



Europa-
Kommissionen

Pas på dyrene og gør forskningen bedre

DIREKTIV 2010/63/EU
OM BESKYTTELSE AF DYR, DER ANVENDES TIL
VIDENSKABELIGE FORMÅL



**RAMME FOR VURDERING AF
BELASTNINGSGRAD**

Hverken Europa-Kommissionen eller personer, der handler på vegne af Kommissionen, er ansvarlige for, hvorledes oplysningerne i det følgende anvendes.

Luxembourg: Den Europæiske Unions Publikationskontor, 2018

© Den Europæiske Union, 2018

Videreanvendelse tilladt med kildeangivelse.

Videreanvendelsesbestemmelserne for Europa-Kommissionens dokumenter er reguleret af afgørelse 2011/833/EU (EUT L 330 af 14.12.2011, s. 39).

Ved enhver anvendelse eller gengivelse af fotos eller andet materiale, der ikke er omfattet af EU's ophavsret, skal der indhentes tilladelse direkte fra indehaverne af ophavsrettighederne.

Print ISBN 978-92-79-80546-2 doi:10.2779/32783 KH-01-18-213-DA-C

PDF ISBN 978-92-79-80553-0 doi:10.2779/372380 KH-01-18-213-DA-N

Indholdsfortegnelse

Arbejdsdokument om en ramme for vurdering af belastningsgrad	1-20
Eksempler til at illustrere proceduren til klassificering efter belastningsgrad, dag til dag-vurderingen og vurderingen af konkret belastningsgrad	22-92

Nationale kompetente myndigheder for gennemførelsen af direktiv 2010/63/EU om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål

Arbejdsdokument om en ramme for vurdering af belastningsgrad

Bruxelles, den 11.-12. juli 2012

Kommissionen nedsatte en ekspertarbejdsgruppe for vurdering af forsøgenes belastningsgrad for at lette gennemførelsen af direktiv 2010/63/EU om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål. Alle medlemsstater og de vigtigste interesseorganisationer blev opfordret til at udpege eksperter til at deltage i arbejdet.

Ekspertarbejdsgruppen for vurdering af belastningsgraden mødtes to gange, nemlig i december 2011, hvor der var fokus på genetisk modificerede dyr, og i maj 2012, hvor man drøftede en generel ramme for vurdering af den konkrete belastningsgrad, som dyrene oplever i forsøgene.

Dette dokument er resultatet af arbejdet i forbindelse med de to møder i ekspertarbejdsgruppen, drøftelser med medlemsstaterne samt juridisk input fra Kommissionen vedrørende forståelsen af en ramme for vurdering af belastningsgrad, dens komponenter, deltagere samt arbejdsværktøjer og -metoder. Det blev godkendt af de nationale kompetente myndigheder for gennemførelsen af direktiv 2010/63/EU på deres møde den 11.-12. juli 2012.

Ansvarsfraskrivelse:

Følgende er tænkt som en vejledning for medlemsstaterne og andre, som er berørt af dette direktiv, til at opnå en fælles forståelse for bestemmelserne i direktivet. Alle kommentarer bør betragtes i forbindelse med direktiv 2010/63/EU om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål

Det er kun Den Europæiske Unions Domstol, som er berettiget til at fortolke EU-ret med juridisk bindende myndighed.

Indholdsfortegnelse

De relaterede artikler i direktiv 2010/63/EU	3
Generel baggrund.....	3
Generelle overvejelser ved vurdering af belastningsgrad	4
Overvejelser før forsøget	5
Indikatorer for belastningsgrad	6
Højniveauekategorier	6
Faktorer, som bør tages i betragtning ved vurderingen af den konkrete belastningsgrad.....	7
Hvordan sikres konsekvens i vurderingen og tildelingen af konkret belastningsgrad?	9
Udvikling af et forsøgsspecifikt vurderingsark	10
Konsekvens i vurderingen af konkret belastningsgrad	11
Hvem bør give input til vurderingen af den konkrete belastningsgrad?	12
Overvågningsværktøjer, medier og andre overvejelser	12
Bilag I.....	14
Ordliste for kliniske observationer.....	14
Bilag II	17
Baggrundslæsning, retningslinjer og onlineresourcer vedrørende vurdering af velfærden hos dyr, der anvendes i videnskabelige forsøg	17

De relaterede artikler i direktiv 2010/63/EU

- **Artikel 4, stk. 3** "Medlemsstaterne sikrer, at der sker forfinelse af opdræt, opstaldning og pasning og af forsøgsmetoder, således at eventuel smerte, lidelse, angst eller varigt mén for dyrene undgås eller begrænses mest muligt."
- **Artikel 15, stk. 1** "Medlemsstaterne sikrer, at alle forsøg i hvert enkelt tilfælde klassificeres som "terminale", "let belastende", "moderat belastende" eller "betydeligt belastende", idet ratingkriterierne i bilag VIII anvendes."
- **Artikel 16, stk. 1, litra d)** "det [genanvendelse]er i overensstemmelse med dyrlægeråd under hensyntagen til det, dyret har gennemlevet i sin levetid."
- **Artikel 54, stk. 2** "Medlemsstaterne indsamler og offentliggør hvert år statistiske oplysninger om anvendelsen af dyr til forsøg, herunder oplysninger om forsøgenes konkrete belastningsgrad og oprindelsen og arten af de ikke-menneskelige primater, der er anvendt til forsøg. ..."

Generel baggrund

Direktiv 2010/63/EU om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål, kræver, at der foretages en prospektiv vurdering vedrørende belastningsgraden af det enkelte forsøg i et projekt (artikel 15), og at belastningsgraden klassificeres, hvilket kan være som enten "terminal", "let belastende", "moderat belastende" eller "betydeligt belastende". Bilag VIII giver vejledning om de faktorer, der skal tages i betragtning ved en prospektiv vurdering af belastningsgrad, og angiver nogle eksempler i de enkelte kategorier af belastningsgrad.

Artikel 54 vedrørende indberetning af oplysninger kræver, at der med henblik på indsamling og offentliggørelse af statistiske oplysninger foretages indberetning af den konkrete belastningsgrad af smerte, lidelse, angst eller varigt mén, som oplevet af dyret (i modsætning til den fremadrettede vurdering eller forudsigelse af belastningsgraden, som foretages i forbindelse med projektevalueringen). Desuden lægges der meget stor vægt på den konkrete belastningsgrad fra eventuelle tidligere forsøg, når det skal afgøres, om et dyr kan genanvendes i nye forsøg eller ej (artikel 16).

Disse foranstaltninger giver mulighed for at forbedre kvaliteten af den videnskabelige forskning og velfærd via en prospektiv gennemgang af projektforslag, og ved at medtage den faktiske lidelse, som dyret oplever, opnås større gennemsigtighed og forståelse af videnskabelige forsøgs indvirkning på dyrevelfærden.

Primære fordele ved prospektiv vurdering, overvågning, vurdering og registrering af konkret belastningsgrad omfatter

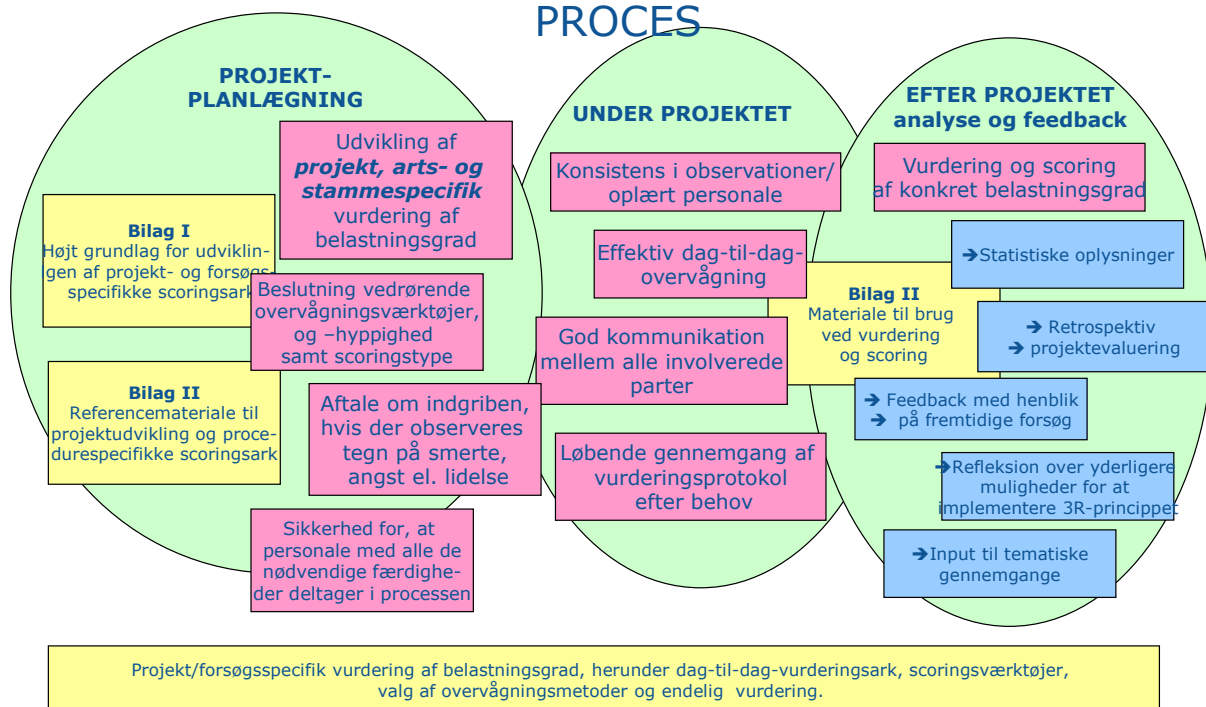
- Muligheder for navnlig at implementere forfinelse og reducere lidelser, selv om fremadrettede drøftelser generelt også vil give mulighed for at overveje, hvorvidt brug af dyr er nødvendig eller ej (erstatning), og om forsøgsdesignet er passende til at minimere brugen af dyr (begrænsning)

- Forbedret dyrevelfærd, f.eks. hvis lidelse identificeres og mindskes på et senere tidspunkt
- Forbedret gennemsigtighed, da statistikkerne bør afspejle de aktuelle velfærdsomkostninger for dyrene bedre
- Forbedret kommunikation mellem dem, som er ansvarlige for anvendelse, pasning og overvågning af dyrene
- Input til retrospektiv projektevaluering, når denne gennemføres (artikel 39)
- Forbedret videnskabelig datakvalitet på grund af bedre velfærd
- Øget viden om vurdering af belastningsgrad og kliniske tegn, hvilket vil fremme en større konsekvens i vurderingerne, forudsat at tilgange og resultater udbredes, f.eks. via tidsskrifter, diskussionsgrupper og møder
- Input til oplæringskurser for forskere, dyreteknikere og laboratoriedyrlæger, hvis resultaterne bruges til at angive eksempler
- Evidensbaserede oplysninger, der kan anvendes i prospektive vurderinger af skadevirkninger med henblik på fremtidige projekter.

