisierung eignen mögen, muss dennoch zwischen versuchs- oder projekt-spezifischen (humane endpoint) Score Sheets oder Belastungstabellen, die konkrete Ziele und Maßnahmen beschreiben, und allgemeinen Listen, die eine Fülle an beobachtbaren Parametern, verschiedene Belastungslevels und mögliche Interventionen beinhalten, unterschieden werden. Letztere werden zur Differenzierung oft als Care oder Welfare Assessment Sheets oder Maximallisten bezeichnet. Diese können und sollen versuchs- oder projekt-spezifische (humane endpoint) Listen und Tabellen nicht ersetzen. Allgemeine Listen und Tabellen können als Ergänzung gesehen werden, die projektunabhängige Belastungen, beispielsweise infolge unvorhergesehener Ereignisse, beschreiben und diese einem Belastungslevel zuordnen.

Grimace Scales und **Body Condition Scoring** können helfen, die aktuelle Belastung eines Tieres auch versuchsunabhängig einzuschätzen (siehe dazu Tabellen 9, 10 und 14). Grimace Scales brechen die Mimik von Versuchstieren in leicht beobachtbare Parameter herunter, die vergleichsweise objektiv zu beurteilen sind. Anhand der Stellung der Ohren oder Tasthaare wird beispielsweise evaluiert, ob das Tier Unwohlsein, Angst oder Schmerzen erfährt. Die Techniken sind leicht zu erlernen und anzuwenden. Beim Body Condition Scoring wird das Tier von oben betrachtet und gewichts-unabhängig ermittelt, wie stark bemuskelt, abgemagert oder fettleibig ein Tier ist. Dies kann beispielsweise bei Diät- oder Tumorstudien aussagekräftigere Ergebnisse als das Körpergewicht liefern. Beide Techniken sind für eine Reihe von Versuchstierarten erprobt und anwendbar (Tabellen 9 und 10).

Eine Möglichkeit der Umsetzung wäre, das Projekt in mehreren Tabellen darzustellen. In einer ersten Tabelle (siehe Tabelle 3 oder Tabelle 4 für Großtiere) werden alle Manipulationen, nach Projektteilen oder -zielen geordnet, gelistet, und mit Stopp-, Terminationskriterien und Schweregradbeurteilungen versehen. In der zweiten Tabelle (Tabelle 5 bzw. auch Tabelle 12) werden die Stopp- und Terminationskriterien gelistet und erklärt (Kontext, Beschreibung und geforderte Maßnahmen). Diese Vorgangsweise ermöglicht einen sehr guten Überblick über ein Projekt und der damit verbundenen Belastung für die Tiere, da sich eventuell noch vorhandene Lücken und Belastungen, die individuelle Tiere in einzelnen Kohorten erfahren (kumulative Belastungen und „worst case“ Szenarien), deutlich darstellen. Dies ist nicht nur bei der Projektbeurteilung im Genehmigungsverfahren von Vorteil, sondern für alle am Projekt Beteiligten. In der ersten Spalte werden also Projektteile, Projektziele oder einzelne Fragestellungen gelistet. In der zweiten Spalte werden alle damit verbundenen Manipulationen und Eingriffe gelistet. In der dritten und vierten Spalte wird auf die dazugehörigen Stopp- und Terminationskriterien verwiesen und in der fünften, sechsten und siebenten Spalte werden die Schweregradbewertungen für den jeweiligen Eingriff, deren

Dauer und deren Häufigkeit angegeben. Eine achte Spalte kann dann die Schweregradbeurteilungen für die einzelnen Kohorten und Projektteile beinhalten und ganz unten rechts den daraus hervorgehenden und für das Projekt vorgeschlagenen Schweregrad.

Die zweite Tabelle enthält dann die Listung und Erklärung der einzelnen Stopp- und Terminationskriterien (Tabelle 5 und Tabelle 12). Die Unterscheidung von Stopp- und Terminationskriterien ist ebenfalls sinnvoll. Sie verdeutlicht, wann eine rechtzeitige Intervention zu erfolgen hat, um die Belastung einzugrenzen, sodass der Schweregrad nicht überschritten wird und dass oft ein Tier noch weiterverwendet werden kann (in einem anderen Experiment oder weil die Intervention erfolgreich war). Manche Versuche erfordern nur Stoppmaßnahmen (z.B. Schwimmtests), bei anderen sind die Stoppkriterien auch die Terminationskriterien, da keine anderen geeigneten Maßnahmen möglich sind, um eine steigende Belastung zu vermeiden. In den meisten Fällen verdeutlicht dieses Vorgehen jedoch einen Zeitraum, in dem aktiv gegengesteuert werden kann. Der größte Vorteil für die Tiere und alle Projektbeteiligten liegt bei dieser Projektdarstellung aber darin, dass Belastungsgrenzen, Interventionen und unterstützende Maßnahmen schon während der Projektplanung bedacht, festgelegt und deutlich zugeordnet werden.

3.3 Überwachungszeitpunkte und Zeitplan

Ein weiterer Punkt, der berücksichtigt werden muss, ist wann und wie oft Belastungen beurteilt werden sollen. Auch dies ist wiederum abhängig von der Art der Studie, und man muss ein gesundes Mittelmaß zwischen „so oft wie nötig, so selten wie möglich“ finden. Zu berücksichtigen ist, dass manche Spezies auf (wiederholte) Interaktionen mit Stress reagieren. Zeitgleich soll der Beobachtungszeitraum so engmaschig wie möglich gehalten werden, um keinesfalls etwas zu übersehen. Jedoch gilt: je schwerer die Belastung, desto häufiger sollte kontrolliert werden, besonders, wenn mit einer Verschlechterung gerechnet werden muss. Es sollte daher überlegt werden: reicht eine tägliche Sichtkontrolle? Gibt es Umstände, die es erlauben oder notwendig machen, Tiere öfters zu beurteilen? Ab wann reicht eine tägliche Kontrolle wieder aus? Bei der Beurteilung ist der Biorhythmus der zu evaluierenden Spezies zu berücksichtigen.

In jedem Fall sollten Kontrollen **schriftlich, nachvollziehbar und für alle ersichtlich** dokumentiert werden, wie beispielsweise in Tabelle 13 gezeigt. Hier werden verschiedene Parameter prä- und postoperativ beobachtet und notiert.

Automatisierte Methoden können sinnvoll sein, wenn Tiere wiederkehrend, oder sehr engmaschig kontrolliert werden müssen. Ein Beispiel hierfür ist die Überwachung von Individuen oder Käfige per Lichtschranke, Infrarot-Messgeräten oder Kameras (Thomson et al., 2019; Winn et al., 2021).

Solche Systeme eignen sich, um bereits kleine Änderungen im Verhalten zu detektieren, insbesondere da hier im Home Cage, und oft auch im normalen Gruppenverband, gemessen wird. Eine Alternative könnte hierfür sein, einen Käfigdeckel mit einer geeigneten Kamera auszustatten, und das Foto- oder Videomaterial entsprechend (mit Hilfe von Software) zu sichten (Tabelle 7).

Mit bildlichen Darstellungen des Versuchsverlaufs (beispielhaft in Abbildung 3) kann für alle Beteiligten erkenntlich gemacht werden, welche Tiere wann, warum, wie oft, und mit welchen Methoden beurteilt werden.

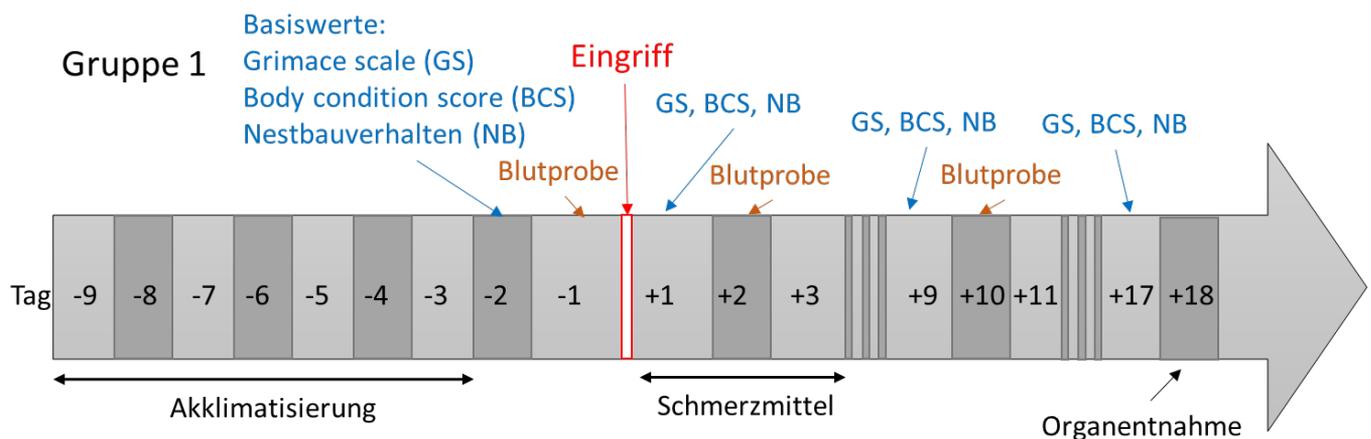


Abbildung 3: Darstellung eines Zeitverlaufs eines Experiments

Die beispielhafte Übersicht eines fiktiven Beobachtungsverlaufs zeigt bildlich und übersichtlich, welche Messungen, Beobachtungen und Eingriffe in welchen Intervallen und mit welchen Erholungszeiten durchgeführt werden (Hohlbaum et al., 2018).

3.4 Gewichtung von Abbruchkriterien

Endpunkte unterscheiden sich in Relevanz, Überwachbarkeit, Arbeitsaufwand, Reproduzierbarkeit, Zuverlässigkeit oder Prädiktivität und müssen daher entsprechend gewichtet werden. Sie unterscheiden sich aber auch in ihrer Objektivität, also ob sie gemessen werden können, oder nur auf der Beurteilung des Experimentierenden beruhen. Es ist daher wichtig, dass solche Score Sheets für verschiedene Szenarien durchgedacht werden, sodass sie für alle Szenarien konsistent und effektiv sind.

3.5 Abbruchkriterien einmal anders betrachtet

Es ist einfacher, größere Abweichungen von einem Normalzustand oder –verhalten zu erkennen, und daher solche größeren Abweichungen als Endpunkte festzulegen. Wenn man

als Abbruchkriterien hauptsächlich klinische und pathophysiologische Parameter festlegt, erhält man möglicherweise spätere und belastendere Endpunkte als z.B. mit genauer Verhaltensanalyse, mit der schon frühere, weniger belastende Veränderungen erkannt werden können (siehe auch Tabelle 2b). In vielen Projekten werden nach Versuchsende Gewebe und Organe mit medizinischer Labordiagnostik analysiert. Diese kann auch schon während des Versuchs zur Zustands- oder Verlaufsbeurteilung als Biomarker eingesetzt werden (Tabelle 8). Biomarker, deren Gewebe- oder Organspezifitäten in manchen Publikationen noch diskutiert werden, könnten für die mögliche Anwendung als humane Endpunkte bereits hilfreich sein. Auch nicht-invasive Messverfahren, wie Ultraschall oder verschiedene andere (bildgebende) Techniken, können diagnostisch eingesetzt werden, und zeigen Veränderungen oft lange bevor das Tier Verhaltensänderungen zeigt. Hier ist zu hinterfragen, ob beispielsweise eine dafür notwendige Narkose, Injektion oder sonstige Manipulation das Tier nicht zusätzlich belastet.

3.6 Body Condition Score, Grimace Scale und Pain Scale

Body Condition Scoring (BCS) ist besonders hilfreich, wenn Ereignisse, wie Tumorbildung oder Ascites, eine Einschätzung der Belastung allein über das Körpergewicht verfälschen können. Meist wird BCS bei Mäusen, selten auch bei Ratten, angewendet. Grundsätzlich kann ein BCS aber von jeder Tierärztin, jedem Tierarzt oder jeder Spezialistin und jedem Spezialisten für jede Tierart erstellt oder angepasst werden.

Beispiele für bereits veröffentlichte BCSs (zusammengefasst in Dülsner et al., 2020) sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Grimace Scales (GS) erfordern einen gewissen Lern-, Zeit- und Geräteaufwand, der aber – einmal etabliert - schnell zu akzeptablen Beurteilungen führt. Gegebenenfalls können Videoaufzeichnungen von unterschiedlichen Personen beurteilt werden, um eine Voreingenommenheit auszuschließen. Übungsmaterial wie Poster und Videos werden von der NC3R kostenlos angeboten. Mittlerweile sind Grimace Scales nicht nur für Mäuse, Ratten und Kaninchen, sondern auch für viele andere Klein- und Großtierspezies publiziert (Tabelle 9). Die Vorteile sind der relativ geringe Aufwand und dass die Beurteilung anhand von Videoaufzeichnungen vorgenommen wird, sodass die Tiere von der/dem Beurteilenden nicht beeinflusst werden. Der Nachteil ist, dass die Tiere nach einigen Tagen weniger bis gar keine Grimassen mehr zeigen. Ein Verschwinden der Grimassen bedeutet also nicht unbedingt, dass die Tiere keine Schmerzen mehr haben.

Bereits existierende Informationen zu Grimace Scales (Dülsner et al., 2020) sind in Tabelle 9 dargestellt.