Generelle overvejelser ved vurdering af belastningsgrad

Vurderingen af belastningsgrad i et forsøg bør være en **kontinuerlig proces** fra det indledende forsøgsdesign via den forsøgsspecifikke dag til dag-overvågning af dyrene i løbet af projektet til vurderingen af "konkret" belastningsgrad efter forsøgets afslutning, hvilket giver mulighed for at identificere yderligere forfinelser med henblik på fremtidige forsøg.

VURDERING AF BELASTNINGSGRAD – EN LØBENDE PROCES



Ved at anvende denne tilgang er der større mulighed for at sikre, at 3R-princippet, dvs. "Replacement, Reduction and Refinement" (erstatning, begrænsning og forfinelse), tages i betragtning og implementeres under hele forsøget, at kommunikationen blandt de involverede parter forbedres, og at der opnås større konsekvens.

Effektiv vurdering af belastningsgraden kræver

- En **"teamtilgang"** med input fra personer med forskellig ekspertise, erfaringer og prioriteringer, f.eks. forskere, dyreteknikere og pasningspersonale, den udpegede dyrlæge
- God planlægning
- Relevant løbende uddannelse og oplæring af alt involveret personale
- Dag til dag-systemer for vurdering af belastningsgraden, som er tilstrækkeligt skræddersyet til arten, stammen og projektet, herunder informerede og strukturerede observationer af dyr med passende intervaller (f.eks. øget hyppighed under og efter forsøg)
- Velinformerede effektive protokoller for vurdering af adfærd og kliniske tegn
- Analyse af observationerne for at kunne foretage en informeret vurdering af lidelsens art og niveau
- Bevidsthed om det enkelte forsøgs belastningsgrad, og hvilken foranstaltning der skal træffes, hvis denne nås eller overskrides
- En konsekvent tilgang til generelle vurderinger vedrørende den faktiske lidelse (let, moderat, betydelig) med henblik på statistisk rapportering
- Refleksion over, hvor effektivt 3R-princippet blev gennemført, og hvorvidt der kan foretages forbedringer med henblik på fremtidige forsøg.

Overvejelser før forsøget

Processen med henblik på at sikre, at belastningsgraden minimeres under de videnskabelige forsøg, begynder på **designstadiet** ved overvejelse af, hvorvidt det er nødvendigt og berettiget eller ej at bruge levende dyr for at opfylde de videnskabelige mål.

- Hvis brugen af levende dyr er nødvendig og berettiget, er det vigtigt at sikre, at der vælges en relevant model, og at forsøgsdesignet er solidt.
- Alle aspekter af forsøg, der kan forårsage smerte, lidelse, angst eller varigt mén bør identificeres, og det bør undersøges, hvordan virkningerne heraf kan begrænses mest muligt, f.eks. ved at konsultere litteraturen, kolleger, dyreteknikere, dyrlægen og dyrevelfærdsorganet, hvis det er relevant.
- Den anbefalede prospektive klassificering efter belastningsgrad, som forsøgene tildeles, bør baseres på den højest forventede belastningsgrad for et givent dyr i forbindelse med forsøget.

- Der bør udvikles en plan for observation af dyrene, som er egnet og skræddersyet til forsøget. En standardiseret terminologi, som kan forstås af alle involverede parter i forsøget, vil forbedre konsistensen i rapportering og fortolkning.
- Det er vigtigt at sikre, at der er tilstrækkeligt uddannet og kompetent personale til rådighed til at kunne udføre forsøget samt overvåge og passe dyrene.

Indikatorer for belastningsgrad

Der findes adfærdsmæssige og kliniske tegn, som kan bruges til at vurdere forsøgenes belastningsgrad gennem observation af buret (eller beholderen, indelukket osv.). Den terminologi, som benyttes til at beskrive disse, bør være forståelig for alle dem, der er involveret i anvendelsen, overvågningen og pasningen af dyrene. For ethvert system til vurdering af belastningsgraden er det vigtigt at have en grundig forståelse af den observerede arts (stamme, hvis relevant) normale sundhed, adfærd og velfærdsstatus.

Målet bør være at:

- opnå den bedst mulige livskvalitet for dyret
- sikre, at enhver lidelse på grund af videnskabelige forsøg registreres og
- minimeres, men

forbliver i overensstemmelse med de videnskabelige mål.

Ethvert system til vurdering af belastningsgraden bør effektivt påvise afvigelse fra en normal tilstand for sundhed og velfærd, hvilket gør det muligt for iagttageren at registrere og foretage en klar, konsekvent vurdering af det enkelte dyr.

Der kan anvendes en enkel, hierarkisk tilgang til at definere en protokol for vurdering af belastningsgrad, som er tilstrækkeligt skræddersyet til arten, stammen, individerne og forsøget. Processen med at definere en protokol til vurdering af dyrene ved observation af buret bør identificere eventuelle bivirkninger, som kan forekomme i løbet af dyrets levetid, herunder anbringelse, pasning, pleje og håndtering samt bivirkninger, som skyldes videnskabelige forsøg og konsekvenserne heraf. Hensyntagen til alle disse bivirkninger skal identificere indikatorer, som kan bruges til effektivt at vurdere dyrets velbefindende gennem observation af buret. Disse indikatorer bør skræddersys til den anvendte art, stamme og forsøgsprocedurer. De bør også være nemme at forstå, identificere og registrere konsekvent. Det er imidlertid vigtigt at sikre, at det også er muligt at fastholde og registrere eventuelle uventede bivirkninger, f.eks. i fri tekst.

Højniveauekategorier

Et sæt overordnede højniveauekategorier, som gælder på tværs af alle arter, er angivet nedenfor som udgangspunkt for udarbejdelse af en omfattende liste over specifikke indikatorer for hvert forsøg eller dyrepasningsprogram. Målet er at udarbejde en forsøgsspecifik liste over indikatorer for at minimere risikoen for manglende tegn på lidelse

uden at skabe et overdrevent komplekst system, som vil være unødvendigt bureaukratisk og tidskrævende.

Højniveauekategorierne er:

- Udseende
- Kropsfunktioner
- Miljø
- Adfærd
- Forsøgsspecifikke indikatorer
- Frie observationer (andre relevante observationer).

Indikatorer inden for hver af disse kategorier kan tilpasses til alle arter. De bør anvendes til at opstille en liste over observerbare karakteristika, som kan vurderes af en passende uddannet person med henblik på at foretage en bedømmelse af dyrets generelle sundhed og velfærdsstatus.

Disse indikatorer bør drøftes og udvælges i samarbejde med den/de person(er), som er ansvarlige for tilsynet med dyrenes velfærd, og med dyrevelfærdsorganet, hvis det er relevant. De bør derefter bruges til at udvikle forsøgsspecifikke fortegnelsessystemer med henblik på dag til dag-observation af buret, overvågning og vurdering.

Bilag I giver et eksempel på, hvordan disse højniveauekategorier kan underopdeles yderligere og anvendes til at udvikle passende observationskriterier ved hjælp af fælles beskrivende terminologi.

Bilag II indeholder oplysninger om retningslinjer og onlineresourcer, som kan bidrage til udviklingen af relevante velfærdsvurderinger for dyr, der indgår i videnskabelige forsøg.

Faktorer, som bør tages i betragtning ved vurderingen af den konkrete belastningsgrad

Det er vigtigt at bemærke, at afhængigt af den specifikke situation kan en række elementer have en positiv eller negativ indvirkning på belastningsgraden, og artsforskelle skal tages i betragtning.

Vurderingen af den konkrete belastningsgrad bør foretages i hvert enkelt tilfælde ved hjælp af de observationer, der er gjort af dyrene under dag til dag-overvågningen. Yderligere parametre, der er nødvendige i forbindelse med forsøget, kan også anvendes, når det er relevant. Eksempelvis kan det også være nødvendigt med ikke-observerbare indikatorer (f.eks. kropstemperatur, kropsvægt, biokemiske parametre eller biotelemetriske data såsom hjertefrekvens) i forbindelse med forsøget, og disse bør tages i betragtning ved vurderingen af belastningsgrad, hvis de kan give yderligere, relevante oplysninger.

Den konkrete belastningsgrad, som skal rapporteres for det enkelte dyr, bør være det højeste oplevede niveau i forsøget og ikke baseres på belastningsgraden ved afslutningen af forsøget. Vurderingen bør heller ikke anses som en enkel yderligere proces, f.eks. en række "let

belastende" forsøg = moderat belastningsgrad. Den bør baseres på en generel vurdering af dyrets oplevelser fra forsøgets start til forsøgets afslutning.

Listen nedenfor indeholder eksempler på den type elementer, der skal overvejes og vægtes, når den konkrete belastningsgrad vurderes.

Forsøg, teknik

- Kirurgisk/ikke-kirurgisk
- Fikseringsniveau og -varighed
- Sponering af analgetika/anæstesi, når enten den ene eller begge disse ellers ville være nødvendige
- Ny model eller nyt forsøg
- Miljømæssige elementer (herunder anbringelse og begrænsninger med hensyn til foder/vand)
- Stress/angst
- Gentagne forsøg og intervaller mellem disse (også under hensyntagen til hyppighed og kombination af indgreb "under tærskelværdierne")
- Genbrug eller fortsat brug.