Pain Scales

Es gibt derzeit keinen messbaren Parameter, der ausschließlich Auskunft über Quantität und Qualität des Schmerzes gibt. Neben der multidimensionalen Qualität des Schmerzes und dem ständigen Wechsel zwischen den Dimensionen, gibt es auch noch linien- oder rassespezifische, geschlechts- und persönlichkeitsabhängige Unterschiede der Schmerzempfindung.

Physiologische Parameter wie Blutdruck, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Körpertemperatur und Cortisol-Spiegel wurden früher oft zur Schmerzmessung herangezogen, sind jedoch nur eingeschränkt verlässlich, da sich hier auch rein aus Stress resultierende Veränderungen zeigen können; affektive und emotionale Aspekte des Schmerzes werden mit diesen Messgrößen oft nicht berücksichtigt (Tomacheuski et al., 2021). In der Praxis haben sich für die Schmerzbeurteilung Methoden bewährt, die auf der Evaluierung von Verhaltensänderungen bzw. Änderungen des Gesichtsausdrucks (Grimace Scales) basieren, die im Zusammenhang mit Schmerz entstehen („pain-related behaviour“) (Flecknell, 2023). Die Beurteilung erfolgt dabei nicht-invasiv, ohne zusätzlichem Equipment oder Manipulation und durch Beobachtung aus der Distanz (Luna et al., 2020).

Es existieren verschiedenste spezies-spezifische Pain Scoring-Systeme bzw. Instrumente zur Schmerzerfassung, die sich für verschiedenste Studien eignen (siehe auch Tabelle 9). Generell gut geeignete Kriterien zur Schmerzbeurteilung sind das Temperament, die Aktivität des Tieres, die Körperhaltung, Appetitverlust, die Reaktion auf Interaktion, Beachtung der Wunde/schmerzhaften Stelle und/oder der Gesichtsausdruck (Flecknell, 2023; Tomacheuski et al., 2021).

Eindimensionale Skalen wie die Simple Descriptive Scales (SDS), Numerical Rating Scales (NRS) und Visual Analogue Scales (VAS) haben sich für die Schmerzbeurteilung beim Tier größtenteils als weniger gut geeignet herausgestellt (Silva et al., 2020, 2022). Multidimensionale oder Multifactorial Pain Scales (MFPS) sind objektiver, umfassender, speziespezifisch und weniger beeinflusst von der Erfahrung des Beobachters oder der Beobachterin (Flecknell, 2023; Tomacheuski et al., 2021).

Schmerz an sich ist nur ein – wenn auch wichtiger – Teilaspekt der Gesundheit und des Wohlbefindens und kann daher nur einen Teil der Belastungsbeurteilung ausmachen.

Pain Scales, Klinische Evaluierungsbögen, Welfare Assessment Sheets und projektspezifische Score Sheets können, wenn sie sich gut für die Tierspezies und den speziellen Versuchsaufbau eignen, einen wertvollen Beitrag zur Belastungsbeurteilung und Schadensbegrenzung im Sinne der Abbruchkriterien leisten, jedoch basiert die beste Überwachungsstrategie auf **Erfahrung, Weiterbildung und einer guten Kooperation zwischen Tierpflegepersonal, Tierärzt/inn/en und Forschenden.**

Hinweis: Die Beschreibung von Abbruchkriterien sollte folgende Informationen beinhalten

1. die genaue **Beschreibung** des Merkmals (siehe Punkt 3.1)
2. **wie** wird beobachtet bzw. gemessen (z.B. Beobachtung, Bildgebung) (siehe Punkt 3.5)
3. wie **oft** wird beobachtet bzw. gemessen (siehe Punkt 3.3)
4. von **wem** wird beobachtet (Tierpfleger/in oder Wissenschaftler/in) (siehe Punkt 3.1)
5. mit welchem Zustand oder welcher Gruppe wird **verglichen** (z.B. Anfangsgewicht)
6. **wie lange** wird ein eingetretener Zustand beobachtet bevor eingeschritten wird (siehe Punkt 2.5/2.6)
7. **welche Maßnahmen** werden getroffen (siehe Punkt 2.6)
8. werden Merkmale bei gemeinsamem Auftreten **unterschiedlich gewichtet** (z.B. Körpergewicht und Temperatur) (siehe Punkt 3.4)

4. Evaluierung der Abbruchkriterien

4.1 Evaluierung und Verfeinerung

Die gewählten Abbruchkriterien sollten, sowohl während als auch am Ende eines Projektes analysiert, evaluiert und gegebenenfalls angepasst werden. Verbesserungen und Verfeinerungen sollten jedenfalls in zukünftige Projekte miteinfließen und müssen auch in rückblickenden Bewertungen dargestellt werden. Die im Projekt vorgeschlagenen und angewandten Abbruchkriterien sollen kritisch hinterfragt werden und dazu unter anderem folgende Punkte beantwortet werden:

- Welche Endpunkte wurden erreicht? Welche Beobachtungen wurden dazu gemacht?
- Stimmen der erwartete und der tatsächlich aufgetretene Schweregrad überein?
- Waren die Abbruchkriterien und Überwachungsintervalle richtig gewählt? Wenn nicht, welche Endpunkte und/oder Beobachtungszeitpunkte wären besser geeignet?
- Wäre es sinnvoll, für bestimmte experimentelle Gruppen weitere/andere Abbruchkriterien zu wählen?
- Waren die verwendeten Hilfsmittel zur Überwachung, Bewertung und Erfassung der Endpunkte (Score Sheets etc.) geeignet?

Die rückblickende Analyse der Abbruchkriterien dient zusätzlich auch der Sicherstellung des wissenschaftlichen Werts der gewählten Abbruchkriterien und bestärkt damit das Vertrauen in die erhobenen bzw. künftig zu erhebenden Daten (vgl. moribunde oder stark belastete Tiere). Solche Analysen der Endpunkte können unerwartete Ergebnisse und Erkenntnisse zu Reproduzierbarkeit, Relevanz, Voraussagekraft und Zuverlässigkeit bringen. Diese können ihrerseits dazu führen, dass Abbruchkriterien neu gewichtet werden oder in Kombination anstatt einzeln angewendet werden. Damit können eventuell auch Pflegeaufwand und –kosten und das Risiko von verlorenem Gewebe- oder Datenmaterial, verringert werden.

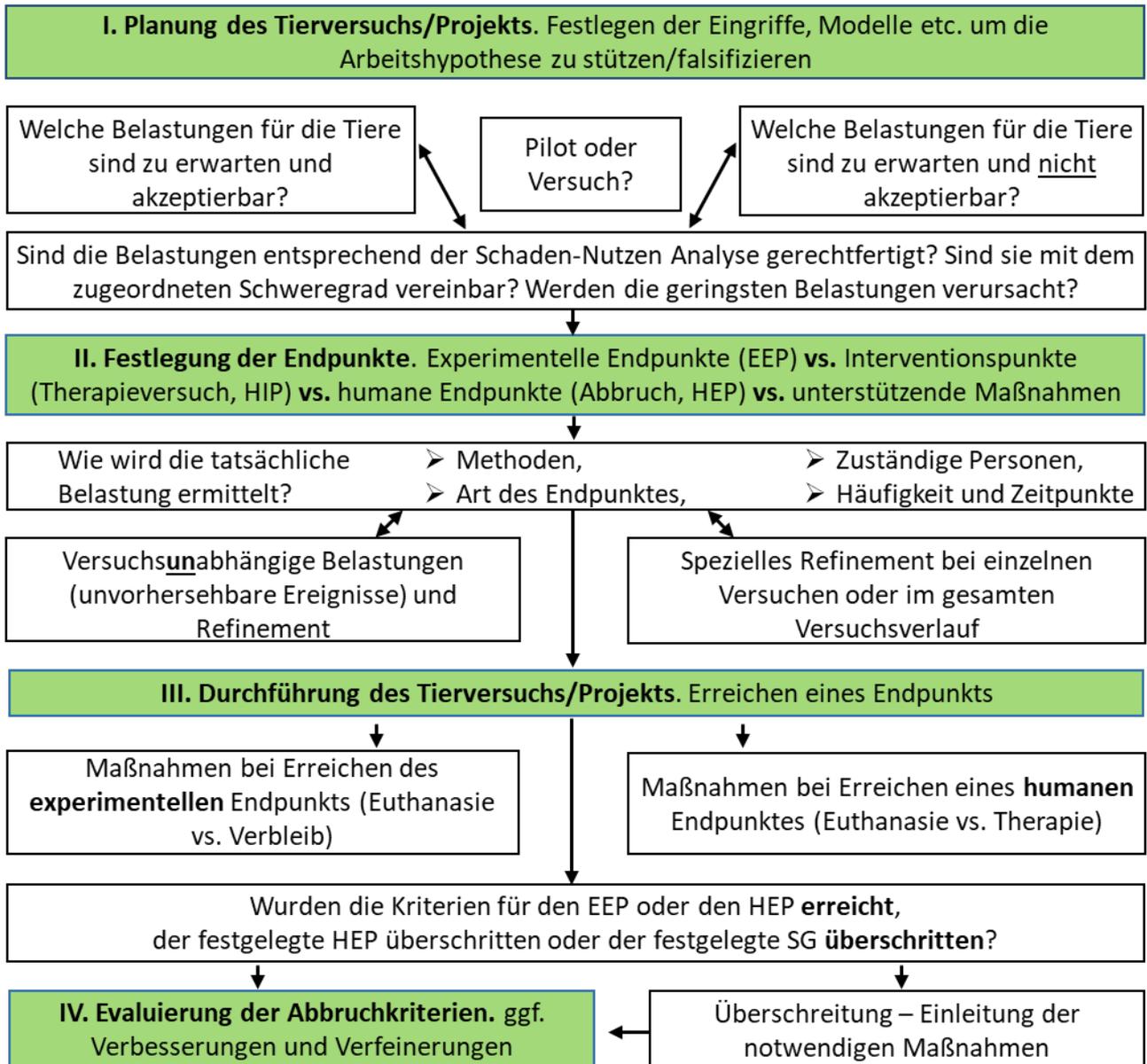


Abbildung 4: Übersicht und Planungshilfe zur Auswahl bzw. Anwendung von geeigneten Endpunkten für und während eines Pilot- oder Tierversuchsprojekts mit anschließender Evaluierung.

EEP: Experimenteller Endpunkt; HIP: Humaner Interventionspunkt, Stoppkriterium;

HEP: Humaner Endpunkt, Terminationskriterium; SG: Schweregrad

4.2 Vorgangsweise bei Überschreitung

Trotz sorgfältiger Planung ist es nicht auszuschließen, dass man während eines Tierversuchs oder eines Projekts feststellt, dass die festgelegten Endpunkte oder Schweregrade überschritten wurden. In einem solchen Fall sollte rasch und pro-aktiv reagiert werden. Einrichtungen können hierzu eigene Richtlinien und Abläufe festlegen. Unabhängig davon sollten aber einige Maßnahmen jedenfalls ergriffen werden, die anschließend erläutert werden.

Grundsätzlich können zwei Szenarien projekt-bezogener Überschreitungen unterschieden werden:

Wird während des Versuches eine Überschreitung des festgelegten Humanen Endpunkts **ohne** Überschreitung des Schweregrads festgestellt, so sollte der Tierversuch gegebenenfalls unterbrochen oder beendet werden. Eine genaue Beobachtung, Protokollierung und weitere Ursachenforschung sind unerlässlich. Abhängig von der Häufigkeit und Art der Abweichungen ist eine Beratung mit dem benannten Tierarzt oder der Tierärztin und dem Tierschutzgremium erforderlich, um mögliche Maßnahmen einzuleiten, die später auch evaluiert werden sollten. Auch die Belastungsermittlung sollte überdacht werden (Beobachtungszeitpunkte, -frequenz und -methoden adäquat usw.). Kann eine erneute Überschreitung des Endpunktes nicht ausgeschlossen werden, ist der Endpunkt nicht effektiv genug und eine Änderung der Projektgenehmigung unter Anpassung der Endpunkte ist erforderlich.

Sollte es zu einer Überschreitung des Humanen Endpunkts **und** des festgelegten Schweregrads kommen, müssen das Tierschutzgremium und der zuständige Tierarzt oder die zuständige Tierärztin verständigt werden. Zusätzlich zu den bereits oben erwähnten Maßnahmen muss auch eine Abänderung des Projektantrages erfolgen, sofern die nicht erwartete, höhere Belastung unvermeidbar ist. Die Schweregrade und damit auch die Schaden-Nutzen-Analyse, ebenso wie die Abbruchkriterien und Endpunkte müssen in einem solchen Fall analysiert, neuerlich definiert und begründet werden. Auch die Beobachtungsstrategien, -methoden und -zeitpunkte sollten in einem solchen Fall angepasst werden.

Überschreitungen von Endpunkten bzw. Schweregraden, die nicht auf den Tierversuch zurückzuführen sind, beispielsweise infolge von Gerätefehlfunktionen oder Krankheiten und Infektionen, sind ebenfalls dem benannten Tierarzt und dem Tierschutzgremium zu melden und entsprechende Maßnahmen einzuleiten.