Art, stamme, udviklingsstadiet, tidligere erfaring

- **Dette bør der lægges meget stor vægt på – det er nødvendigt at forstå artens og stammens (og undertiden individets) biologi og adfærd for at kunne forudsige og vurdere belastningsgraden effektivt**
- **Art og stamme**
- Dyrets oprindelse, f.eks. opdrættet til formålet, herreløst eller vildt
- Anvendelse (herunder tidligere anbringelsesforhold) og transport
- Genotype, fænotype, køn, alder, immunstatus
- Naturlig adfærd og biologi (f.eks. den relative betydning af forskellige sanser såsom primaters synssans og gnaveres lugtesans, og hvordan disse kan påvirkes i et laboratoriemiljø)
- Enkeltdyrs-/gruppeanbringelse – begrundelse for enkeltdyrsanbringelse af sociale dyr eller for at adskille dem fra etablerede grupper i en kortere eller længere periode
- Daglige rytmer, f.eks. virkningen af at udføre videnskabelige eller pasningsforsøg på natdyr i lysfasen
- Adskillelse fra moderen hos alle arter, herunder gnavere
- Kognitiv evne, bevidsthed, hukommelse, opfattelse af virkningerne af forsøgene.

Hyppighed, intensitet

- Der er ingen direkte forbindelse mellem hyppighed og belastningsgrad, dvs. øget hyppighed resulterer ikke nødvendigvis i større belastningsgrad. Grunden hertil er, at

gentagne forsøgs eller teknikkers virkning på belastningsgraden afhænger af en række faktorer, f.eks. intensiteten af hvert enkelt indgreb, arten og det pågældende individs oplevelse.

- Hvis indgreb gentages, er der mulighed for akklimatisering, hvilket kan reducere belastningsgraden, f.eks. hos en ikke-menneskelig primat, som underkastes let belastende forsøg. Omvendt kan gentagelse øge belastningsgraden, f.eks. på grund af forventning om et stressende forsøg eller start på hyperalgesi, hvis der er kirurgi involveret.
- Potentiale for positiv forstærkningstræning eller "belønninger" efter forsøg.
- Det højeste niveau af belastningsgrad bør registreres i stedet for "restitutionsniveauets" belastningsgrad.

Virkningens varighed

- Varighed er *forbundet* med intensitet (og *derfor med belastningsgrad*)
- Hvorvidt det er muligt at anvende tidlige humane eller videnskabelige endepunkter.

Effektiviteten af forfinelser

- Passende analgetika, anæstesi og postoperativ pasning
- Berigelse – både miljømæssig berigelse og anbringelse af sociale dyr i grupper
- Anbringelse, pasning og pleje – hvorvidt det er muligt at forfine disse i overensstemmelse med den aktuelle bedste praksis, eller hvorvidt forsøget nødvendiggør indespærring i mindre anlæg (f.eks. metabolismebure), åbne gulve (f.eks. riste) eller eksponering for miljøforhold, som kan forårsage stress
- Træning af dyret i at samarbejde eller fremme tilvænningen til forsøg
- Effektiviteten af vurderingsprotokoller (observation af buret).

Kumulativ belastningsgrad

- Det enkelte dyrs livserfaring, hvor begrænsninger vedrørende evnen til at forfine anbringelsen eller nødvendigheden af hyppig indfangning, håndtering og fiksering osv. kan påvirke belastningsgraden, skal tages i betragtning i forbindelse med et forsøg, som involverer en række trin/indgreb.
- Tidligere forsøg i tilfælde af genbrug.
- Livserfaringen, herunder elementer såsom anvendelse (f.eks. tidlig "fravænnning") og transport, skal tages i betragtning, hvis der overvejes genbrug.

Hvordan sikres konsekvens i vurderingen og tildelingen af konkret belastningsgrad?

Generelt er det nødvendigt med input i forsøgets designfase fra relevante forskere, dyreteknikere, dyrlæger og pasningspersonale, for at sikre at der er tilstrækkelige data tilgængelige til at træffe en informeret beslutning om konkret belastningsgrad ved forsøgets afslutning. Den endelige tildeling af en konkret belastningsgrad vil være resultatet af en analyse af de registreringer, der er foretaget i forbindelse med burobservationer af adfærd, kliniske tegn og andre relevante parametre.

Elementer, som bidrager til konsekvens, omfatter:

- Inddragelse af tværfaglig ekspertise, erfaringer og prioriteringer – dvs. en "teamtilgang"
- Oplæring i brugen af dag til dag-vurderingsprotokollen (herunder den fælles terminologi, som anvendes til at beskrive observationer)
- Ekspertviden om dyresundhed, velfærd og adfærd
- Regelmæssig gennemgang af resultater
- Kommunikation mellem alle dem, der er ansvarlige for udførelse af forsøget og overvågning af dyrene (top-down, bottom-up, mellem og inden for);
- Tilsyn (lokalt (f.eks. dyrevelfærdsorgan), regionalt, nationalt, EU).

Følgende vigtige spørgsmål bør tages i betragtning for at sikre konsekvens i vurderingen af den konkrete belastningsgrad:

Udvikling af et forsøgsspecifikt vurderingsark

- Vurderingsark, som er skræddersyet til arten, stammen og forsøget, bør udvikles og godkendes inden påbegyndelse af projektet.
- Alle tilgængelige, relevante oplysninger bør anvendes effektivt i udviklingen af forsøgsspecifikke vurderingsark, f.eks. tidligere erfaringer, resultater af *in vitro*- eller *in silico*-forsøg, litteratursøgninger, oplysninger fra pilotforsøg og observerede kliniske tegn hos mennesker eller andre dyr.
- Oplysninger om, hvilke parametre der skal observeres, og hvordan overvågningen af buret skal udføres, bør være tilgængelige.
- Den prospektive klassificering efter belastningsgrad vil delvist "diktere" det deltagelsesniveau, som er nødvendigt på det operative plan, hvorvidt en teamtilgang er påkrævet under overvågningen, og hvem der bør indgå i de faktiske observationer og registreringsprocessen. Dem, der har udviklet den forsøgsspecifikke vurderingsprotokol, bør udføre og/eller bekræfte den faktiske endelige klassificering efter belastningsgrad.
- Afhængigt af forsøgets kompleksitet kan særskilte vurderingsark for separate komponenter være nyttige, bl.a. standardiserede kirurgiske/perioperative pasningsark, som anvendes i kombination med vurderingen i den skræddersyede forsøgsprotokol.

- I nogle tilfælde kan der også være behov for, at de forsøgsspecifikke vurderingsark omfatter oplysninger, der er relevante for kolonistyring, herunder opdræt af genetisk modificerede dyr samt vækstdata.

Konsekvens i vurderingen af konkret belastningsgrad

Vurderingen af konkret belastningsgrad foretages ved forsøgets afslutning, og det kræver en vurdering af den konkrete belastningsgrad som oplevet af dyret på grundlag af dag til dag-vurderinger og under hensyntagen til de forsøg, der blev udført.

- En almindeligt anvendt tilgang er at definere niveauerne "let", "moderat" og "betydelig" for hver af de indikatorer, som anvendes i dag til dag-vurderingerne, og derefter foretage en bedømmelse af belastningsgraden af disse i hvert enkelt tilfælde.
- **Ligesom med dag til dag-overvågningen er det vigtigt, at de faktiske vurderingskriterier er skræddersyet til forsøget, arten og stammen.** F.eks. vil et vægttab på 10 % have meget forskellige virkninger for sundheden og velfærden hos en ungrotte i voksenalderen, en voksen mus med en hurtigt voksende tumor og en voksen hund.
- Hensyntagen til den periode, hvor nogle af disse indikatorer forekommer, er også en vigtig faktor, navnlig med hensyn til vægttab og foder-/vandindtag.

Der foretages en vurdering ved at gøre brug af de daglige vurderingsregistreringer under hensyntagen til det forsøg, som udføres på dyret, hvor længe bivirkningerne varede, og hvorvidt dyret blev genbrugt eller ej. Selv om dette uundgåeligt vil indebære en vis grad af subjektivitet, bør effektiv oplæring af iagttageren sigte mod at reducere en sådan subjektivitet.

Klassificering efter konkret belastningsgrad, hvis der findes døde dyr

- Hvis et dyr findes dødt, dvs. ikke aflivet, kan dette enten skyldes en forsøgsprocedure eller andre urelaterede årsager¹.
- Den konkrete belastningsgrad for dyr, som findes døde, skal rapporteres som "betydelig", medmindre der kan træffes en informeret beslutning om, at dyret ikke oplevede betydelig lidelse, inden det døde.
- Hvis det er usandsynligt, at der forud for dødsfaldet var tale om betydelig lidelse, bør klassificeringen efter den konkrete belastningsgrad afspejle de kendte erfaringer før dødsfaldet. Der skal tages passende hensyn til faktorer såsom overvågningshyppighed, brug af analgetika osv.

¹ Med henblik på statistisk rapportering bør konkret belastningsgrad primært vedrøre belastningsgraden af forsøgsprocedurer og ikke urelaterede hændelser såsom sygdomsudbrud eller oversvømmelse i buret. Disse typer hændelser vedrører sundhedsproblemer eller pasnings- og plejepraksisser og ikke forsøgsrelaterede skader. De skal imidlertid gøres til genstand for registrering, nærmere undersøgelse og opfølgning for at undgå tilbagefald.

- "(varigt) mén" kan kun opleves af et levende dyr.

Eksempler til at illustrere proceduren for klassificering efter belastningsgrad, dag til dag-vurderingen og den endelige vurdering af konkret belastningsgrad bør udvikles og gøres tilgængelige for det videnskabelige samfund.

Hvem bør give input til vurderingen af den konkrete belastningsgrad?

- Observation og registrering af virkninger er ofte særskilte procedurer i forhold til vurderingen af den konkrete belastningsgrad.
- Der bør fastlægges klare ansvarsområder for at sikre en effektiv dag til dag-overvågning af dyrene med passende støtte og tilsyn.
- Der bør være etableret en verifikationsprocedure for at fremme konsekvens, f.eks. ved at sammenligne vurderingsscorer foretaget af forskellige personer.
- Roller med hensyn til at observere og overvåge dyrene og foretage vurderingerne af den konkrete belastningsgrad bør være fleksible og justerbare på basis af det pågældende forsøgs kompleksitet og belastningsgrad – selv om det juridiske ansvar for at sikre påvisning og minimering af lidelse fortsat ligger hos den person, der er nævnt i projektgodkendelsen.
- Dyrevelfærdsorganer bør også spille en rolle på virksomhedsniveau for at sikre konsekvens.
- De nationale videnskabetiske komitéer og kompetente myndigheder kan også bidrage til at fremme konsekvens.

Overvågningsværktøjer, medier og andre overvejelser

- Brugen af scoringsark bør overvejes på projektplanlægningsstadiet.
- Scoringsark bør være så enkle som muligt og skræddersyet til forsøgstypen.
- Tidligere udviklede vurderingsark kan anvendes, hvis de er relevante for forsøget, arten og stammen.
- Elektronisk registrering kan bidrage til at sikre konsekvens og nem adgang til alle relevante oplysninger.
- Anvendelsen af standardiseret sprogbrug og terminologi anbefales.
- De registrerede data bør være så objektive som muligt.
- Fordelene og ulemperne ved (i) numerisk scoring og (ii) "binære" (hvis indikatorer er markeret som "til stede" eller "fraværende") observationssystemer bør vurderes i hvert enkelt tilfælde.
- Alle typer registreringer af observationer bør omfatte en mulighed for at tilføje fri tekst samt foruddefinerede indikatorer, således at uventede observationer kan registreres.

- Effektiv oplæring af alt relevant personale er vigtig og skal omfatte vurdering af belastningsgrad og velfærd samt overvågningsteknikker.
- Der skal udarbejdes en kommunikationsplan, som omfatter alt relevant personale, og den bør inkludere en mekanisme for hurtig kommunikation af uventede resultater til alle relevante personer samt, hvis det er relevant, til den kompetente myndighed.
- Overvågningen skal stå i forhold til de forventede virkninger – forsøg, som kan forårsage "betydelig" lidelse vil generelt kræve hyppigere og mere detaljeret overvågning.
- Der bør være klare kriterier for indgreb, f.eks. hvis der observeres særlige parametre, eller hvis man nærmer sig et foruddefineret lidelsesniveau. Alt relevant personale bør have kendskab til disse kriterier og vide, hvad de skal gøre, og hvem de skal kontakte, hvis disse skulle forekomme.

Hvis proceduren for vurdering af belastningsgraden gennemføres effektivt, vil dyrene og alt personale, der er involveret i deres pasning og anvendelse, have fordel heraf gennem forbedret dyrevelfærd, videnskabelig validitet og gennemsigtighed.

God intern og ekstern kommunikation vedrørende proceduren for belastningsvurdering og vedrørende anvendelsen af 3R-princippet vil give mere vidtrækkende fordele.

Bilag I

Ordliste for kliniske observationer

Effektiviteten af ethvert ark til vurdering af belastningsgrad afhænger af valget af velfærdsindikatorer, som:

- er let og påviseligt genkendelige
- er effektive med hensyn til at give gode velfærdsmålinger
- er relevante for det videnskabelige forsøg, arten og stammen (hvis relevant)
- er praktiske at udføre og forstyrrer ikke i overdreven grad dyret
- kan anvendes til ensartet måling, fortolkning og analyse.

En fælles tilgang til registrering af kliniske observationer er derfor et ønskeligt mål, da dette vil være en hjælp i forbindelse med udviklingen af sammenhængende tilgange til klassificering efter belastningsgrad. Dette vil gøre det nemmere at foretage sammenligninger af kliniske resultater fra forskellige forsøg og informere dem, der er involveret i vurderingen af belastningsgrad.

Observationerne struktureres i følgende seks højniveauekategorier:

Udseende/kropsfunktioner/miljø/adfærd/forsøgsspecifikke indikatorer/frie observationer

Højniveauekategorier	Fokusområder ved observation af dyr	Specifikke indikatorer, der skal overvåges
Udseende	Kropstilstand	Vægttab/-øgning
		Fed
		Tynd
		Kropstilstandsscore, hvis den foreligger
	Pels- og hudtilstand	Piloerektion

		Uplejet/manglende soignering
		Fedtet pels
		Hårtab
		Dehydrering – hævelse af hud
		Hudlæsioner – hævelse, skorper, skader/sår
		Farvning af fæces eller urin
	Flåd/sekreter	Øjne, næse, urogenital, porfyrintfarvning hos nogle arter, f.eks. rotter
	Øjne	Indsunkne eller "matte"
		Hellukkede/halvlukkede
		Skader på øjne (f.eks. sår på hornhinden)
	Mund	Savlen
		Bidanomali/forvoksede tænder
	Andet	Smertefuldt udtryk – f.eks. halvlukkede øjne og opsvulmet næse hos mus
		Sammensnøring af maven
		Hævet kropsdel, f.eks. udspilet mave
Kropsfunktioner	Respiration	Hurtig vejrtrækning (takypnø)
		Besværet vejrtrækning (hyperpnø)
		Meget besværet vejrtrækning (dyspnø)
		Hvæsende eller anden lyd under vejrtrækning
	Foder-/vandindtag	Øget/nedsat
	Kropstemperatur	Øget/nedsat, målt kropstemperatur, hvis muligt (f.eks. via mikrochip eller telemetrianordning, temperaturmåling med eller uden kontakt), farve på ekstremiteter hos gnavere
		Sansefunktioner
Miljø	Anlægsmiljø, herunder strøelse, redemateriale, berigelsesemner	Nedsat syn, hørelse eller balance
		Tilstedeværelse og konsistens af fæces
		Våd strøelse, f.eks. på grund af polyuri
		Forekomst af opkast eller blod
		Hvorvidt dyret anvender berigelsesemner, f.eks. redemateriale, byggeblokke

Adfærd	Social interaktion	Ændring i forhold til normalt temperament – nervøst/aggressivt samspil med andre dyr, ængstelse (f.eks. markante flugtreaktioner, kryben i skjul)
		Isoleret eller reserveret i forhold til andre dyr i en social gruppe
	Uønsket adfærd	Repetitiv/stereotyp adfærd
		Udtrækning af hår (gnavere), trikotillomani
		Øget aggression over for mennesker eller andre dyr
	Holdning og mobilitet	Anormal holdning
		Anormal gang; halten, manglende bevægelse/letargi/modvilje mod at flytte sig, hvis det stimuleres
		Ukoordinerede bevægelser
		Sammenfalden mave, skråtstillet hoved
	Andet	Rysten
		Krampeanfald/kramper/spasmer
		Vokalisation – spontan eller fremkaldt. <i>(Bemærk – nogle arter, f.eks. gnavere, vokaliserer normalt i det ultrasoniske område, så hørbare vokalisationer er særligt alvorlige. Kaninvokalisationer er generelt også ikke-hørbare for mennesker, medmindre dyret oplever angst).</i>
Forsøgsspecifikke indikatorer	Disse identificeres på baggrund af det enkelte projekt, dets potentielle bivirkninger og forventede indikatorer for disse.	I en EAE-model kan disse f.eks. omfatte tab af haletonus, svaghed i bagben, svaghed i forben, paralyse, tab af blærefunktion.
Frie observationer	Et vurderingsark for belastningsgrad bør altid give mulighed for at notere eventuelle observationer af uventede negative indvirkninger på dyrenes velfærd.	

Bilag II

Baggrundslæsning, retningslinjer og onlineresourcer vedrørende vurdering af velfærden hos dyr, der anvendes i videnskabelige forsøg

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006) *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits* kan downloades på adressen: <http://www.tinyurl.com/65ez5vh>

Uddannelsesmateriale "Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals" (AHWLA). Se <http://www.ahwla.org.uk/index.html>

Canadian Council on Animal Care (CCAC) *Welfare assessment*. Se <http://www.ccac.ca/>, klik på mikrowebstedet for de tre R'er, og søg derefter på "welfare assessment" (engelsk eller fransk)

Categorising the severity of scientific procedures on animals - Summary and reports from three round-table discussions redigeret af Jane A. Smith og Maggy Jennings på vegne af Boyd Group og RSPCA, juli 2004
Offentliggjort af RSPCA Research Animals Department

FELASA Working Group on the Reporting of Clinical Signs in Laboratory Animals (2012) – (i trykken)

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2008) *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press
Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009) *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press. Se http://dels.nas.edu/animal_pain/

Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, et al. (2006) Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* **40**: 323-340

Joint Working Group on Refinement (2011) A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals. *Laboratory Animals* **45**: 1-13

Leach MC et al. (2008) Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. *Animal Welfare* **17**: 161-170

National Centre for the Three Rs (NC3Rs) *Welfare assessment*. Se <http://www.nc3rs.org.uk/welfareassessment>

National Health and Medical Research Council (2008) *Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes: The Assessment and Alleviation of Pain and Distress in Research Animals*. Canberra: Australian Government. Se <http://www.nhmrc.gov.au>, og søg på "pain and distress"

Organisationen for Økonomisk Samarbejde og Udvikling (OECD) (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: OECD

Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, et al. Assessing the welfare of genetically altered mice. Fuld version findes på: <http://www.nc3rs.org.uk/gamice>. Resumé i *Laboratory Animals* **40**: 111-114

Workman P et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* **102**: 1555-1577, kan downloades på <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/?tool=pubmed>

1.2 Foreslåede nyttige tidsskrifter til yderligere læsning

<i>Applied Animal Behaviour Science</i>	http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html
<i>Animal Technology and Welfare</i>	http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm
<i>Animal Welfare</i>	http://www.ufaw.org.uk/animal.php
<i>Contemporary Topics in Laboratory Animal Science</i> og <i>Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct
<i>Lab Animal</i> og <i>Lab Animal Europe</i>	http://www.labanimal.com/labanimal/index.html http://www.labanimaleurope.eu/
<i>Laboratory Animals</i>	http://la.rsmjournals.com/

1.3 Foreslåede nøgleord til litteratursøgninger

Følgende nøgleord er nyttige ved søgning efter oplysninger om vurdering af belastningsgrad:

påvirke	vurdering af skadevirkninger	positive indikatorer	skala for belastningsgrad
dyrevelfærd	humane endepunkter	positiv velfærd	sygdomsadfærd
dyrs lidelse	behov	kvalitativ velfærdsvurdering	stress
vurdering	objektiv vurdering	livskvalitet	lidelse
ubehag	smerte	forfinelse	velfærdsvurdering
angst	smertevurdering	scoringsark	velfærdsindikator
skadesvurdering	smertemåling	scoringssystem	velfærdsresultater

Referencer vedrørende klassificering efter konkret belastningsgrad

CCAC (1998) *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research, Teaching and Testing*. Canadian Council on Animal Care, findes på: http://www.ccac.ca/en/_standards/guidelines (engelsk) og http://www.ccac.ca/fr/_normes/lignes_directrices (fransk)

FELASA Working Group on Pain and Distress (1994) Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory Animals* **28**: 97-112

Jones HRP, Oates J og Trussell BA (1999) An applied approach to the assessment of severity. I: Hendriksen CFM. & Morton DB (eds), *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. Proceedings of the International Conference, 22.-25. november 1998, Zeist, Nederlandene. Royal Society for Medicine Press Ltd., London s. 40-47

LASA /APC (2008) *Final Report of a LASA/APC Working Group to Examine the Feasibility of Reporting Data on the Severity of Scientific Procedures on Animals*. Findes på adressen: <http://www.lasa.co.uk/publications.html>

Morton, DB og Hau J (2011), kapitel 18: Welfare assessment and humane endpoints. I *Handbook of Laboratory Animal Science, 3rd Edition, Volume 1 Essential Principles and Practices*. Hau J og Schapiro, SJ (eds), CRC Press LLC, USA, s. 535-572.