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	28
Liste 1	29
Tabelle 1 Endpunktmatrix (siehe Fließtext, Punkt 1.3).....	30
Tabelle 2a Beispiele für Abbruchkriterien mit einem Schweregrad von maximal “gering”	30
Tabelle 2b Beispiele zur Beurteilung des Wohlbefindens durch Verhaltensbeobachtung.....	33
Tabelle 3 Übersichtstabelle mit Manipulationen, zugeordneten Stopp-/ Terminationskriterien und Schweregraden am Beispiel eines fiktiven Projektes “Generierung von transgenen Mauslinien”	36
Tabelle 4 Beispielhafte Übersichtstabelle mit Manipulationen, zugeordneten Stopp-/ Terminationskriterien und Schweregraden ohne speziellem Projektbezug	37
Tabelle 5 Beispiele für Stopp- und Terminationskriterien.....	38
Tabelle 6 Beispiel für ein „Welfare Assessment Sheet“ mit Maßnahmen	39
Tabelle 7 Beispiele für nicht-invasive, automatisierte Methoden	41
Tabelle 8: Beispiele für biochemische Nachweise einer möglichen Belastung und deren Anwendungsgebiete	42
Tabelle 9 Grimace und Pain Scales	43
Tabelle 10 Beispiele für bereits veröffentlichte Body Condition Scores	44
Tabelle 11a Score Sheet zur Einstufung des Phänotyps neu erzeugter Zebrafischlinien.....	45
Tabelle 11b Literatur zur Beurteilung von Zebrafischen und anderen Fischarten.....	46
Tabelle 12: Beispiele für Stopp- und Terminationskriterien bei Großtieren	47
Tabelle 13: Score Sheet zur Dokumentation prä- und postoperativer Belastungen.....	49
Tabelle 14: Modifiziertes Score Sheet zur Beurteilung von Belastung bei Pferden	50
Tabelle 15: Beispiel für ein Score Sheet für das Monitoring diabetischer Schweine	52

Liste 1

Wichtige generelle Webressourcen zum Thema „Humane endpoints“ mit Webadressen:

1. 3Rs-Centre Utrecht Life Sciences. Humane endpoints in laboratory animal experimentation
<https://www.humane-endpoints.info/en>
2. NC3Rs. Humane endpoints.
<https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/humane-endpoints>
3. CCAC. Guidelines on choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. 1998
https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf
4. CCAC guidelines: Identification of scientific endpoints, humane intervention points, and cumulative endpoints. 2022
https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC_guidelines_scientific_endpoints.pdf
5. OECD. Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation.
<https://www.aalac.org/pub/?id=E9017C90-F2B6-83CE-4F2D-FD20B73803D1>
6. National Research Council. Humane endpoints for animals in pain
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32660/>
7. ILAR (Institute for Laboratory Animal Research). Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research and Testing. ILAR J. 2000.
http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/41_2/
8. AWIC (Animal Welfare Information Center). Humane Endpoints.
<https://www.nal.usda.gov/legacy/awic/humane-endpoints-and-euthanasia>
9. norecopa.no Humane endpoints
<https://norecopa.no/more-resources/humane-endpoints>
10. Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals – The National Academies Press 2009
<https://nap.nationalacademies.org/download/12526#>
11. Use of Humane Endpoints to Minimise Suffering. In “The COST Manual of Laboratory Animal Care and Use “. CRC Press 2010
<https://www.taylorfrancis.com/chapters/oa-edit/10.1201/b13591-14/use-humane-endpoints-minimise-suffering-coenraad-hendriksen-david-morton-klaus-cussler>

Tabelle 1 Endpunktmatrix (siehe oben, Punkt 1.3)

Tabelle 2a Beispiele für Abbruchkriterien mit einem Schweregrad von maximal "gering"

Diese Beispiele sollen Anregungen bieten und sind nicht als Menüliste zum Auswählen gedacht

Projekttyp	Grund für Einstufung	Erwartete Belastungsmerkmale	Abbruchkriterien	Interventionen oder Maßnahmen
Zucht, Haltung	Keine ausreichende Dokumentation vorhanden, um Belastung auszuschließen	keine	Alle Auffälligkeiten, die eine Verwendung in einem experimentellen Projekt nicht sinnvoll erscheinen lassen	Ausschluss von nachfolgender Verwendung
	Risiko bleibt erhalten (Immundefekte, Tumorentwicklung)	Belastung nicht erwartet, aber nicht auszuschließen	Anzeichen einer Infektion (Gewichtsverlust >12% in 24h), Verhaltensauffälligkeiten, Tumorbildung	Euthanasie, Nekropsie, Organentnahme
	Geringe Belastung durch Genotyp	Entsprechende Belastungserfassung oder Dokumentation für den Genotyp	Alle Auffälligkeiten, die über die Dokumentation hinausgehen oder im Experiment Interpretationsprobleme ergeben könnten	Ausschluss von nachfolgender Verwendung
	Gabe von Wirkstoffen zur Manipulation des Genotyps (Tamoxifen, Doxyzyklin, Diphtheriatoxin etc.)	Kurzfristiges Unbehagen, Übelkeit	Länger anhaltendes Unbehagen	Änderung der Applikationsart oder -frequenz, wenn möglich pausieren Ausschluss von nachfolgender Verwendung
	Züchterische Maßnahmen, wie z.B. Plugkontrolle bei stressempfindlichen Arten (z.B. bei Meerschweinchen) ²	Stress	Lautäußerung, Abwehrbewegungen	Stoppen der Maßnahmen, Erholungszeit einräumen, positiv verstärktes Training
Experimentell	Geringe Belastung durch Handling (z.B. Fixierung zur Untersuchung oder zu Lehrzwecken) ²	Ev. kurzer Stress oder Ängste (artspezifisch)	Mittellanger oder mittelstarker Stress oder Angstzustand	Stressvermeidung, Belohnung nach Handling, positiv verstärktes Training
	Gabe von Medikamenten im Trinkwasser	Verweigerung von bitterem Trinkwasser	Dehydratation, Hautspannung verringert	Gabe von regulärem Trinkwasser oder Injektion mit PBS, Fortsetzung mit Medikament in gesüßtem oder aromatisiertem Trinkwasser
	Geringe Belastung durch kleinere invasive Eingriffe z.B. Injektion, Gavage, oder Blutabnahme	Kurze Schmerzen oder kurzes Unbehagen, Durchfall bei bestimmten Trägersubstanzen	Aggression, Stress, Apathie, Isolation, länger anhaltende Durchfälle	Beobachtung für ½-1 Std. nach Eingriff, wenn auffällig Euthanasie, evtl. kurzfristig Sedierung/Schmerzmedikation zur besseren Toleranz, Training,

	Narkose für nicht-invasive (intranasale, intratracheale Gabe) oder bildgebende Verfahren	Gestörte Atem-, Kreislauf-, Temperaturregulation, Irritation der Atemwege,	Aufwachphase verlängert, Verhalten anhaltend beeinträchtigt	Beobachtung über erwartbare Aufwachzeit, wenn auffällig Euthanasie, Anpassung des Narkoseprotokolls, unterstützende Maßnahmen wie Sauerstoff-, Flüssigkeits-, Wärmezufuhr; Monitoring; Antagonisation, Erholungszeit anpassen, Schmerztherapie
	Geringe Belastung durch Verhaltenstests	Evtl. geringer Stress oder Ängste	Lernprozess dauert zu lange oder Versuchsaufbau ist deutlich mit Stress verknüpft; anhaltende Übersprungshandlungen (Barbering etc.)	Abbruch des Versuchs, Wiedereingliederung in die gewohnte Umgebung
	Geringe Belastung durch spezielle Diät	Änderung des Gewichts bzw. der Fett-/Muskelmasse	Aversion gegen Futter, Durchfälle oder Konstipation	Gabe von Rekonvaleszenzfutter, Ausschluss von nachfolgender Verwendung
	Geringe Belastung durch Tumorbildung	Juckreiz/unangenehme Empfindungen, Einschränkung von Sinnesorganen	Einschränkung von physiologischen Mechanismen (Nahrungs-/Wasseraufnahme, Stoffwechsel, Ausscheidung), Verhaltensänderungen, klinische Symptome	Angepasstes Enrichment, Optimierung der Haltungsbedingungen, Therapie gegen Juckreiz
	Futterentzug (max. 24h) bei Nagern	Gewichtsverlust, Dehydration	Gewichtsverlust >12% in 24h (Mäuse), Auskühlen	Gabe von Rekonvaleszenzfutter, Elektrolyte, Wärme
	Isolation (max. 24h) von sozialen Tieren	Evtl. geringer Stress oder Ängste, Lautäußerungen, Stereotypen	Aggression, Stress, Apathie, Angst, anhaltende Übersprungshandlungen (Barbering etc.), verändertes Fress-/Trinkverhalten	Abbruch des Versuchs, Wiedereingliederung in die gewohnte Umgebung, vermehrte Beschäftigung mit Spielzeug, menschlicher Kontakt, Sichtkontakt, Geruchskontakt; Begleittier
	Mobilitätseinschränkung (max. 24h) z.B. Stoffwechselkäfige	Evtl. geringer Stress oder Ängste	Aggression, Stress, Apathie, Angst, anhaltende Übersprungshandlungen (Barbering etc.), verändertes Fress-/Trinkverhalten	Abbruch des Versuchs, Wiedereingliederung in die gewohnte Umgebung
	Einfangen, Markieren mit Vermessen oder Blutabnahme von Wildtieren	Evtl. kurzer Stress oder Ängste, Abwehrbewegungen, Lautäußerungen	Aggression, Stress, Apathie, Angst, stark erhöhte Respirationsrate bis hin zur Hyperventilation	Abbruch, Entlassen des Tieres mit nachfolgender Beobachtung (wenn stressfrei möglich), Anpassung der Fang- oder Fixierungsmethode

Legende:

Beispiele für Verhaltensauffälligkeiten Vermehrte Aggression oder Angstverhalten, Selbstisolation, Apathie, verringerte Futter- oder Wasseraufnahme, verminderte Fellpflege, verminderte oder vermehrte Bewegung, Stereotypien, vermindertes Nestbauverhalten, vermindertes Buddelverhalten, exzessives Barbering...

Sonstige Auffälligkeiten: Rektumprolaps, Zahnfehlstellungen...

² Artsspezifische Charakteristika, individuelle Empfindung und zeitliche Dimension müssen nicht, können aber zu einer Einschätzung des Vorliegens eines Tierversuchs führen (Nadelstichkriterium).

Tabelle 2b Beispiele zur Beurteilung des Wohlbefindens durch Verhaltensbeobachtung

Behaviour/ Species	Title	Reference
Overviews		
	Behavioral methods for severity assessment	(Kahnau et al., 2020)
Rodents	Pros and Cons of Clinically Relevant Methods to Assess Pain in Rodents	(Tappe-Theodor et al., 2019)
Multiple Behaviours		
Mouse	Assessing Burrowing, Nest Construction, and Hoarding in Mice	(R. Deacon, 2012)
	Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice	(Jirkof, 2014)
	The acute social defeat stress and nest-building test paradigm: A potential new method to screen drugs for depressive-like symptoms	(Otabi et al., 2017)
	Assessment of avoidance behaviors in mouse models of muscle pain	(Pratt et al., 2013)
	Effect of Repeated Exposure to Isoflurane on Nest Building and Burrowing in Mice	(Gjendal et al., 2020)
	Assessment of anxiety in open field and elevated plus maze using infrared thermography	(Lecorps et al., 2016)
Rat	Performance of behavioral assays: The Rat Grimace Scale, burrowing activity and a composite behavior score to identify visceral pain in an acute and chronic colitis model	(Leung et al., 2019)
	Behavioral and neurochemical analysis of ongoing bone cancer pain in rats	(Remeniuk et al., 2015)
Guinea Pig	Validation of a Behavioral Ethogram for Assessing Postoperative Pain in Guinea Pigs (<i>Cavia porcellus</i>)	(Misha L Dunbar, 2016)
Rodents	Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents	(Deuis et al., 2017)
Multiple Species	Unified Behavioral Scoring for Preclinical Models	(Harrison et al., 2020)
Nestbuilding		
Mouse	Housing condition and nesting experience do not affect the Time to Integrate to Nest Test (TINT)	(M. Rock et al., 2014)
	Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology	(Gaskill, Gordon, et al., 2013)
	Nest building as an indicator of illness in laboratory mice	(Gaskill & Pritchett-Corning, 2016)
	Nest Building as an Indicator of Health and Welfare in Laboratory Mice	(Gaskill et al., 2013)