Prescott MJ, Morton DB, Anderson D, Buckwell A, Heath S, Hubrecht R, Jennings M, Robb D, Ruane B, Swallow J og Thompson P (2004) Refining dog husbandry and care, Eighth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **38 suppl. 1**: S1:1-S1:94

Wolfensohn S og Lloyd M (2003) *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, 3rd Edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (4. udgave under udarbejdelse).

(Alle URL'er senest besøgt den 24. maj 2012).

Eksempler til at illustrere proceduren til klassificering efter belastningsgrad, dag til dag-vurderingen og vurderingen af konkret belastningsgrad

Bruxelles, den 11. januar 2013

Arbejdsdokumentet om en ramme for vurdering af belastningsgrad, som er udarbejdet af Kommissionens ekspertarbejdsgruppe og godkendt af de nationale kompetente myndigheder for gennemførelsen af direktiv 2010/63/EU om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål, på deres møde i juli 2012, anbefalede, at der blev udarbejdet eksempler til at illustrere proceduren til "klassificering efter belastningsgrad, dag til dag-vurderingen og den endelige vurdering af den konkrete belastningsgrad", og at disse blev gjort tilgængelige for det videnskabelige samfund.

I forlængelse heraf udarbejdede ekspertarbejdsgruppen en række eksempler for at vise, hvordan den i *arbejdsdokumentet* beskrevne procedure kan anvendes i forbindelse med forskellige forsøg. Disse skal hjælpe kompetente myndigheder, brugere, dyreteknikere, dyrlæger og andet relevant personale med at sikre, at smerte, lidelse og angst på effektiv vis forudsiges, anerkendes, lindres, hvis det er muligt, og vurderes konsekvent under forsøg. Dette dokument blev godkendt af de nationale kompetente myndigheder for gennemførelsen af direktiv 2010/63/EU på deres møde den 23.-24. januar 2013.

Det er afgørende, at der tages hensyn til en række vigtige faktorer ved anvendelse af disse eksempler:

- Det antages, at **der anvendes god praksis** under hele forsøget med hensyn til anbringelse, pasning og pleje, forfinelse af forsøg, uddannelse og oplæring, vurdering af kompetencer, hentning og anvendelse af aktuelle oplysninger om erstatning, begrænsning og forfinelse samt forsøgsdesign.

- Hensigten med den type scoringsark, der er medtaget i eksemplerne, er at **supplere – ikke erstatte – den vurdering, som foretages af uddannet, kompetent og empatisk personale**. Målet er at muliggøre en mere systematisk og objektiv observation, registrering og vurdering af lidelse, men ikke at tilsidesætte en professionel vurdering.
- Det enkelte eksempel vedrører en **hypotetisk, men realistisk situation**. Det ville ikke være hensigtsmæssigt at inkludere alle de oplysninger, som vil være tilgængelige i praksis, men der medtages tilstrækkelige oplysninger **til at forklare, hvordan proceduren blev anvendt**.
- Som angivet i *arbejdsdokumentet* er det vigtigt at **gennemtænke og skræddersy vurderingen af belastningsgraden** til arten, stammen og det udførte forsøg i den pågældende brugers virksomhed. På baggrund heraf vil ekspertgruppen **på det kraftigste fraråde at anvende** tabellerne og scoringsarksystemerne i eksemplerne, som de er og forefindes, **også selv om det måtte ske i forbindelse med de samme forsøg**. Alle protokoller vedrørende belastningsgrad bør gennemgås regelmæssigt for effektivitet og revideres, hvis det er relevant.
- **Eksemplerne er også underlagt revision**, da viden om smerte, lidelse og angst øges, og fordi der sker en ændring i tilgangene til vurdering af og klassificering efter belastningsgraden. Til hvert eksempel er der angivet en dato; se Europa-Kommissionens websted http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/interpretation_en.htm vedrørende opdateringer.
- **Feedback hilses velkommen** vedrørende eksemplernes brugbarhed og forslag til yderligere forsøg, der skal medtages; send kommentarer til env-laboratory-animals@ec.europa.eu

Indholdsfortegnelse

Model 1 – Onkologiforsøg	25
<i>Model 1(a) – Bevarelse af humane tumorcellelinjer i immunkompromitterede nøgne mus</i>	26
<i>Model 1(b) – Effekt af nye farmaceutiske stoffer på tumorvækst</i>	32
Model 2 – Eksperimentel autoimmun encephalomyelitis (EAE) i mus	40
Model 3 – Arthritis	49
Model 4 – Slagtilfælde	60
Model 5 – Produktion af polyklonale antistoffer i kaniner	73
Model 6 – Produktion og bevarelse af genmodificerede dyr	80
<i>Model – GeneA^{tm1a(Funding)Lab}</i>	82
<i>Model –Tg(GeneB)^{Labcode}</i>	88
<i>Model – GeneC^{tm1a(Funding)Lab}</i>	90

Illustrative eksempler på proceduren til klassificering efter belastningsgrad

Model 1 – Onkologiforsøg (1a og 1b)

Senest opdateret: 05/02/2013

1. Dyremodeller i onkologiforsøg (1a og 1b)

Generel baggrund: Evaluering af nye anticancermedler in vivo

Cancer er en hyppig dødsårsag i den udviklede del af verden, og aldringen af den menneskelige befolkning vil uundgåeligt medføre en stigende sygdomsbyrde. I 2010 lå sandsynligheden for cancerrelaterede dødsfald i EU inden 70-års alderen på ca. en ud af syv. Der er derfor et behov for at udvikle nye, mere effektive lægemidler til behandling af cancer. Fordelene herved vil være en reduceret cancerdødelighed og forbedret livskvalitet for dem, der udvikler cancer i fremtiden.

Dyremodeller anvendes i øjeblikket i forbindelse med udviklingen af nye lægemidler til behandling af cancer som et supplement til computermodellering og in vitro-metoder såsom cellekulturanalyser. Når stoffernes selektivitet og aktivitet er blevet bekræftet in vitro, er det kun de stoffer, som udviser gunstige karakteristika, der testes på dyr. Der gennemføres forsøg til vurdering af tolerabilitet med små grupper af dyr for at fastslå den maksimalt tolererede dosis og egnetheden af det pågældende dosisregimen før større forsøg med henblik på vurdering af effekt.

Belastningsgraden af virkningerne på dyrene afhænger af modellerne og formålet med forsøget. Eksempelvis bør bevarelsen af tumorcellelinjer ikke have en signifikant indvirkning på dyrevelfærden, forudsat at der udvises god praksis under hele forsøget, herunder tilstrækkelig overvågning af dyrene og anvendelse af tidlige humane endepunkter. Forsøg med det formål at vurdere ny behandling i metastatiske modeller vil dog sandsynligvis give anledning til mere signifikante velfærdsproblemer på grund af udviklingen af flere tumorer og de sandsynlige bivirkninger af cytotoxiske stoffer.

Der er offentliggjort en række retningslinjer for velfærd og anvendelsen af dyr inden for cancerforskning, f.eks. i British Journal of Cancer (Workman et al. 2010). Disse giver et detaljeret overblik over de forskellige dyretumormodeller, som er tilgængelige, hvordan disse påvirker dyrene, og hvordan dyrenes lidelser kan minimeres.

Der gives to eksempler her, som illustrerer onkologiske dyremodeller med forskellige klassificeringer efter belastningsgrad.

Reference

Workman et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* (2010) 102(11), 1555-1577; kan downloades gratis på adressen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/pdf/6605642a.pdf>

1 (a) – Bevarelse af humane tumorcellelinjer i immunkompromitterede nøgne mus

Nogle humane tumorcellelinjer kopieres ikke pålideligt i kulturer, og der er et lejlighedsvist behov for at karakterisere og bevare humane cellelinjer i en xenogen in vivo-model.

Forsøg

30 nøgne BALB/C-hanmus injiceres subkutan i den venstre flanke med 10^3 HCT 116-cellesuspension i 0,1 ml saltvand. Dyrene placeres i grupper i individuelt ventilerede bure med strøelse og redemateriale. Dyrevelfærden vurderes dagligt, og dyrene vejes hver 4. dag. Individuerne palperes for tumorer hver 2. dag, og eventuelle påviselige tumorer måles også med skydelærer hver 2. dag. Dyrene aflives på dag 15 med henblik på høstning af tumorer.

Indledende prospektiv vurdering og overvejelse af specifikke forfinelser og humane endepunkter

Hvad indebærer forsøget for dyrene?	Hvad kommer dyrene til at opleve? Hvor megen lidelse kan der være forbundet hermed? Hvad kan gøre lidelsen værre?	Hvordan begrænses lidelsen til et minimum?	
	Bivirkninger	Metodologi og indgreb	Endepunkter
Bevarelse af immunkompromitterede mus	Dyrene er disponeret for infektion	Anbragt i individuelt ventilerede bure og pasningspraksisser, som er skræddersyet til at minimere risikoen for kontaminering Dyrene anbringes i grupper, og der anvendes miljøberigelsesmetoder for at reducere stressfaktorer Pasning og pleje gennemgås, hvis der observeres tegn på angst, aggression eller anormal adfærd	Ethvert dyr, som viser tegn på dårligt helbred, bliver aflivet
Subkutan injektion af tumorceller	Forbigående ubehag efter injektion	Injektion udføres kun én gang Der injiceres en passende mængde (maksimalt 0,2 ml) Dyrene overvåges nøje i perioden umiddelbart efter injektionen	Dyrene aflives på en human måde, hvis der efter injektion observeres mere end let angst eller ubehag uden hurtig restitution (meget sjældent)

Tumorstørrelse	Kan forårsage ubehag eller påvirke normal adfærd eller bevægelsesevne Tumor kan blive inficeret eller kan ulcerere (men bør ikke metastasere)	Tumorstørrelse måles hver 2. dag Overvågningsark vil omfatte nøje observation af holdning og gang samt af tumorstørrelse og tilstand	Dyret aflives, hvis tumoren ulcererer eller interfererer med normal adfærd, holdning eller bevægelsesevne, eller hvis den er større end 1,2 cm i diameter (Workman et al. 2010)
-----------------------	--	---	---

Analyse

Dyrene forventes kun at opleve **MILDT** ubehag og aflives, hvis der opstår helbreds- eller velfærdsproblemer, som ligger over dette niveau.