Mouse	The Time-to-Integrate-to-Nest Test as an Indicator of Wellbeing in Laboratory Mice	(M. L. Rock et al., 2014)
	Heat or insulation: Behavioral titration of mouse preference for warmth or access to a nest	(Gaskill et al., 2012)
	Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring	(Jirkof, Fleischmann, et al., 2013)
	Time to Integrate to Nest Test Evaluation in a Mouse DSS-Colitis Model	(Häger et al., 2015)
	Tell-tale TINT: Does the Time to Incorporate into Nest Test Evaluate Postsurgical Pain or Welfare in Mice?	(Gallo et al., 2020)
Rat	Nest-building performance in rats: impact of vendor, experience, and sex	(Schwabe et al., 2020)
Burrowing		
Mouse	Burrowing into prion disease	(R. M. J. Deacon et al., 2001)
	Burrowing is a sensitive behavioural assay for monitoring general wellbeing during dextran sulfate sodium colitis in laboratory mice	(Jirkof, Leucht, et al., 2013)
Mouse+Rat	Cancer-induced bone pain impairs burrowing behaviour in mouse and rat	(Sliepen et al., 2019)
Rat	The assessment of general well-being using spontaneous burrowing behaviour in a short-term model of chemotherapy-induced mucositis in the rat	(Whittaker et al., 2015)
	Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study	(Wodarski et al., 2016)
Rodents	Burrowing: A sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents	(R. M. J. Deacon, 2009)
Voluntary Wheel Running		
Mouse	Running in the wheel: Defining individual severity levels in mice	(Häger et al., 2018)
	Wheel running behaviour in group-housed female mice indicates disturbed wellbeing due to DSS colitis	(Weegh et al., 2020)
	Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: A nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia	(Cobos et al., 2012)
Rat	Depression of home cage wheel running: a reliable and clinically relevant method to assess migraine pain in rats	(Kandasamy et al., 2017)
	Home cage wheel running is an objective and clinically relevant method to assess inflammatory pain in male and female rats	(Kandasamy et al., 2016)
	Suppression of voluntary wheel running in rats is dependent on the site of inflammation: Evidence for voluntary running as a measure of hind paw-evoked pain	(Grace et al., 2014)

Open Field Test		
Mouse	Preoperative open field behavior predicts levels of neuropathic pain-related behavior in mice	(Vatine et al., 2000)
Vocalisation		
Mouse	An improved behavioural assay demonstrates that ultrasound vocalizations constitute a reliable indicator of chronic cancer pain and neuropathic pain	(Kurejova et al., 2010)
Cage lid hanging		
Mouse	Cage-lid hanging behavior as a translationally relevant measure of pain in mice	(Zhang et al., 2021)
Gait		
Rat	Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats	(Tétreault et al., 2011)
Olfactory		
Mouse	3Rs-based optimization of mice behavioral testing: The habituation/dishabituation olfactory test	(Oummadi et al., 2020)
Automated		
Mouse	Automated analysis of postoperative behaviour: Assessment of homecagescan as a novel method to rapidly identify pain and analgesic effects in mice	(Roughan et al., 2009)
Zebrafish	Assessment of behaviour in groups of zebrafish (<i>Danio rerio</i>) using an intelligent software monitoring tool, the chromatic fish analyser	(Thomson et al., 2019)
	Automated monitoring of behaviour in zebrafish after invasive procedures	(Deakin et al., 2019)

Tabelle 3 Übersichtstabelle mit Manipulationen, zugeordneten Stopp-/ Terminationskriterien und Schweregraden am Beispiel eines fiktiven Projektes “Generierung von transgenen Mauslinien”

Projektteil	Manipulation	Stoppkriterium	Term. kriterium	Schweregrad	Dauer	Frequenz
Generierung transgener Mauslinien	Vasektomie	Stopp-K.7	Term-K.5 u.7	mittel	kurz-mittel	1x
	Chirurg. Embryo- o. Ovartransfer	Stopp-K.7	Term-K.5 u.7	mittel	kurz-mittel	1x
	Transzervikaler Embryotransfer	Stopp-K.4	Term-K.4	gering	kurz	1x
	Superovulation	Stopp-K.4				1x
	Nebenhodenbiopsie	Stopp-K.4				1x
	Belastungserfassung	Stopp-K. 1 o. 2	Term-K.1			
Zucht	Keine	Stopp-K. 1 o. 2	Term-K.1			
	Markierung/Biopsie für Genotypisierung	Stopp-K.4	Term-K.4	gering	kurz	1x
	Tamoxifen Induktion					1x
	AAV Injektion					1x
	Intrakraniale AAV Injektion	Stopp-K.7	Term-K.5, 6 u.7	mittel	kurz-mittel	1x
Phenotyping Verhaltenstests	Aktivität	Stopp-K.3	-	max. mittel	kurz	max.4x
	Motorik					
	Kognition					
	Emotionales Verhalten					
	Sensorik					
	Soziales Verhalten					
				insgesamt mittel		

Kontext, Beschreibung und geforderte Maßnahmen hierzu finden sich in Tabelle 5

Tabelle 4 Beispielhafte Übersichtstabelle mit Manipulationen, zugeordneten Stopp-/ Terminationskriterien und Schweregraden ohne speziellen Projektbezug

Projektteil	Manipulation	Stoppkriterium	Term. kriterium	Schweregrad	Dauer	Frequenz
Fütterung	bestimmte Diäten / abnormale Futterzusammensetzung / Fettfutter	1, 4	1, 4 u. 7	max. mittel	kurz - mittel	1x tägl.
Blutabnahme	Im Wachzustand	1, 4	1, 4	gering	kurz	
	In Sedierung / Anästhesie		1, 4, 6			
Wundmodell-Studien über einen definierten Zeitraum	Manipulationen im Wachzustand	1, 4	1, 4, 7	gering-mittel	kurz-mittel	
	In Sedierung		1, 4, 6, 7			
	In Allgemeinanästhesie					
Akutversuch in Allgemeinanästhesie	Operativer Eingriff ohne Wiederherstellung der Lebensfunktion	7	5	keine Wiederherstellung der Lebensfunktion	kurz-mittel	
Diagnostisches Verfahren	Im Wachzustand	1, 4	1, 4, 7	gering	kurz	
	In Sedierung		1, 4, 6, 7	gering	kurz	1x
	In Anästhesie					1x
						mittel
Schmerzhafter chirurgischer Eingriff		1, 4, 7	1, 4, 5, 6, 7	mittel - schwer	mittel	
				insgesamt schwer		

Kontext, Beschreibung und geforderte Maßnahmen hierzu finden sich in Tabelle 5

Tabelle 5 Beispiele für Stopp- und Terminationskriterien

Stopp	Kontext, Beschreibung und geforderte Maßnahmen	Termination	Kontext, Beschreibung und Tötungsmethode
Stopp-kriterium 1	Generell - Tier zeigt unerwartetes Verhalten, wie übermäßige Aggression, Stereotypen, Selbstisolation oder Apathie => stressmindernde Maßnahmen und Enrichment	Term. kriterium 1	Verhalten bleibt bestehen – Ausschluss aus Zucht und Versuchen => Termination
Stopp-kriterium 2	Generell - Ungeeigneter Genotyp => überlege andere Verwendung	Term. kriterium 2	Keine andere Verwendung möglich => Termination
Stopp-kriterium 3	Verhaltenstests - Tier zeigt Probleme, wie Panik oder Unfähigkeit zu Schwimmen => Entnahme aus Versuchsanordnung	Term. kriterium 3	Nicht anwendbar
Stopp-kriterium 4	Kleinere Eingriffe, wie Injektionen, Gavage, Gewebebiopsien - Tier zeigt Anzeichen von Schmerzen, auffälliges Unwohlsein => erhöhte Beobachtung für die nächste 1/2 Stunde; Analgesie bei Bedarf	Term. kriterium 4	Keine Verbesserung, mögliche innere Verletzungen in Schlund, Magen oder Bauchfell => Euthanasie
Stopp-kriterium 5	Nicht anwendbar	Term. kriterium 5	Chirurgischer Eingriff – Komplikationen, die während des Eingriffs nicht behoben werden können => keine Wiederherstellung der Lebensfunktion, Euthanasie
Stopp-kriterium 6	Nicht anwendbar	Term. kriterium 6	Chirurgischer Eingriff – Konvulsionen, epileptische Anfälle oder lebensbedrohliche Komplikationen in der Aufwachphase => Euthanasie
Stopp-kriterium 7	Chirurgischer Eingriff – Tier zeigt Anzeichen von Schmerzen, auffälliges Unwohlsein oder Wundprobleme, wie Blutung, lose Naht oder Infektion, Wundversorgung => erhöhte Analgesie mit erhöhter Beobachtung, evtl. mehrfache Maßnahmen	Term. kriterium 7	Keine Verbesserung durch Maßnahmen nach 1 Tag => Euthanasie
Kein Stopp	Keine signifikante Belastung, die einen Stopp erfordern würde, zu erwarten	Keine Termination	Keine signifikante Belastung, die eine Termination erfordern würde, zu erwarten

Diese Tabelle ist auf die Tabellen 3 und 4 anwendbar.

Tabelle 6 Beispiel für ein „Welfare Assessment Sheet“ mit Maßnahmen

Beobachtung	Punkte- bewertung	
1. Körpergewicht		
-Gleichbleibend oder zunehmend	0	
-Änderung < 5% (% vom Ausgangswert X angeben!)	1	
-Gewichtsreduktion 5-10%	5	
-Gewichtsreduktion 11-20%	10	
-Gewichtsreduktion >20%	20	
II Allgemeinzustand		
-Fell glatt, anliegend, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend	0	
-Felldefekte (verminderte oder gesteigerte Körperpflege)	1	
-Fell stumpf, ungeordnet, struppig, ungepflegte od. verschmutzte Körperöffnungen; Veränderung der Hautoberfläche (kleine Wunden); Augen trüb bzw. Augenausfluss; geringgradiger Rektumprolaps; abnormale Haltung, erhöhter Muskeltonus	5	
-Schmutziges Fell, verklebte Körperöffnungen; mittelgradiger Rektalprolaps; Dehydratation; abnormale Haltung, erhöhter Muskeltonus	10	
-Verkrampfung, Lähmung (Rumpfmuskulatur, Extremitäten); Atemgeräusche; Rektumprolaps hochgradig ausgebildet	20	
III Spontanverhalten		
-normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Interaktion und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	0	
-geringe Abweichung vom Normalverhalten	1	
-ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperaktivität	5	
-Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperaktivität bzw. Verhaltensstereotypien; Koordinationsstörungen	10	
-Lautäußerung beim Ergreifen; Selbstverstümmelung (Autoaggression)	20	
IV Klinischer Befund		
-Temperatur und Atmung normal, Extremitäten warm, Schleimhäute gut durchblutet, Abdomen physiologisch	0	
-geringe Abweichung vom klinischen Normalbefund	1	
-Tier fühlt sich kälter an als normal, Extremitäten sind kalt, Schleimhäute sind blass	5	

-mittelgradige Temperaturabweichung, Atmung + oder -30%, umfangsvermehrtes Abdomen	10	
-hochgradige Temperaturabweichung, Atmung + oder - 50%, Blut im Urin oder Kot; Durchmesser eines tastbaren Tumors >2cm (Kleinnager)	20	
V Projekt-spezifische Abbruchkriterien		
Bewertung, Maßnahmen		
Belastungsgrad 0 = keine Belastung	0	
Belastungsgrad 1 = geringe Belastung, Eintrag in PyRAT (oder andere Datenbank), sorgfältig weiterbeobachten	1-9	
Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung, Eintrag in PyRAT (oder andere Datenbank), der Tierarzt und Projektleiter müssen informiert werden, ggf. tierärztliche Versorgung einleiten	10-19	
Belastungsgrad 3 = hochgradige Belastung, Eintrag in PyRAT (oder andere Datenbank), den Tierarzt und den Projektleiter informieren - tierärztliche Versorgung einleiten, ggf. Tier einschläfern bzw. Versuch abbrechen	≥ 20	

Tabelle 7 Beispiele für nicht-invasive, automatisierte Methoden

Methode	Merkmale	Spezies	Referenzen
HomeCageScan	Natürliches Verhalten	Maus	(Bains et al., 2016; Roughan et al., 2009)
Videobeobachtung	Gesichtsausdrücke	Versch.	Siehe Tabelle 9 (Grimace Scales)
	Körper	Maus	(Brodkin et al., 2014)
	Aktivität/Schlaf	Maus	(Brown et al., 2016)
	Schwimmen/Bewegung	Zebrafisch	(Deakin et al., 2019)
Ultrasound Vocalization	Lautäußerungen	Maus	(Premoli et al., 2021)
Ganganalyse	Schrittlänge/Frequenz, Belastung aller 4 Gliedmaßen	Maus	(Clarke & Still, 1999)
Thermoimaging	(Oberflächen) Temperatur	Maus	(Franco et al., 2019)

Tabelle 8: Beispiele für biochemische Nachweise einer möglichen Belastung und deren Anwendungsgebiete

Nachweis	Bioch. Marker	Spezies	Literatur
Induktion einer Insulin-Insensitivität/Resistenz durch Diäten	Insulin; Glucose	Maus	(Winzell & Ahrén, 2004)
Stress durch Transport, Handling	Cortisol	Fische	(Acerete et al., 2004)
Stress durch Transport, Handling	Cortisol	Maus	(Gong et al., 2015)
Phänotypisierung	verschiedene Blutanalyten	Maus	(Rathkolb et al., 2013)
Trainingsintensität	Laktat	Maus	(Lønbro et al., 2019)

Tabelle 9 Grimace und Pain Scales

Art	Referenz
Review	(Descovich et al., 2017; Evangelista et al., 2022; Mogil et al., 2020; Mota - rojas et al., 2020; Tomacheuski et al., 2021)
Entwicklung, Training	(Dai et al., 2020; McLennan et al., 2019; Roughan & Flecknell, 2006)
Maus	(Langford et al., 2010)
Ratte	(Klune et al., 2019; Leung et al., 2019; Sotocinal et al., 2011; Sperry et al., 2018)
Kaninchen	(Hampshire & Robertson, 2015; Keating et al., 2012; Leach et al., 2009, 2011)
Pferd	(Costa et al., 2016; Dalla Costa et al., 2014; de Grauw & van Loon, 2016; Gleerup, Forkman, et al., 2015)
Lamm	(Guesgen et al., 2016)
Schaf	(Häger et al., 2017; Nuno Emanuel Oliveira Silva et al., n.d.; Silva et al., 2020)
Ferkel	(di Giminiani et al., 2016; Viscardi et al., 2017; Vullo et al., 2020)
Schwein	(Luna et al., 2020; Navarro et al., 2020)
Katze	(Evangelista et al., 2019; Holden et al., 2014; Reid et al., 2018)
Hund	(Firth & Haldane, 1999; Holton et al., 2001; Reid et al., 2018)
Frettchen	(Reijgwart et al., 2017)
Rind	(de Oliveira et al., 2014; Gleerup, Andersen, et al., 2015; Tschoner, 2021)