En prospektiv vurdering af belastningsgraden som LET BELASTENDE er derfor hensigtsmæssig.

Et eksempel på et udfyldt observationsark er medtaget i slutningen af denne model

Kliniske observationer

Der blev udviklet et grundlæggende scoringsark, som fokuserede på tumorstørrelse, kropsvægt, holdning og gang, fordi der kun var en forventning om få andre kliniske tegn. Der blev afsat plads til uventede kliniske tegn, som kunne registreres som fri tekst. En angivelse af Ingen påvist anormalitet bekræfter, at dyrene er kontrolleret, og at der ikke er konstateret nogen anormalitet. Et eksempel er angivet nedenfor.

Resultater

- Der blev ikke registreret noget væsentligt vægttab hos nogen af dyrene.
- Hos 5 dyr blev der ikke konstateret nogen tumorudvikling.
- Hos 25 dyr udvikledes tumorer i flanken. Disse tumorer påvirkede ikke den normale adfærd og målte maksimalt 1 cm på dag 14, hvor dyrene blev aflivet i henhold til forsøgsprotokollen med henblik på høstning af tumorer
- Der blev konstateret aggressiv adfærd og kamp i ét bur; et dyr havde bidesår på halen og ryggen og blev anbragt i et individuelt bur. Sårene blev desinficeret lokalt hver dag, indtil de var helet, og dyret blev holdt i dette bur indtil afslutningen af forsøget.

Vurdering af konkret belastningsgrad

- 29 dyr afsluttede forsøget med ikke mere end mild lidelse relateret til injektion og tumorvækst.
Den konkrete belastningsgrad for disse blev vurderet som værende **LET BELASTENDE**. 1 dyr havde bidesår, som blev behandlet effektivt. Hos dette dyr var der blevet forårsaget ekstra lidelse som følge af aggression, men dette var ikke relateret til forsøget. Disse hændelser blev håndteret effektivt og lidelsen begrænset. Selv om niveauet for den lidelse, som dyret oplevede, var moderat, da denne hændelse ikke var relateret til forsøget, blev den faktiske forsøgsrelaterede belastningsgrad, der skulle rapporteres, anset for at være **LET BELASTENDE**

Eksempel på observationsark (udfyldt for et hypotetisk tilfælde)

Tumorvækst i nøgne mus – forsøgs- og observationsark				
Bur 1 – mus nr. 1-5				
Dato	Forsøg	Tumorstørrelse (cm)	Vægt (g)	Kliniske observationer – kontrollér holdning og gang nøje
28/02	Subkutan injektion		1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	Ingen tegn på velfærdsproblemer efter injektioner
01/03				Ingen påvist anormalitet
02/03	Palpering			Ingen påvist anormalitet

03/03				Ingen påvist anormalitet
04/03	Palpering		1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	Ingen påvist anormalitet
05/03				Ingen påvist anormalitet
06/03	Palpering			Ingen påvist anormalitet
07/03				Nogen aggressiv adfærd; ingen synlige sår
08/03	Tumormåling	1 – 0,1 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – ingen tumor 5 – 0,2	1- 21 2- 22 3- 21 4 -22 5- 22	Mus 1 havde bidesår på hale og ryg – lokal behandling; flyttet til enkeltdyrsanbringelse. Redekasse tilvejebragt til enkeltdyrsanbringelse, men fjernet fra buret med resterende fire mus, i tilfælde af at dette udløste aggression
09/03				Sår desinficeret på mus 1, heler godt; ingen tegn på aggression mellem resterende dyr

10/03	Tumormåling	1 – 0,2 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – ingen tumor 5 – 0,2		Sår desinficeret på mus 1
11/03				Sår desinficeret på mus 1
12/03	Tumormåling	1 – 0,4 2 – 0,3 3 – 0,3 4 – ingen tumor 5 – 0,5	1- 22 2- 22 3- 21 4- 21 5- 23	Sår helet på mus 1, desinfektion afbrudt.
13/03				Ingen påvist anormalitet
14/03	Aflivning og høstning af tumor.			

1 (b) Effekt af nye farmaceutiske stoffer på tumorvækst – flertrinsforsøg

Formålet med forsøget er at vurdere effekten af nye stoffer på reduktion eller standsning af tumorcellers vækst. Tumoren skal være veletableret, inden behandling kan påbegyndes (normalt er 0,5 cm i diameter tilstrækkeligt) – på grund af forsøgets varighed kan nogle tumorer udvikle sig op til maksimalt 1,2 cm i diameter, sædvanligvis i vehikelkontrolgruppen. Der er sandsynlighed for, at cytotoksiske stoffer kan have uønskede indvirkninger på dyrenes velfærd.

30 nøgne BALB/C-hanmus injiceres med langsomt voksende tumorceller (0,1 ml). Dyrevelfærden vurderes dagligt, og dyrene vejes én gang om ugen i 3 på hinanden følgende uger. Tumorvæksten måles med skydelærer på dag 7 og dag 14; på dag 20 måles tumorerne igen, dyrene randomiseres, og behandling påbegyndes i form af to daglige intraperitoneale injektioner i 7 dage.

Indledende prospektiv vurdering og overvejelse af specifikke forfinelser og humane endepunkter

Hvad indebærer forsøget for dyrene?	Hvad kommer dyrene til at opleve? Hvor megen lidelse kan der være forbundet hermed? Hvad kan forværre lidelsen?	Hvordan begrænses lidelsen til et minimum?	
	Bivirkninger	Metodologi og indgreb	Endepunkter
Bevarelse af immunkompromitterede mus	Dyrene er disponeret for infektion	Anbragt i individuelt ventilerede bure og pasningspraksisser, som er skræddersyet til at begrænse risikoen for kontaminering Dyrene anbringes i grupper, og der anvendes miljøberigelsesmetoder for at reducere stressfaktorer	Ethvert dyr, som viser tegn på interkurrent sygdom, bliver aflivet.

		Pasning og pleje gennemgås, hvis der observeres tegn på angst, aggression eller anormal adfærd	
Subkutan injektion af tumorceller	Forbigående ubehag efter injektion	Injektion udføres kun én gang Der injiceres en passende mængde (maksimalt 0,2 ml) Dyrene overvåges nøje i perioden umiddelbart efter injektionen	Dyrene aflives på en human måde, hvis der efter injektion observeres mere end let angst eller ubehag uden hurtig restitution (meget sjældent)
Tumorstørrelse	Kan forårsage ubehag eller påvirke normal adfærd eller bevægelsesevne Tumor kan blive inficeret eller kan ulcerere (men bør ikke metastasere)	Daglig observation af dyr, regelmæssig overvågning af generel sundhed og tumorstørrelse Overvågningsark vil omfatte nøje observation af holdning og gang samt af tumorstørrelse og tilstand Farmaceutiske indgreb påbegyndes, når tumoren har en diameter på 0,5 cm (målt med skydelærer)	Dyret aflives, hvis tumoren ulcererer eller interfererer med normal adfærd, holdning eller bevægelsesevne, eller hvis den er større end 1,2 cm i diameter (Workman et al. 2010)
Intraperitoneal injektion af nyt farmaceutisk stof	Forbigående ubehag efter injektion Cytotoksiske stoffer kan forårsage diarré, vægttab, anoreksi eller letargi	Dyrene overvåges nøje i perioden umiddelbart efter injektionen Maksimalt volumen på 10 ml/kg dagligt i 7 dage	Dyr aflives, hvis vægttabet overstiger 20 % af den indledende kropsvægt. Desuden aflives dyr, som ikke spiser eller har diarré i mere end 48 timer

		Der anvendes laveste dosisniveauer (fastsat efter dosisafhængige forsøg) Der anvendes et klinisk scoringssystem til vurdering af velfærd	Der fastsættes en øvre grænse for en klinisk score som humant endepunkt
--	--	---	---

Analyse

Som en konsekvens af tumorstørrelsen, det øgede potentiale for ulceration, injektionernes hyppighed og bivirkningerne af de pågældende stoffer er en **prospektiv vurdering af belastningsgraden som MODERAT BELASTENDE** hensigtsmæssig i dette tilfælde.

Kan grænsen for belastningsgraden være LET BELASTENDE?

Højest usandsynligt, medmindre de videnskabelige mål kan nås med tidligere endepunkter, f.eks. reduktion af den maksimale tumorstørrelse. Det ville også indebære injektion af stoffer ved en dosis, som er kendt for ikke at forårsage nogen signifikante kliniske bivirkninger. Under disse omstændigheder vil belastningsgraden **LET BELASTENDE** kunne anses for at være hensigtsmæssig.