Tabelle 10 Beispiele für bereits veröffentlichte Body Condition Scores

Tierart	Referenz
Fische: Zebrabärbling:	(Wilson et al., 2013a), (Clark et al., 2018a)
Mäuse:	(Ullman-Culleré & Foltz, 1999)
Ratten:	(Hickman & Swan, 2010)
Meerschweinchen:	(Ara et al., 2012) https://www.pfma.org.uk/assets/docs/pet-size-o-meter/pet-size-o-meter-guinea-pig.pdf
Kaninchen:	(Prebble et al., 2015; Sweet et al., 2013) http://www.pfma.org.uk/assets/weigh-in-wednesday/petsize-o-meter-rabbit.pdf
Hund:	(Laflamme, 1997; Witzel et al., 2014) https://www.aaha.org/globalassets/02-guidelines/nutritionalassessment/nutritionalassessmentguidelines.pdf
Schaf:	(Phythian et al., 2012; Russel, 1984) https://www1.agric.gov.ab.ca/\$department/deptdocs.nsf/all/agdex9622/\$FILE/bcs-sheep.pdf
Schwein:	(Renggaman et al., 2015) http://www.thepigsite.com/articles/275/assessing-sowbody-condition/
Nicht-menschliche Primaten:	(Clingerman & Summers, 2012; Summers et al., 2012)

(Adaptiert nach: GV-SOLAS, Ausschuss für Tierschutzbeauftragte, Möglichkeiten der Belastungsbeurteilung im Tierversuch, Februar 2020)

Tabelle 11a Score Sheet zur Einstufung des Phänotyps neu erzeugter Zebrafischlinien

Entwicklungsstadium	Kategorie	Eigenschaft	Generation (F1-3)
			<input type="checkbox"/> WT <input type="checkbox"/> pathologisch Beschreibung des Phänotyps
Frühentwicklung (bis 5 dpf)	Körperachse	Körperlänge	
		Körperform/-wölbung	
		Körperbreite	
	Nervensystem	Position der Augen	
		Gehirngröße	
	Muskeln	Form der Somiten	
	Herz- Kreislaufsystem	Herzschlag	
Blutfluss			
Cranio-Fasziales System	Form des Kiefers		
Larvenentwicklung (5 dpf- 2 Monate)	Körperform	Körperlänge	
		Körperform/-wölbung	
	Verhalten	Reaktion auf Berührung/Erschütterung	
Junges Erwachsenalter (2-4 Monate)	Körperform	Körperlänge (Tiere im gesamten Gelege)	
	Schwimmverhalten	Aggressivität	
		„Schooling/Schooling“	
		Nutzung der Wassersäule	
	Fressverhalten	Reaktion auf Futter	
	Mortalität	Überlebensrate (ausgehend vom Larvenstadium)	
Fertilität	Anzahl fertiler Tiere		
	Gelegegröße		

Prof. Dirk Meyer, Institut für Molekularbiologie, Universität Innsbruck

Tabelle 11b Literatur zur Beurteilung von Zebrafischen und anderen Fischarten

Kategorie	Referenz
Analgesie und Anästhesie	(Ferreira et al., 2022; Jorge et al., n.d.; Martins et al., 2016b) Martins et al., 2016a)
BCS	(Clark et al., 2018b; Wilson et al., 2013b)
Endpunkte	(Ellis & Katsiadaki, 2021) (Andersen et al., 2023)
Gesundheit und Tierwohl	(Sabrautzki et al., 2021)
Schmerz	(Lynne U. Sneddon, 2017; Sneddon, 2015, 2019)
Verhalten und Stress	(Deakin et al., 2019; Rambo et al., 2017) (Reolon et al., 2018; Thomson et al., 2019)
Schweregradeinschätzung	https://www.humane-endpoints.info/images/58c2b3873adbf/BfR%20article%20-%20severity-assessment-of-genetically-altered-fish-bony-fish-teleost-fish.pdf

Tabelle 12: Beispiele für Stopp- und Terminationskriterien bei Großtieren

Tierart / Alter	Intervention erforderlich	Euthanasie erforderlich	Referenz
Schwein	Verhaltensänderungen (Apathie,...)	Extreme andauernde Aggressivität oder Depression	GV-SOLAS, Ausschuss für Tierschutzbeauftragte, Möglichkeiten der Belastungsbeurteilung im Tierversuch, Februar 2020 (Dülsner et al., 2020)
	Wundheilungsstörungen	Nekrosen, keine Besserung auf Therapie	
	Schmerzhaftigkeit	Nicht therapierbare Schmerzen	
	Infektionen	Sepsis	
	Inappetenz, Gewichtsabnahme (reduzierte bis verweigerter Wasser-/ Futteraufnahme)	Progressive Verschlechterung (hgr. Dehydratation, Erbrechen)	
	Fieber	Ursache kann nicht beseitigt werden oder keine Besserung auf Antibiose und andere Maßnahmen	
	Durchfall und/oder Übelkeit, Erbrechen, Verdauungsstörung	Massiver Flüssigkeits- und Elektrolytverlust, Kollaps	
	Änderungen im äußeren Erscheinungsbild		
	Änderung der Atmung (Dyspnoe)	Hgr. Dyspnoe, Hypoxämie, Schnappatmung	
Mastschwein	Hypoglykämie < 3 mmol/L (z.B. Adaptation der Glukose-/Insulin-Gabe)	Kein Ansprechen auf Therapie innerhalb von 24h	
	Gewichtszunahme < 700 g/Tag; Gewicht bleibt gleich oder wird weniger	Starke Abmagerung	
Schaf	Vokalisation, Zähneknirschen; Anzeichen von Schmerz, Stress, Leiden, eingeschränktem Wohlbefinden; verminderte Nahrungs-/Wasseraufnahme; Aktivität unruhig,	Komplette Inappetenz, keine Pansenaktivität; starke Unruhe (extreme Schmerzen) oder festliegend; Keine Belastung der operierten Extremität, Paralyse,	Osteosynthese-Modell / (Paull et al., 2012)

	weniger Ruhepositionen, häufige Positionsänderungen; Lahmheit; erhöhtes Cortisol in Speichel oder Blut; Verhaltensänderungen: z.B. abnormale Haltung zur Vermeidung von Schmerzen ("avoidance behaviour"); Hyperthermie	Muskelschwund, starke Abmagerung, kein Kotabsatz,	
	Änderung im äußeren Erscheinungsbild, Verhaltensänderung		Osteosynthese-Modell / (Häger et al., 2017)
	Kombination aus klinischer Untersuchung und Sheep Grimace Scale ergibt Schmerzhaftigkeit / vermehrte Belastung		
	Nahrungs-/Wasseraufnahme (reduziert bis verweigert)	Hgr. Dehydratation, Kachexie (BCS 1), Pansenstillstand	GV-SOLAS, Ausschuss für Tierschutzbeauftragte, Möglichkeiten der Belastungsbeurteilung im Tierversuch, Februar 2020 (Dülsner et al., 2020)
	Änderungen der Atmung (Dyspnoe)	Hgr. Dyspnoe, Hypoxämie, Schnappatmung	
Pferd	Composite Pain Scale > 4 (maximal 30; > 21 hochgradig)	Composite Pain Scale > 21 (maximal 30); keine Besserung bei intensiver Schmerztherapie	(Auer, 2016); siehe Tabelle 14 (Costa et al., 2016; McLennan et al., 2019)
	Gesichtsausdruck (pain face); Allgemeinverhalten; Position in Box; Gliedmaßenbelastung, Körperhaltung; Kopfposition; Reaktion auf Personen; Appetit; Bewusstseinszustand; Lahmheit in Bewegung...	Gesamteindruck (Körperhaltung, Verhalten,...) spricht für extreme Schmerzen, die auf keine Therapie ansprechen	

Tabelle 13: Score Sheet zur Dokumentation prä- und postoperativer Belastungen

Tier Nr. xxx

Beobachtungen (Tag 0 = Eingriffsdatum)	-3	-2	-1	0	1	2	3
<i>Datum/Uhrzeit</i>							
Gewicht							
Körpertemperatur							
Fressverhalten							
Trinkverhalten							
normale Fortbewegung							
Vokalisation							
Grooming/Fellpflege							
Taumeln							
Zittern, Zucken							
Schonhaltung							
Eingriffsseite: entzündet, Wundsekret, etc.							

Nicht verändert: Score = 0

Geringgradig verändert Score = 1

Mittelgradig verändert Score = 2

Hochgradig verändert Score = 3

Tabelle 14: Modifiziertes Score Sheet zur Beurteilung von Belastung bei Pferden

Schmerzgesicht	Keine Anzeichen Schmerzgesicht	0
	Anzeichen von Schmerzgesicht, verschwindet bei Reaktion auf Geräusche oder Beobachter	1
	Deutliches Schmerzgesicht, bleibt dauerhaft	3
	Deutliches Schmerzgesicht	3
Allgemeines Schmerzverhalten (Lahmheit, Blepharospasmus, Zähneknirschen,.....)	Nicht vorhanden	0
	Gelegentlich vorhanden	1
	Vorhanden	3
Position in Box	Steht bei der Tür	0
	Steht in der Mitte mit Kopf zur Tür	1
	Steht in der Mitte mit Kopf zur Seitenwandwand	2
	Steht in der Mitte mit Kopf zur Rückwand	3
Allgemeinbefinden	Wach beobachtend oder wartend: steht ruhig oder geht herum; Kopf bewegt sich, verfolgt/reagiert auf Geräusche; Augen offen, wacher Blick, beobachtet Umgebung, reges Ohrspiel mit Reaktion auf Geräusche	0
	Ruhiges Stehen, kaum bzw. nur minimale Kopfbewegungen, Augen halbgeschlossen bis geschlossen, „Blick ins Leere“, reagiert auf Geräusche (verzögert) mit Kopf und Ohrspiel	1
	Ruhiges stehen, keine Kopfbewegungen, wenig bis keine bzw. verzögerte Reaktion auf Umweltgeräusche oder Bewegungen, Augen offen bis halbgeschlossen, nach „Innen“ gerichteter, (glanzloser) Blick, Ohren seitlich hängend oder rückwärtsgerichtet, kein oder sehr verzögertes Ohrspiel,	2
	Apathisch, absolut teilnahmslos, kein Ohrenspiel oder rastlos, unruhig, häufiger Positionswechsel	4
Gliedmaßenbelastung	Gleichmäßige, "pferdetypische" Gewichtsverteilung (Hufe im Rechteck) oder ausrasten = "schildern"	0
	Ungleichmäßige Gewichtsverteilung: Gliedmaßen vorgestellt bzw. unter den Körper gestellt; Grad 1: bis zu halbe Hufbereite (1), Grad 2: ganze Huflänge (2), Grad 3: mehr als einen Huflänge (3)	1,2,3
	Wiederholtes Gewichtsverlagern, Beugen oder Hochheben einer Extremität mit kurzer Entlastung- bzw. Belastung, oder fehlende Belastung einer Gliedmaße	4

Körperhaltung und allgemeines Verhalten	Ruhiges Stehen ohne Scharren, gegen Bauch treten, Schweifschlagen	0		
	Scharren und/oder gegen den Bauch treten und/oder Schweifschlagen; reiben, beißen einer Körperregion: 1-2 mal/5min	1		
	Scharren und/oder gegen den Bauch treten und/oder Schweifschlagen; reiben, beißen einer Körperregion: 3-4 mal/5min	2		
	Scharren und/oder gegen den Bauch treten und/oder Schweifschlagen; reiben, beißen einer Körperregion: >5 mal/5min	4		
	Niederwerfen, wiederholt niederlegen, Wälzen, Unruhe, Abnorme Körperhaltung (z.B. Sägebockhaltung / Körperhaltung wie beim Urinieren)	4		
Kopfhöhe (Bezug Ohrbasis) /-bewegung	Kopf über bzw. auf Widerristhöhe, kein Anzeichen von Unbehagen	0		
	Kopf unterhalb Widerrist	1		
	Kopf unterhalb Schultergelenk	2		
	Kopf tief am Boden oder ununterbrochenes Kopfschlagen oder ständiges Umschauen zur Flankengegend	3		
Verhalten beim Herantreten an die Box und Ansprechen des Pferdes (Schmalze mit der Zunge) oder bei Bewegungen vor der Box	Zeigt sich aufmerksam, schaut bzw. kommt sofort, neugierig, reagiert auf Schmalzen bzw. Bewegungen prompt	0		
	Reagiert verzögert auf Ansprache bzw. mit schreckhafte oder nervöse Reaktion, schaut her bzw. hin, bleibt stehen	1		
	Schaut nicht hin, reagiert maximal mit Ohr, bewegt sich nicht bzw. verweigert Bewegung	2		
	Keinerlei Reaktion auf Ansprache bzw. Bewegung vor der Box, schaut nicht, verändert nicht Position,	3		
Appetit wenn Futter in Box oder beim Anbieten mit der Hand	Pferd frisst Heu , nimmt Heu bereitwillig aus der Hand	0		
	Pferd zeigt wenig Interesse, zupft wenig Heu; nimmt es zögerlich aus der Hand ohne es zu kauen	1		
	Pferd zeigt keinerlei Interesse an Heu	3		
0 - 3 kein Schmerz	4 -10 geringgradig	11-20 mittelgradig	> 21 hochgradig	0-30

Quelle: Klinik für Anästhesiologie und perioperative Intensivmedizin, VetMedUni Wien

Tabelle 15: Beispiel für ein Score Sheet für das Monitoring diabetischer Schweine

Animal ID:	Date		Date		Date	
Intervention codes: ① Seek same-day veterinary advice / attention ② Seek IMMEDIATE veterinary attention	AM	PM	AM	PM	AM	PM
DEMEANOUR Normal (N) - alert, reactive Altered (A) – lethargic ① Severe (S) - collapsed/poorly responsive ②						
FOOD INTAKE Normal (N) Altered (A) – decreased / increased Severe (S) – complete inappetance ①						
WATER INTAKE Seen to drink? Y/N Comment if thirst appears increased (expected) or decreased ①						
SKIN CONDITION Normal (N) Altered (A) – slight change in colour Severe (S) – discolored, cracked ①						
OTHER COMMENTS? E.g. wounds, trauma? (① unless only slight abrasions) E.g. abnormal urination / discharge from penis / vulva? ①						
WEIGHT (once weekly)						
WEIGHT GAIN/LOSS (% LOSS/GAINED) - If weight loss >5% then ①						
URINE	Time					
DIPSTICKRESULT	Urobilinogen (0.1/2/4/8) ①					
If negative do	Glucose (neg/+/-/+/++/+++)					

not need to record. (Highlighted refers to intervention codes)	Bilirubin (neg/+ /++ /+++) ①						
	Ketones (neg/Ⓜ /++ /+++) ②						
	Specific Gravity (ignore)						
	Blood (neg/+ /++ /+++) ①						
	pH (5-9)						
	Protein (neg/trace /++ /+++ /++++) ①						
	Nitrites (neg/trace /pos) ①						
Leukocytes (neg /++ /+++)							
Urine appearance – colour; clear/cloudy?							
BLOOD GLUCOSE (mmol/L) ≤5 mmol/L – do not administer insulin ① <3 mmol/L ② >25 mmol/L ①	Time						
	Result						
	Initials						
INSULIN	Time						
	Dose						
	Initial						
VISION (once Weekly)	able to navigate pen easily						
	Readily detects novel object placed in pen						
	Detects cotton wool dropped in line of sight						

Quelle: The Roslin Institute, University of Edinburgh, Scotland

Literatur:

- Acerete, L., Balasch, J. C., Espinosa, E., Josa, A., & Tort, L. (2004). Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237(1–4), 167–178. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2004.03.018>
- Andersen, L., Rønneseth, A., Powell, M. D., & Brønstad, A. (2023). Defining piscine endpoints: Towards score sheets for assessment of clinical signs in fish research. *Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.1177/00236772231156031>
- Ara, G. M., Jiménez, A. R., Huamán, C. A., Carcelén, C. F., & Díaz, C. D. (2012). Development of a body condition score in guinea pigs: Relationships between body condition and quantitative estimates of body fat. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 23(4). <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/948/771>
- Ashall, V., & Millar, K. (2014). Endpoint matrix: A conceptual tool to promote consideration of the multiple dimensions of humane endpoints. *Altex*, 31(2), 209–213. <https://doi.org/10.14573/altex.1307261>
- Atkinson, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., Oates, J. A., Peck, C. C., Schooley, R. T., Spilker, B. A., Woodcock, J., & Zeger, S. L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. In *Clinical Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 69, Issue 3, pp. 89–95). <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- Auer, U. (2016). Pain management in the horse. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 103(9–10).
- Bains, R. S., Cater, H. L., Sillito, R. R., Chartsias, A., Sneddon, D., Concas, D., Keskivali-Bond, P., Lukins, T. C., Wells, S., Arozena, A. A., Nolan, P. M., & Armstrong, J. D. (2016). Analysis of individual mouse activity in group housed animals of different inbred strains using a novel automated home cage analysis system. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00106>
- Bateson, M. (2016). Cumulative stress in research animals: Telomere attrition as a biomarker in a welfare context? *BioEssays*, 38(2), 201–212. <https://doi.org/10.1002/bies.201500127>
- Brodkin, J., Frank, D., Grippo, R., Hausfater, M., Gulinello, M., Achterholt, N., & Gutzen, C. (2014). Validation and implementation of a novel high-throughput behavioral phenotyping instrument for mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 224, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.12.010>

- Brønstad, A., Newcomer, C., Decelle, T., Everitt, J. I., Guillen, J., & Laber, K. (2016). Current concepts of harm-benefit analysis of animal experiments - Report from the AALAS-FELASA working group on harm-benefit analysis - Part 1. *Laboratory Animals*, 50(1), 1–20. <https://doi.org/10.1177/0023677216642398>
- Brown, L. A., Hasan, S., Foster, R. G., & Peirson, S. N. (2016). COMPASS: Continuous Open Mouse Phenotyping of Activity and Sleep Status. *Wellcome Open Research*, 1, 2. <https://doi.org/10.12688/WELLCOMEOPENRES.9892.2>
- Clark, T. S., Pandolfo, L. M., Marshall, C. M., Mitra, A. K., & Schech, J. M. (2018a). Body Condition Scoring for Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 57(6). <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000045>
- Clark, T. S., Pandolfo, L. M., Marshall, C. M., Mitra, A. K., & Schech, J. M. (2018b). Body Condition Scoring for Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 57(6). <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000045>
- Clarke, K. A., & Still, J. (1999). Gait Analysis in the Mouse. *Physiology & Behavior*, 66(5), 723–729. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00343-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00343-6)
- Clingerman, K. J., & Summers, L. (2012). Validation of a body condition scoring system in rhesus macaques (*Macaca mulatta*): Inter- and intrarater variability. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(1).
- Cobos, E. J., Ghasemlou, N., Araldi, D., Segal, D., Duong, K., & Woolf, C. J. (2012). Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: A nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. *Pain*, 153(4), 876–884. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.01.016>
- Costa, E. D., Stucke, D., Dai, F., Minero, M., Leach, M. C., & Lebelt, D. (2016). Using the horse grimace scale (HGS) to assess pain associated with acute laminitis in horses (*Equus caballus*). *Animals*, 6(8). <https://doi.org/10.3390/ani6080047>
- Dai, F., Leach, M., MacRae, A. M., Minero, M., & Dalla Costa, E. (2020). Does Thirty-Minute Standardised Training Improve the Inter-Observer Reliability of the Horse Grimace Scale (HGS)? A Case Study. *Animals*, 10(5), 781. <https://doi.org/10.3390/ani10050781>
- Dalla Costa, E., Minero, M., Lebelt, D., Stucke, D., Canali, E., & Leach, M. C. (2014). Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. *PLoS ONE*, 9(3), e92281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092281>
- de Grauw, J. C., & van Loon, J. P. A. M. (2016). Systematic pain assessment in horses. In *Veterinary Journal* (Vol. 209, pp. 14–22). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.07.030>

- de Oliveira, F. A., Luna, S. P. L., do Amaral, J. B., Rodrigues, K. A., Sant'Anna, A. C., Daolio, M., & Brondani, J. T. (2014). Validation of the UNESP-Botucatu unidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cattle. *BMC Veterinary Research*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0200-0>
- Deacon, R. (2012). Assessing Burrowing, Nest Construction, and Hoarding in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, *59*. <https://doi.org/10.3791/2607>
- Deacon, R. M. J. (2009). Burrowing: A sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behavioural Brain Research*, *200*(1), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.01.007>
- Deacon, R. M. J., Raley, J. M., Perry, V. H., Nicholas, J., & Rawlins, P. (2001). *Burrowing into prion disease*. <https://journals.lww.com/neuroreport>
- Deakin, A. G., Buckley, J., AlZu'bi, H. S., Cossins, A. R., Spencer, J. W., Al'Nuaimy, W., Young, I. S., Thomson, J. S., & Sneddon, L. U. (2019). Automated monitoring of behaviour in zebrafish after invasive procedures. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45464-w>
- Descovich, K. A., Wathan, J., Leach, M. C., Buchanan-Smith, H. M., Flecknell, P., Farningham, D., & Vick, S. J. (2017). Facial expression: An under-utilized tool for the assessment of welfare in mammals. In *Altex* (Vol. 34, Issue 3). <https://doi.org/10.14573/altex.1607161>
- Deuis, J. R., Dvorakova, L. S., & Vetter, I. (2017). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>
- di Giminiani, P., Brierley, V. L. M. H., Scollo, A., Gottardo, F., Malcolm, E. M., Edwards, S. A., & Leach, M. C. (2016). The assessment of facial expressions in piglets undergoing tail docking and castration: Toward the development of the Piglet Grimace Scale. *Frontiers in Veterinary Science*, *3*(NOV). <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00100>
- Dülsner, A., Greweling-Pils, M., Hack, R., Krüger, C., Manthey, T., Paulin, N., Scherer, K., Schmelting, B., Schmidt, M., Siegeler, K., Weinert, H., & Wißmann, A. (2020). *Stellungnahme aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte Möglichkeiten der Belastungsbeurteilung im Tierversuch verfasst von*.
- Ellis, T., & Katsiadaki, I. (2021). Clarification of early end-points for refinement of animal experiments, with specific reference to fish. *Laboratory Animals*, *55*(3), 244–253. <https://doi.org/10.1177/0023677220971002>

- Evangelista, M. C., Monteiro, B. P., & Steagall, P. V. (2022). Measurement properties of grimace scales for pain assessment in nonhuman mammals: a systematic review. *Pain*, *163*(6), e697–e714. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002474>
- Evangelista, M. C., Watanabe, R., Leung, V. S. Y., Monteiro, B. P., O’Toole, E., Pang, D. S. J., & Steagall, P. V. (2019). Facial expressions of pain in cats: the development and validation of a Feline Grimace Scale. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55693-8>
- Feigin, A. (2004). *Evidence from Biomarkers and Surrogate Endpoints*.
- Ferreira, J. M., Fé, L., Jorge, S., Monteiro, S. M., Anna, I., Olsson, S., & Valentim, A. M. (n.d.). *Anesthesia Overdose Versus Rapid Cooling for Euthanasia of Adult Zebrafish*. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27432v1>
- Ferreira, J. M., Jorge, S., Félix, L., Morello, G. M., Olsson, I. A. S., & Valentim, A. M. (2022). Behavioural Aversion and Cortisol Level Assessment When Adult Zebrafish Are Exposed to Different Anaesthetics. *Biology*, *11*(10). <https://doi.org/10.3390/biology11101433>
- Firth, A. M., & Haldane, S. L. (1999). Development of a scale to evaluate postoperative pain in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *214*(5).
- Flecknell, P. (2023). *Laboratory Animal Anaesthesia and Analgesia, 5th Edition* (5th ed.). Academic Press.
- Franco, N. H., Correia-Neves, M., & Olsson, I. A. S. (2012). How “Humane” Is Your Endpoint?—Refining the Science-Driven Approach for Termination of Animal Studies of Chronic Infection. *PLoS Pathogens*, *8*(1), e1002399. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002399>
- Franco, N. H., Gerós, A., Oliveira, L., Olsson, I. A. S., & Aguiar, P. (2019). ThermoLabAnimal – A high-throughput analysis software for non-invasive thermal assessment of laboratory mice. *Physiology & Behavior*, *207*, 113–121. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2019.05.004>
- Gallo, M. S., Karas, A. Z., Pritchett-Corning, K., Garner Guy Mulder, J. P., & Gaskill, B. N. (2020). Tell-tale TINT: Does the Time to Incorporate into Nest Test Evaluate Postsurgical Pain or Welfare in Mice? *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, *59*(1), 37–45. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000044>
- Gaskill, B. N., Gordon, C. J., Pajor, E. A., Lucas, J. R., Davis, J. K., & Garner, J. P. (2012). Heat or insulation: Behavioral titration of mouse preference for warmth or access to a nest. *PLoS ONE*, *7*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032799>