Kliniske observationer

Et eksempel på et observationsark og et prøvescoringsark er medtaget i slutningen af denne model

Resultater

Af de 30 BALB/C-hanmus blev 25 anvendt til vurdering af effekt; 10 dyr fik stof B ved dosis H, 10 stof B ved dosis X og 5 stof C ved dosis Y

Vurdering af konkret belastningsgrad

- 3 dyr udviklede ikke tumorer og blev aflivet som uanvendelige til forsøget – **LET BELASTENDE**
- 2 dyr udviklede ulceration ved tumorinjektionsstedet inden påbegyndelse af behandlingen og blev aflivet. – **MODERAT BELASTENDE**
- 10 dyr, som fik stof B ved dosis H, havde tumorer, som forblev relativt små, ikke noget signifikant vægttab og ingen kliniske tegn – **LET BELASTENDE**
- 7 dyr, som fik stof B ved dosis X, havde en reduktion i tumorstørrelse, et vægttab på 15 % og tynd afføring, men blev holdt indtil afslutningen af forsøget – **MODERAT BELASTENDE**
- 3 dyr, som fik stof B ved dosis X, havde en reduktion i tumorstørrelse, et vægttab på 15 %, tynd afføring, anoreksi og blev meget apatiske; disse dyr blev aflivet på en human måde på dag 25 – **BETYDELT BELASTENDE**
- 5 dyr, som fik stof C ved dosis Y, havde en fortsat vækst i tumorstørrelse, vægtøgning, ingen kliniske tegn bortset fra tumorvækst. Disse dyr blev aflivet, da tumorstørrelsen oversteg 1,2 cm – **MODERAT BELASTENDE**

Eksempel på scoringsark

Dyr nr.				
Dato	01/06	02/06	03/06	04/06
Udseende				
Kropsvægt				
Pelstilstand				
Kropsfunktioner				
Dyspnø og/eller takypnø				

Foderindtag				
Miljø				
Tynd afføring eller diarré				
Blodig diarré				
Adfærd				
Håndtering				
Aggression				
Anormal gang				
Anormal holdning				
Modvilje mod at flytte sig				
Forsøgsspecifikke indikatorer				
Tumorstørrelse				
Ulceration af tumor				
Bevægelseshindrende tumor				

Samlet score				
Eventuelle andre observationer				

Eksempler på kliniske scorere

Udseende	Score
Kropsvægt	
5-10 % vægttab	1
11-15 % vægttab	2
16-20 % vægttab	3
Over 20 % vægttab	HEP
Pelstilstand	
Lettere uplejet pels	1
Let piloerektion	2
Markant piloerektion	3

Foranstaltninger	
Score 1	Evaluer overvågningshyppighed
2	Overvej supplerende pleje, <i>f.eks.</i> ekstra væske
4	Kontakt dyrlægen
6	Implementér humane endepunkter

Kropsfunktioner	
Takypnø (hurtig vejrtrækning)	1
Dyspnø (vejrtrækningsproblemer)	3
Miljø	
Tynd afføring eller diarré	1
Blodig diarré	HEP
Adfærd	
Anspændt og nervøs under håndtering	1
Markant angst under håndtering, f.eks. rysten, vokalisation, aggression	3
Bevægelsesevne	
Let anormal gang/holdning	1
Markant anormal gang/holdning	2
Signifikante mobilitetsproblemer/modvilje mod at flytte sig	3
Immobilitet > 24 timer	HEP
Forsøgsspecifikke indikatorer	

Tumorstørrelse > 1,2 cm	HEP
Tumorulceration	HEP
Bevægelseshindrende tumor	HEP

Illustrative eksempler på proceduren til klassificering efter belastningsgrad

Model 2 – Eksperimentel autoimmun encephalomyelitis (EAE) i mus

Senest opdateret: 05/02/2013

Generel baggrund

Eksperimentel autoimmun encephalomyelitis (EAE) anvendes til at modellere forskellige aspekter af multipel sklerose (MS) hos gnavere og primater. MS er en mangeartet, kompleks neurologisk forstyrrelse, som forekommer hos unge voksne. Symptomerne herpå omfatter inflammation, demyelinisering og aksonalt tab. Dyremodeller anvendes til at undersøge patofysiologien ved denne sygdom og vurdere eventuelle beskyttende eller helbredende strategier, herunder immunmodulation, immunbeskyttelse, aksonal regeneration og myelin reparation. De mangleformede-flerfasede karakteristika ved MS kræver, at der anvendes passende modeller til at behandle specifikke spørgsmål i relation til sygdommens forskellige faser.

EAE involverer generering af aktivitet i immunsystemet, som er målrettet mod myelin, der inducerer inflammation i centralnervesystemet og åbning af blod-hjerne-barrieren. Dette kan forårsage et alvorligt neurologisk syndrom i dyremodellen, som bør følges af en delvis restitution i løbet af den første kroniske remitterende/recidiverende fase. Denne fase er forbundet med inflammation og reversibel demyelinisering. Efter 9-10 uger kommer dyret ind i den progressive form, som er forbundet med kronisk demyelinisering og aksonalt tab. I denne fase er det muligt at vurdere forskellige terapeutiske strategier. Humane og videnskabelige endepunkter skal udvælges nøje under hensyntagen til forsøgets mål.

Referencer

- Emerson MR *et al.* (2009) Enhancing the ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of Multiple Sclerosis through refinement of the experimental design. *Comparative Medicine***59**: 112-128
- Miller SD *et al.* (2010) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the mouse. *Current Protocols in Immunology***88**: 15.1.1-15.1.20
- Weissert R (ed) (2012) *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis – Models, Disease Biology and Experimental Therapy*. Offentliggjort af In Tech, DOI: 10.5772/1190, <http://www.intechopen.com>
- Wolfensohn S *et al.* (under udarbejdelse) Reducing suffering in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

Forsøg

I dette eksempel induceres EAE i 4 han- og 4 hunmus af typen Biozzi ABH (en meget anvendt stamme, som menes at have en høj translationel værdi) med henblik på at vurdere en potentiel behandling for MS. I det indledende planlægningsstadium vurderer brugeren hver enkelt mulig uønsket hændelse for dyrene og identificerer potentielle årsager til lidelse, som drøftes med dyretekniker, pasningspersonalet og den behandlende dyrlæge. De undersøger forfinelser, og disse implementeres i projektet. Musene placeres socialt i enkeltkønnede grupper med 4 individer i hver. Der rettes særlig opmærksomhed mod det lokale miljø, da dyr med EAE vil have et signifikant motorisk deficit. Burene forsynes med fast gulvbelægning, savsmuldsstrøelse, tilstrækkelige tilflugtssteder og redemateriale samt byggeblokke. Dyrene behandles med en antiinflammatorisk adjuvans for at inducere EAE og overvåges i løbet af restitutionsperioden og den kroniske remitterende/recidiverende fase (9-10 uger). Når den progressive form er udviklet, evalueres kandidatstofferne i musene i et tre-ugers forsøg.

Indledende prospektiv vurdering og overvejelse af specifikke forfinelser og humane endepunkter

Hvad indebærer forsøget for dyrene?	Hvad kommer dyrene til at opleve? Hvor megen lidelse kan der være forbundet hermed? Hvad kan forværre lidelsen?	Hvordan begrænses lidelsen til et minimum?	
	Bivirkninger	Metodologi og indgreb	Endepunkter
Flere injektioner af antiinflammatorisk adjuvans	Ubehag eller smerte på grund af indledende injektion Mulig reaktion på injektionsstedet, som kan være irritation eller ubehag	Små doser fordelt på flere subkutane injektionssteder (ikke trædepuder eller halebasis) Adjuvans og vehikel formuleres med henblik på minimal irritation Dyrene overvåges efter injektion	Dyrene aflives på en human måde, hvis der observeres mere end forbigående moderat smerte eller angst efter injektion

Induktion af EAE – indledende svært neurologisk syndrom efterfulgt af restitutionsfase	Paralyse, som kan medføre lidelse eller angst: tab af haletonus, svaghed i bagben, hypomotilitet, paralyse i lemmer (urinvejsdysfunktion, urininkontinens eller urinretention)	Vandladningsfunktionen overvåges ved at tjekke blæren dagligt. Blæren udtrykkes manuelt, hvis det er nødvendigt i tilfælde af retention (nøje overvågning for tegn på smerte eller angst efter blæretømning) Hvis dyrene er inkontinente, tjekkes buret hyppigt for fugtig strøelse og redemateriale; udskiftes med frisk materiale efter behov Der sørges for tilstrækkelige tilflugtssteder og redemateriale	HEP for ethvert af følgende kriterier: • Bilateral paralyse af forben i > 24 timer • Bilateral paralyse af bagben i op til 5 dage • Enhver selvlemlæstelse • Vedvarende urinretention/manglende evne til at tømme blæren • Parese (bevægelsestab; let paralyse) • Vægttab på 35 %* • Ophør med at spise eller drikke i > 24 timer efter starten på sygdommen • Manglende restitution efter EAE 3 uger efter starten på den kliniske sygdom • Kliniske tegn på interkurrent sygdom, f.eks. rygsammenfald
	Signifikant vægttab (f.eks. op til 35 %)	Der sikres konstant adgang til vand og foder i beholdere, som er placeret på burets gulv. Kropsvægt og -tilstand overvåges dagligt og scores hyppigere (efter behov), når vægttabet er begyndt. Der stilles opblødt foder og væskeblokke til rådighed med subkutan tilskud, hvis det er relevant	

Remitterende/recidiverende klinisk forløb	Kronisk neurologisk deficit	Alle stressfaktorer reduceres, herunder støjniveauer Omgivelsestemperaturen øges efter behov ved hjælp af varmeguler, ekstra strøelse og redemateriale.	
Indgivelse af nyt terapeutisk stof (under progressiv form)	Ubehag på grund af injektion Bivirkninger eller manglende effekt af stof	Dyrene overvåges nøje efter injektion af kandidatstof	Dyrene aflives på en human måde, hvis der observeres en af ovennævnte indikatorer, eller hvis der forekommer alvorlige bivirkninger på grund af det nye terapeutiske stof

* Vægttab på 35 % er et ekstremt endepunkt, som kræver en god videnskabelig begrundelse. I dette tilfælde er et signifikant vægttab uundgåeligt, og dyrene kan komme sig efter dette med passende støtte, f.eks. ekstra varme og foder, herunder håndfodring om nødvendigt. Endepunktet på 35 % fastsættes for dette specifikke forsøg med henblik på at reducere kravet om at inducere EAE i yderligere naive dyr, som ikke tidligere har været i behandling, hvilket ville være væsentligt højere med et mere "konventionelt" endepunkt (f.eks. 20 %).

Analyse

En **prospektiv vurdering af belastningsgraden som BETYDELIGT BELASTENDE** vurderes at være **hensigtsmæssig**, da forsøget forventes at have betydelig indvirkning på dyrets generelle velbefindende og tilstand.

Vil belastningsgraden kunne være MODERAT BELASTENDE?

Selv om den prospektive vurdering af belastningsgraden altid bør være BETYDELIGT BELASTENDE af ovennævnte årsager, kan den retrospektive klassificering efter belastningsgrad være MODERAT BELASTENDE, afhængigt af forsøgets varighed og gennemførelsen af tidlige humane endepunkter som angivet her.

Kliniske observationer

Under forsøget blev musene overvåget af dyreteknikere og pasningspersonale ved hjælp af et klinisk scoringsarksystem, som var blevet skræddersyet til protokollen i samarbejde med brugere, dyreteknikere, pasningspersonale og dyrlæge. Dette omfattede parametre i relation til vægt, pelstilstand, haletonus, blærekontrol, genopretning, gang, parese og fremskredne tegn (sideliggende position; næsten komplet paralyse; hurtig, langsom eller dyb vejrtrækning). Da projektet involverede forsøg med en betydelig belastningsgrad, blev dyrene overvåget meget tæt, og brugeren foretog løbende vurderinger af belastningsgraden i samråd med dyrevelfærdsorganet, dyreteknikeren og den udpegede dyrlæge. Nedenfor vises et illustrativt eksempel på et scoringsark.