- Gaskill, B. N., Gordon, C. J., Pajor, E. A., Lucas, J. R., Davis, J. K., & Garner, J. P. (2013). Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. *Physiology and Behavior*, *110–111*, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.12.018>
- Gaskill, B. N., Karas, A. Z., Garner, J. P., & Pritchett-Corning, K. R. (2013). Nest Building as an Indicator of Health and Welfare in Laboratory Mice. *Journal of Visualized Experiments*, *82*. <https://doi.org/10.3791/51012>
- Gaskill, B. N., & Pritchett-Corning, K. R. (2016). Nest building as an indicator of illness in laboratory mice. *Applied Animal Behaviour Science*, *180*, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.04.008>
- Gjendal, K., Ottesen, J. L., Olsson, I. A. S., & Sørensen, D. B. (2020). Effect of Repeated Exposure to Isoflurane on Nest Building and Burrowing in Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, *59*(1), 30–36. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000027>
- Gleerup, K. B., Andersen, P. H., Munksgaard, L., & Forkman, B. (2015). Pain evaluation in dairy cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, *171*. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.023>
- Gleerup, K. B., Forkman, B., Lindegaard, C., & Andersen, P. H. (2015). An equine pain face. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, *42*(1). <https://doi.org/10.1111/vaa.12212>
- Gong, S., Miao, Y. L., Jiao, G. Z., Sun, M. J., Li, H., Lin, J., Luo, M. J., & Tan, J. H. (2015). Dynamics and Correlation of Serum Cortisol and Corticosterone under Different Physiological or Stressful Conditions in Mice. *PLOS ONE*, *10*(2), e0117503. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0117503>
- Grace, P. M., Strand, K. A., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2014). Suppression of voluntary wheel running in rats is dependent on the site of inflammation: Evidence for voluntary running as a measure of hind paw-evoked pain. *Journal of Pain*, *15*(2), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.10.001>
- Guesgen, M. J., Beausoleil, N. J., Leach, M., Minot, E. O., Stewart, M., & Stafford, K. J. (2016). Coding and quantification of a facial expression for pain in lambs. *Behavioural Processes*, *132*. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.09.010>
- Häger, C., Biernot, S., Buettner, M., Glage, S., Keubler, L. M., Held, N., Bleich, E. M., Otto, K., Müller, C. W., Decker, S., Talbot, S. R., & Bleich, A. (2017). The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep. *PLoS ONE*, *12*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175839>

- Häger, C., Keubler, L. M., Biernot, S., Dietrich, J., Buchheister, S., Buettner, M., & Bleich, A. (2015). Time to Integrate to Nest Test Evaluation in a Mouse DSS-Colitis Model. *PLOS ONE*, *10*(12), e0143824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143824>
- Häger, C., Keubler, L. M., Talbot, S. R., Biernot, S., Weegh, N., Buchheister, S., Buettner, M., Glage, S., & Bleich, A. (2018). Running in the wheel: Defining individual severity levels in mice. *PLoS Biology*, *16*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006159>
- Hampshire, V., & Robertson, S. (2015). Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring. *Lab Animal*, *44*(7). <https://doi.org/10.1038/lablan.806>
- Hankenson, C., Ruskoski, N., Van Saun, M., Ying, G.-S., Oh, J., & Fraser, N. W. (2013). Weight Loss and Reduced Body Temperature Determine Humane Endpoints in a Mouse Model of Ocular Herpesvirus Infection. In *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* (Vol. 52, Issue 3). www.amazon.
- Harrison, D. J., Creeth, H. D. J., Tyson, H. R., Boque-Sastre, R., Isles, A. R., Palme, R., Touma, C., & John, R. M. (2020). Unified Behavioral Scoring for Preclinical Models. *Frontiers in Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00313>
- Hendriksen, C. F. M., & Morton, D. B. (1999). *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research: Proceedings of the International Conference, 22-25 November 1998, Zeist, the Netherlands*. Royal Society of Medicine Press.
- Hickman, D. L., & Swan, M. (2010). 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*, *49*(2).
- Hohlbaum, K., Bert, B., Dietze, S., Palme, R., Fink, H., & Thöne-Reineke, C. (2017). Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6J mice - Assessing the degree of distress. *PLoS ONE*, *12*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588>
- Hohlbaum, K., Bert, B., Dietze, S., Palme, R., Fink, H., & Thöne-Reineke, C. (2018). Systematic assessment of well-being in mice for procedures using general anesthesia. *Journal of Visualized Experiments*, *2018*(133). <https://doi.org/10.3791/57046>
- Holden, E., Calvo, G., Collins, M., Bell, A., Reid, J., Scott, E. M., & Nolan, A. M. (2014). Evaluation of facial expression in acute pain in cats. *Journal of Small Animal Practice*, *55*(12). <https://doi.org/10.1111/jsap.12283>
- Holton, L., Reid, J., Scott, E. M., Pawson, P., & Nolan, A. (2001). Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs. *Veterinary Record*, *148*(17). <https://doi.org/10.1136/vr.148.17.525>

- Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001>
- Jirkof, P., Fleischmann, T., Cesarovic, N., Rettich, A., Vogel, J., & Arras, M. (2013). Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Laboratory Animals*, 47(3), 153–161. <https://doi.org/10.1177/0023677213475603>
- Jirkof, P., Leucht, K., Cesarovic, N., Caj, M., Nicholls, F., Rogler, G., Arras, M., & Hausmann, M. (2013). Burrowing is a sensitive behavioural assay for monitoring general wellbeing during dextran sulfate sodium colitis in laboratory mice. *Laboratory Animals*, 47(4), 274–283. <https://doi.org/10.1177/0023677213493409>
- Jorge, S., Ferreira, J. M., Anna, I., Olsson, S., & Valentim, A. M. (n.d.). *Adult Zebrafish Anesthesia: A Study of Efficacy and Behavioral Recovery of Different Anesthetics*. <https://doi.org/10.1101/2021.02.23>
- Kahnau, P., Habedank, A., Diederich, K., & Lewejohann, L. (2020). Behavioral methods for severity assessment. *Animals*, 10(7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani10071136>
- Kandasamy, R., Calsbeek, J. J., & Morgan, M. M. (2016). Home cage wheel running is an objective and clinically relevant method to assess inflammatory pain in male and female rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 263, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.02.013>
- Kandasamy, R., Lee, A. T., & Morgan, M. M. (2017). Depression of home cage wheel running: a reliable and clinically relevant method to assess migraine pain in rats. *The Journal of Headache and Pain*, 18(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s10194-017-0721-6>
- Keating, S. C. J., Thomas, A. A., Flecknell, P. A., & Leach, M. C. (2012). Evaluation of EMLA Cream for Preventing Pain during Tattooing of Rabbits: Changes in Physiological, Behavioural and Facial Expression Responses. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044437>
- Keubler, L. M., Hoppe, N., Potschka, H., Talbot, S. R., Vollmar, B., Zechner, D., Häger, C., & Bleich, A. (2020). Where are we heading? Challenges in evidence-based severity assessment. *Laboratory Animals*, 54(1), 50–62. <https://doi.org/10.1177/0023677219877216>
- Klune, C. B., Larkin, A. E., Leung, V. S. Y., & Pang, D. (2019). Comparing the rat grimace scale and a composite behaviour score in rats. *PLoS ONE*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209467>
- Kurejova, M., Nattenmüller, U., Hildebrandt, U., Selvaraj, D., Stösser, S., & Kuner, R. (2010). An improved behavioural assay demonstrates that ultrasound vocalizations constitute a reliable indicator of chronic cancer pain and neuropathic pain. *Molecular Pain*, 6. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-18>

- Laflamme, D. (1997). Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. *Canine Practice-Nutrition*, 22(4).
- Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., Glick, S., Ingraio, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralish, M. L., Matsumiya, L., Sorge, R. E., Sotocinal, S. G., Tabaka, J. M., Wong, D., Van Den Maagdenberg, A. M. J. M., Ferrari, M. D., Craig, K. D., & Mogil, J. S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6). <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
- Leach, M. C., Allweiler, S., Richardson, C., Roughan, J. V., Narbe, R., & Flecknell, P. A. (2009). Behavioural effects of ovariohysterectomy and oral administration of meloxicam in laboratory housed rabbits. *Research in Veterinary Science*, 87(2). <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.02.001>
- Leach, M. C., Coulter, C. A., Richardson, C. A., & Flecknell, P. A. (2011). Are we looking in the wrong place? implications for behavioural-based pain assessment in rabbits (*Oryctolagus cuniculi*) and beyond? *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013347>
- Lecorps, B., Rödel, H. G., & Féron, C. (2016). Assessment of anxiety in open field and elevated plus maze using infrared thermography. *Physiology and Behavior*, 157, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.014>
- Leung, V. S. Y., Benoit-Biancamano, M. O., & Pang, D. S. J. (2019). Performance of behavioral assays: The Rat Grimace Scale, burrowing activity and a composite behavior score to identify visceral pain in an acute and chronic colitis model. *Pain Reports*, 4(2). <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000712>
- Lønbro, S., Wiggins, J. M., Wittenborn, T., Elming, P. B., Rice, L., Pampo, C., Lee, J. A., Siemann, D. W., & Horsman, M. R. (2019). Reliability of blood lactate as a measure of exercise intensity in different strains of mice during forced treadmill running. *PLoS ONE*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0215591>
- Luna, S. P. L., de Araújo, A. L., da Nóbrega Neto, P. I., Brondani, J. T., de Oliveira, F. A., dos Santos Azerêdo, L. M., Telles, F. G., & Trindade, P. H. E. (2020). Validation of the UNESP-Botucatu pig composite acute pain scale (UPAPS). *PLoS ONE*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233552>
- Lynne U. Sneddon. (2017). Pain in Laboratory Animals: A Possible Confounding Factor? *ATLA*, 45, 161–164.

- Martins, T., Valentim, A. M., Pereira, N., & Antunes, L. M. (2016). Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: A question of refinement. *Laboratory Animals*, 50(6), 476–488. <https://doi.org/10.1177/0023677216670686>
- McLennan, K. M., Miller, A. L., Dalla Costa, E., Stucke, D., Corke, M. J., Broom, D. M., & Leach, M. C. (2019). Conceptual and methodological issues relating to pain assessment in mammals: The development and utilisation of pain facial expression scales. In *Applied Animal Behaviour Science* (Vol. 217, pp. 1–15). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.06.001>
- Misha L Dunbar, E. M. D. M. R. A. and J. L. L. (2016). Validation of a Behavioral Ethogram for Assessing Postoperative Pain in Guinea Pigs (*Cavia porcellus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 55(1), 29–34.
- Mogil, J. S., Pang, D. S. J., Silva Dutra, G. G., & Chambers, C. T. (2020). The development and use of facial grimace scales for pain measurement in animals. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 116). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.07.013>
- Mota-rojas, D., Olmos-hernández, A., Verduzco-mendoza, A., Hernández, E., Martínez-burnes, J., & Whittaker, A. L. (2020). The utility of grimace scales for practical pain assessment in laboratory animals. In *Animals* (Vol. 10, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/ani10101838>
- Navarro, E., Mainau, E., & Manteca, X. (2020). Development of a facial expression scale using farrowing as a model of pain in sows. *Animals*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/ani10112113>
- Nunamaker, E. A., Davis, S., O'malley, C. I., & Turner, P. V. (2021). Developing recommendations for cumulative endpoints and lifetime use for research animals. In *Animals* (Vol. 11, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11072031>
- Nuno Emanuel Oliveira Silva, Pedro Henrique Esteves Trindade, Alice Rodrigues Oliveira, Marilda Onghero Taffarel, Maria Alice Pires Moreira, Renan Denadei, Paula Barreto Rocha, & Stello Pacca Loureiro Luna. (n.d.). *Correction: Validation of the Unesp-Botucatu composite scale to assess acute postoperative abdominal pain in sheep (USAPS)*.
- Olsson, I. A. S., J Nicol, C., Niemi, S. M., & Sandøe, P. (2019). From Unpleasant to Unbearable - Why and How to Implement an Upper Limit to Pain and Other Forms of Suffering in Research with Animals. *ILAR Journal*, 60(3), 404–414. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilz018>
- Otabi, H., Goto, T., Okayama, T., Kohari, D., & Toyoda, A. (2017). The acute social defeat stress and nest-building test paradigm: A potential new method to screen drugs for depressive-like symptoms. *Behavioural Processes*, 135, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.12.003>
- Oummadi, A., Meyer-Dilhet, G., Béry, A., Aubert, A., Barone, P., Mortaud, S., Guillemin, G. J., Menuet, A., & Laugeray, A. (2020). 3Rs-based optimization of mice behavioral testing: The

habituation/dishabituation olfactory test. *Journal of Neuroscience Methods*, 332, 108550. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108550>

Paull, D. R., Small, A. H., Lee, C., Palladin, P., & Colditz, I. G. (2012). Evaluating a novel analgesic strategy for ring castration of ram lambs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 39(5). <https://doi.org/10.1111/j.1467-2995.2012.00716.x>

Phythian, C. J., Hughes, D., Michalopoulou, E., Cripps, P. J., & Duncan, J. S. (2012). Reliability of body condition scoring of sheep for cross-farm assessments. *Small Ruminant Research*, 104(1–3). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.001>

Pratt, D., Fuchs, P. N., & Sluka, K. A. (2013). Assessment of avoidance behaviors in mouse models of muscle pain. *Neuroscience*, 248, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.058>

Prebble, J. L., Shaw, D. J., & Meredith, A. L. (2015). Bodyweight and body condition score in rabbits on four different feeding regimes. *Journal of Small Animal Practice*, 56(3). <https://doi.org/10.1111/jsap.12301>

Premoli, M., Memo, M., & Bonini, S. A. (2021). Ultrasonic vocalizations in mice: relevance for ethologic and neurodevelopmental disorders studies. *Neural Regeneration Research*, 16(6), 1158. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.300340>

Rambo, C. L., Mocelin, R., Marcon, M., Villanova, D., Koakoski, G., de Abreu, M. S., Oliveira, T. A., Barcellos, L. J. G., Piato, A. L., & Bonan, C. D. (2017). Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. *Physiology and Behavior*, 171, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.032>

Rathkolb, B., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Aigner, B., Wolf, E., & Angelis, M. H. de. (2013). Blood Collection from Mice and Hematological Analyses on Mouse Blood. *Current Protocols in Mouse Biology*, 3(2), 101–119. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.MO130054>

Ray, M. A., Johnston, N. A., Verhulst, S., Trammell, R. A., & Toth, L. A. (2010). Identification of markers for imminent death in mice used in longevity and aging research. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 49(3), 282–288.

Reid, J., Nolan, A. M., & Scott, E. M. (2018). Measuring pain in dogs and cats using structured behavioural observation. In *Veterinary Journal* (Vol. 236). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.04.013>

Reijgwart, M. L., Schoemaker, N. J., Pascuzzo, R., Leach, M. C., Stodel, M., De Nies, L., Hendriksen, C. F. M., Van Der Meer, M., Vinke, C. M., & Van Zeeland, Y. R. A. (2017). The composition and

initial evaluation of a grimace scale in ferrets after surgical implantation of a telemetry probe. *PLoS ONE*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187986>

Remeniuk, B., Sukhtankar, D., Okun, A., Navratilova, E., Xie, J. Y., King, T., & Porreca, F. (2015). Behavioral and neurochemical analysis of ongoing bone cancer pain in rats. *Pain*, 156(10), 1864–1873. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000218>

Renggaman, A., Choi, H. L., Sudiarto, S. I., Alasaarela, L., & Nam, O. S. (2015). Development of pig welfare assessment protocol integrating animal-, environment-, and management-based measures. *Journal of Animal Science and Technology*, 57(1). <https://doi.org/10.1186/s40781-014-0034-0>

Reolon, G. K., de Melo, G. M., da Rosa, J. G. dos S., Barcellos, L. J. G., & Bonan, C. D. (2018). Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 336, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.006>

Rita A Trammell and Linda A Toth. (2011). *Markers for Predicting Death as an Outcome for Mice Used in Infectious Disease Research*.

Rock, M., Karas, A., Gallo, M., Pritchett-Corning, K., & Gaskill, B. (2014). Housing condition and nesting experience do not affect the Time to Integrate to Nest Test (TINT). *Animal Welfare*, 23(4), 381–385. <https://doi.org/10.7120/09627286.23.4.381>

Rock, M. L., Karas, A. Z., Gartrell Rodriguez, K. B., Gallo, M. S., Pritchett-Corning, K., Karas, R. H., Aronovitz, M., & Gaskill, B. N. (2014). The Time-to-Integrate-to-Nest Test as an Indicator of Wellbeing in Laboratory Mice. In *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* (Vol. 53, Issue 1).

Rodin, B. E., & Kruger, L. (1984). Deafferentation in Animals as a Model for the Study of Pain: an Alternative Hypothesis. In *Brain Research Reviews* (Vol. 7).

Roughan, J. V., & Flecknell, P. A. (2006). Training in behaviour-based post-operative pain scoring in rats - An evaluation based on improved recognition of analgesic requirements. *Applied Animal Behaviour Science*, 96(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.06.012>

Roughan, J. V., Wright-Williams, S. L., & Flecknell, P. A. (2009). Automated analysis of postoperative behaviour: Assessment of homecagescan as a novel method to rapidly identify pain and analgesic effects in mice. *Laboratory Animals*, 43(1), 17–26. <https://doi.org/10.1258/la.2008.007156>

Russel, A. (1984). Body condition scoring of sheep. In *Practice*, 6(3), 91–93. <https://doi.org/10.1136/inpract.6.3.91>

- Sabrautzki, S., Miller, M., Kague, E., & Brielmeier, M. (2021). Welfare Assessment of Adult Laboratory Zebrafish: A Practical Guide. *Zebrafish*, *18*(4), 282–292. <https://doi.org/10.1089/zeb.2021.0021>
- Schwabe, K., Boldt, L., Bleich, A., van Dijk, R. M., Helgers, S. O. A., Häger, C., Nowakowska, M., Riedesel, A. K., Schönhoff, K., Struve, B., Wittek, J., & Potschka, H. (2020). Nest-building performance in rats: impact of vendor, experience, and sex. *Laboratory Animals*, *54*(1), 17–25. <https://doi.org/10.1177/0023677219862004>
- Silva, N. E. O. F., Trindade, P. H. E., Oliveira, A. R., Taffarel, M. O., Moreira, M. A. P., Denadai, R., Rocha, P. B., & Luna, S. P. L. (2020). Validation of the Unesp-Botucatu composite scale to assess acute postoperative abdominal pain in sheep (USAPS). *PLOS ONE*, *15*(10), e0239622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239622>
- Silva, N. E. O. F., Trindade, P. H. E., Oliveira, A. R., Taffarel, M. O., Moreira, M. A. P., Denadai, R., Rocha, P. B., & Luna, S. P. L. (2022). Correction: Validation of the Unesp-Botucatu composite scale to assess acute postoperative abdominal pain in sheep (USAPS). *PLoS One*, *17*(5), e0268305. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0268305>
- Sliepen, S. H. J., Diaz-Delcastillo, M., Koriath, J., Olsen, R. B., Appel, C. K., Christoph, T., Heegaard, A. M., & Rutten, K. (2019). Cancer-induced bone pain impairs burrowing behaviour in mouse and rat. *In Vivo*, *33*(4), 1125–1132. <https://doi.org/10.21873/invivo.11582>
- Sneddon, L. U. (2015). Pain in aquatic animals. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 218, Issue 7, pp. 967–976). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jeb.088823>
- Sneddon, L. U. (2019). Evolution of nociception and pain: Evidence from fish models. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 374, Issue 1785). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0290>
- Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., Mapplebeck, J. C. S., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J. J., King, O. D., & Mogil, J. S. (2011). The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain*, *7*. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-55>
- Sperry, M. M., Yu, Y. H., Welch, R. L., Granquist, E. J., & Winkelstein, B. A. (2018). Grading facial expression is a sensitive means to detect grimace differences in orofacial pain in a rat model. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32297-2>
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, *5*(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>

- Summers, L., Clingerman, K. J., & Yang, X. (2012). Validation of a body condition scoring system in rhesus macaques (*Macaca mulatta*): Assessment of body composition by using dual-energy X-ray absorptiometry. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(1).
- Sweet, H., Pearson, A. J., Watson, P. J., & German, A. J. (2013). A novel zoometric index for assessing body composition in adult rabbits. *Veterinary Record*, 173(15).
<https://doi.org/10.1136/vr.101771>
- Takayama-Ito, M., Lim, C.-K., Nakamichi, K., Kakiuchi, S., Horiya, M., Posadas-Herrera, G., Kurane, I., & Saijo, M. (2017). Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. *Biologicals*, 46, 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.12.007>
- Tappe-Theodor, A., King, T., & Morgan, M. M. (2019). Pros and Cons of Clinically Relevant Methods to Assess Pain in Rodents. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 100, pp. 335–343). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.03.009>
- Tétreault, P., Dansereau, M. A., Doré-Savard, L., Beaudet, N., & Sarret, P. (2011). Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiology and Behavior*, 104(3), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.05.015>
- Thomson, J. S., Al-Temeemy, A. A., Isted, H., Spencer, J. W., & Sneddon, L. U. (2019). Assessment of behaviour in groups of zebrafish (*Danio rerio*) using an intelligent software monitoring tool, the chromatic fish analyser. *Journal of Neuroscience Methods*, 328.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108433>
- Tomacheuski, R. M., Monteiro, B. P., Evangelista, M. C., Luna, S. P. L., & Steagall, P. V. (2021). Measurement properties of pain scoring instruments in farm animals: A systematic review protocol using the COSMIN checklist. *PLoS ONE*, 16(5 May).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251435>
- Toth, L. A. (2000). *Defining the Moribund Condition as an Experimental Endpoint for Animal Research*. <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/41/2/72/747769>
- Trammell, R. A., Cox, L., & Toth, L. A. (2012). Markers for Heightened Monitoring, Imminent Death, and Euthanasia in Aged Inbred Mice. *Comparative Medicine*, 62(3), 172–178.
<http://phenome.jax.org/>
- Tschoner, T. (2021). Methods for pain assessment in calves and their use for the evaluation of pain during different procedures—a review. In *Animals* (Vol. 11, Issue 5).
<https://doi.org/10.3390/ani11051235>

- Ullman-Culleré, M. H., & Foltz, C. J. (1999). Body condition scoring: A rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Laboratory Animal Science*, 49(3).
<https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/1999/00000049/00000003/art00018>
- Vatine, J.-J., Devor, M., Belfer, I., Raber, P., Dolina, S., & Seltzer, ev. (2000). *Preoperative open field behavior predicts levels of neuropathic pain-related behavior in mice*.
<https://www.elsevier.com/locate/neulet>
- Viscardi, A. V., Hunniford, M., Lawlis, P., Leach, M., & Turner, P. V. (2017). Development of a piglet grimace scale to evaluate piglet pain using facial expressions following castration and tail docking: A pilot study. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(APR).
<https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00051>
- Vullo, C., Barbieri, S., Catone, G., Graïc, J. M., Magaletti, M., Di Rosa, A., Motta, A., Tremolada, C., Canali, E., & Costa, E. D. (2020). Is the Piglet Grimace Scale (PGS) a useful welfare indicator to assess pain after cryptorchidectomy in growing pigs? *Animals*, 10(3).
<https://doi.org/10.3390/ani10030412>
- Wall, P. D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J. W., Schonfeld, D., Seltzer, Z., & Tomkiewicz, M. M. (1979). AUTOTOMY FOLLOWING PERIPHERAL NERVE LESIONS: EXPERIMENTAL ANAESTHESIA DOLOROSA. In *Pain* (Vol. 7).
- Weber, R. A., Proctor, W. H., Warner, M. R., & Verheyden, C. N. (1993). Autotomy and the sciatic functional index. *Microsurgery*, 14(5), 323–327. <https://doi.org/10.1002/micr.1920140507>
- Weegh, N., Fünér, J., Janke, O., Winter, Y., Jung, C., Struve, B., Wassermann, L., Lewejohann, L., Bleich, A., & Häger, C. (2020). Wheel running behaviour in group-housed female mice indicates disturbed wellbeing due to DSS colitis. *Laboratory Animals*, 54(1), 63–72.
<https://doi.org/10.1177/0023677219879455>
- Whittaker, A. L., Lymn, K. A., Nicholson, A., & Howarth, G. S. (2015). The assessment of general well-being using spontaneous burrowing behaviour in a short-term model of chemotherapy-induced mucositis in the rat. *Laboratory Animals*, 49(1), 30–39.
<https://doi.org/10.1177/0023677214546913>
- William S. Stokes. (2000). *Reducing Unrelieved Pain and Distress in Laboratory Animals Using Humane Endpoints*.
- Williams, W. O., & Baneux, P. (2022). Humane Intervention Points: Refining endpoint terminology to incorporate non-euthanasia intervention options to improve animal welfare and preserve experimental outcomes. *Laboratory Animals*, 56(5), 482–489.
<https://doi.org/10.1177/00236772221090801>

- Wilson, C., Dunford, K., Nichols, C., Callaway, H., Hakkesteeg, J., & Wicks, M. (2013a). Body condition scoring for Laboratory Zebrafish. *Animal Technology and Welfare*, 12(1).
- Wilson, C., Dunford, K., Nichols, C., Callaway, H., Hakkesteeg, J., & Wicks, M. (2013b). Body condition scoring for Laboratory Zebrafish. *Animal Technology and Welfare*, 12(1).
- Winn, C. B., Hwang, S. K., Morin, J., Blurette, C. T., Manickam, B., Jiang, Z. K., Giddabasappa, A., Liu, C. N., & Matthews, K. (2021). Automated monitoring of respiratory rate as a novel humane endpoint: A refinement in mouse metastatic lung cancer models. *PLoS ONE*, 16(9 September). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257694>
- Winzell, M. S., & Ahrén, B. (2004). The High-Fat Diet–Fed Mouse A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 53(suppl_3), S215–S219. https://doi.org/10.2337/DIABETES.53.SUPPL_3.S215
- Witzel, A. L., Kirk, C. A., Henry, G. A., Toll, P. W., Brejda, J. J., & Paetau-Robinson, I. (2014). Use of a novel morphometric method and body fat index system for estimation of body composition in overweight and obese dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(11). <https://doi.org/10.2460/javma.244.11.1279>
- Wodarski, R., Delaney, A., Ultenius, C., Morland, R., Andrews, N., Baastrup, C., Bryden, L. A., Caspani, O., Christoph, T., Gardiner, N. J., Huang, W., Kennedy, J. D., Koyama, S., Li, D., Ligocki, M., Lindsten, A., Machin, I., Pekcec, A., Robens, A., ... Rice, A. S. C. (2016). Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study. *Pain*, 157(10), 2350–2365. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000657>
- Zhang, H., Lecker, I., Collymore, C., Dokova, A., Pham, M. C., Rosen, S. F., Crawhall-Duk, H., Zain, M., Valencia, M., Filippini, H. F., Li, J., D'Souza, A. J., Cho, C., Michailidis, V., Whissell, P. D., Patel, I., Steenland, H. W., Virginia Lee, W. J., Moayedi, M., ... Bonin, R. P. (2021). Cage-lid hanging behavior as a translationally relevant measure of pain in mice. *Pain*, 162(5), 1416–1425. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002127>