Eksempel på et relevant scoringsark

Tabel. Klinisk scoringsark anvendt til EAE-mus

Dato:					
Udseende					
Kropsvægt					
Pelstilstand					
Kropsfunktioner					
Blærekontrol					

Hæletonus					
Vejrtrækning					
Miljø					
Redetilstand					
Adfærd					
Social adfærd					
Gang					
Forsøgsspecifikke indikatorer					
Sideliggende position					
Genopretningstid					
Parese					
Paralyse					
Andre observationer					
(fri tekst)					

Bemærkninger: Hver indikator blev vurderet i henhold til systemet i nedenstående tabel, hvor (eksempelvis) "1" angives i tabellen ved siden af "haletonus", hvis der blev observeret lavere haleføring, og "2" ved siden af "redetilstand", hvis reden var ustruktureret.

Tabel. Scoringssystem for indikatorer i det kliniske EAE-scoringsskema

Score:	1 = Let	2 = Moderat	3 = Betydelig
Vægttab	Op til 10 %	10 til 20 %	20 til 35 %
Pelstilstand	Lettere uplejet	Manglende soignering	Markant/udvidet piloerektion
Blærekontrol – inkontinens	Let tab af kontrol, f.eks. mindre urinering i rede	Mere udtalt "urinløb"	Inkontinens
Blærekontrol – retention	Blære kan palperes, men vil tømmes under håndtering	Nødvendigt med lidt større indsats for at tømme blære	Kan ikke urinere uden hjælp; tegn på ubehag/angst under eller efter manuel tømning
Haletonus	Lavere haleføring eller krøllet hale	Tabt tonus i distale halvdel af hale	Tabt tonus i hele halen
Respiration: hurtig, langsom eller dyb vejrtrækning	Let	Moderat	Markant
Redetilstand	Let ustruktureret	Forsøg på redebygning, men ustruktureret	Ingen rede
Social adfærd	Ingen forventet ændring med let lidelse; scoring starter ved 2	Reduceret interaktion med andre dyr	Signifikant reduceret interaktion; passiv

Gang	Klodset	Trækker et bagben efter sig	Trækker begge bagben efter sig
Sideliggende position	Ingen forventet ændring med let eller moderat lidelse; scoring starter ved 3	Ingen forventet ændring med let eller moderat lidelse; scoring starter ved 3	Til stede
Genopretningstid	Langsom til at rette sig op igen ved placering på ryggen	Udtalte problemer med at rette sig op igen	Manglende evne til at rette sig op igen inden for 5 sekunder ved placering på ryggen
Parese	Langsom abduktion af forben ved placering på ryggen	Begrænset rækkevidde ved abduktion af forben ved placering på ryggen	Ingen abduktion af forben
Næsten komplet eller komplet paralyse	Ingen forventet ændring med let eller moderat lidelse; scoring starter ved 3	Ingen forventet ændring med let eller moderat lidelse; scoring starter ved 3	Til stede

Vurdering af konkret belastningsgrad

Ved forsøgets afslutning blev scoringsarket gennemgået for hvert individ for at se, hvor højt indikatorerne havde scoret, og hvordan dette havde ændret sig over tid.

- To mus mistede 8 % af deres kropsvægt efter induktion af EAE, havde lettere uplejet pels og langsom abduktion af forben, men scorede "2" for alle andre indikatorer i de første 5 dage af projektet. Deres scorer vendte tilbage til "1" eller "0" for hver indikator i den recidiverende/remitterende fase og under lægemiddelforsøget. Belastningsgrad = **MODERAT BELASTENDE**
- Tre mus tabte mellem 22 og 32 % af deres kropsvægt og scorede en kombination af "3", "2" og "1" i hele den recidiverende/remitterende fase og under lægemiddelforsøget. Belastningsgrad = **BETYDELIGT BELASTENDE**

- En mus tabte 37 % af sin kropsvægt i post-induktionsfasen og blev aflivet på en human måde. Belastningsgrad = **BETYDELIGT BELASTENDE**
- To mus tabte henholdsvis 15 og 18 % af deres kropsvægt og scorede en kombination af "2" og "3" for alle andre indikatorer i de første 4 dage af forsøget. Derefter scorede de en kombination af "1" og "2" i hele den recidiverende/remitterende fase og under lægemiddelforsøget. Belastningsgrad = **BETYDELIGT BELASTENDE**

Der blev ikke observeret paralyse, og det viste sig at være for vanskeligt at vurdere vejtrækningen gennem observation af buret, så de blev begge to slettet fra registreringsarkene. Der blev noteret øget tid i tilflugtsstedet i de frie tekstbokse som en tidlig indikator for lidelse, så dette blev tilføjet i arkene med henblik på fremtidige projekter.

Belastningsgraden for 6 dyr blev vurderet som værende **BETYDELIGT BELASTENDE**, mens den for 2 andre dyr blev vurderet som værende **MODERAT BELASTENDE**

Mulighed for yderligere anvendelse af 3R-princippet, dvs. "Replacement, Reduction and Refinement" (erstatning, begrænsning og forfinelse)

Efter en vurdering af den konkrete belastningsgrad drøftede brugerne situationen med kolleger og gennemgik litteraturen med henblik på yderligere forfinelser. Der blev identificeret følgende yderligere forfinelser:

- Forfodring af dyrene med kosttilskud med et højt energiindhold, f.eks. gelé og kondenseret mælk, inden indgivelse af adjuvansen
- Anvendelse af en lavere dosis adjuvans
- Anvendelse af en alternativ forsøgsprotokol, så varigheden af projektet kunne reduceres

Disse blev tilføjet til protokollen med henblik på fremtidige forsøg med det formål at sammenligne konkrete belastningsgradsniveauer for at konstatere, om forfinelserne havde været effektive.

Illustrative eksempler på proceduren for klassificering efter belastningsgrad

Model 3 – Arthritis

Senest opdateret: 05/02/2013

Generel baggrund

Dyremodeller for arthritis anvendes for at undersøge patogenesen for sygdommen og for at vurdere potentielle antiarthritiske stoffer til klinisk brug. Vigtige kriterier for valg af model er derfor morfologiske ligheder med human sygdom og modellens evne til at forudsige effekten af terapeutiske kandidatstoffer hos mennesker.

Almindeligt anvendte dyremodeller for reumatoid arthritis omfatter: adjuvant arthritis i rotter, type II-kollagen arthritis i rotter, type II-kollagen arthritis i mus og antigeninduceret arthritis i flere arter (Bendele, 2001). Der anvendes normalt injektion ved halebasis, da det giver en god immunogen respons, selv om der også rapporteres andre injektionssteder i litteraturen. Desuden er der betydelige stammevariationer med hensyn til modtagelighed, belastningsgrad og latenstid i forhold til starten på arthritis. Eksempelvis kan genetisk modificerede stammers modtagelighed over for udviklingen af arthritis ændres (øges eller hæmmes), afhængigt af virkningerne af de genetiske modificeringer. I dyremodeller for arthritis, der er blevet anvendt hyppigt, og som derfor er velvaliderede, vil starten på sygdommen kunne forudsiges, og vurderingsteknikkerne vil sandsynligvis være veldefinerede og -karakteriserede. I sådanne modeller kan flere vurderinger, herunder analyse og brug af Von Frey-filamenter, anvendes som modsætning til enkelte observationsmålinger.

Bemærk, at der bør foretages regelmæssige evalueringer af tilgængelige stammer, protokoller og forfinelser, således at den/de mest hensigtsmæssige vælges til det videnskabelige spørgsmål, som stilles i det enkelte tilfælde (Joe et al, 1999).

Den model, som præsenteres i dette eksempel, er type II-kollagen arthritis i rotter, hvilket kan forårsage betydelig lidelse. Derfor er en overbevisende videnskabelig begrundelse for anvendelsen heraf et absolut krav. Rotterne er immuniseret mod heterolog type II-kollagen, hvilket forårsager læsioner, som svarer til dem, der ses hos mennesker med reumatoid arthritis (Bendele, 2001). Den heraf resulterende polyarthritis er

kendetegnet ved markant bruskdestruktion med immunkompleksaflejring på artikulære overflader, knogleresorption og periosteal proliferation samt moderat til markant synovitis og periartikulær inflammation.

Referencer

Bendele, A.M. Animal models of rheumatoid arthritis, *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(4):377-385

Jasemian Y et al. (2011) Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography. *Br. J. Med. & Med. Res.* **1(4)**: 469-477

Joe, B., Griffiths, M.M., Remmers, E.F., Wilder, R.L. Animal models of rheumatoid arthritis, *Current Rheumatology Reports* 1999; 1139-149

Forsøg

I dette eksempel induceres arthritis i 18 Lewis-hanrotter og 18 Lewis-hunrotter ved gentagen injektion af FIA (Freund's Incomplete Adjuvant) og kollagen. Injektionsstedet vil være halebasis. Daglig behandling påbegyndes 10 dage senere (D10), når arthritis vil være udviklet, og fortsættes derefter dagligt i yderligere 14 dage (indtil D24). Formålet med forsøget vil være at teste formodede terapeutiske stoffer. Tidligere offentliggjorte data vedrørende relaterede stoffer blev gennemgået for at se, om indgivelse af analgetika ville interferere med forsøgets formål, og det blev fastslået, at dette ville give eksperimentel forvirring. Der vil derfor ikke blive indgivet analgetika under udviklingen af arthritis eller til kontroller, og opmærksomheden rettes særligt mod ikke-farmakologiske smertelindringsmetoder (f.eks. forfinelse af dyrehold) med henblik på at lindre lidelserne.

Alle dyr observeres og vejes dagligt og scores på et generelt scoringsark og testes på D0 (før den første injektion) og på D10 (før påbegyndelse af behandlingen), D13, D16, D20 og D24. Test omfatter indirekte målinger af funktionsnedsættelse såsom leddiameter (målt med skydelærer) og klinisk scoring i henhold til et scoringssystem for arthritis. Humane endepunkter anvendes på basis af kliniske scorere (se nedenfor).

Vurdering af nye terapeutiske stoffer i en rottemodel for arthritis (type II-kollagen)

BETYDELIG belastningsgrad

Hvad indebærer forsøget for dyrene?	Hvad kommer dyrene til at opleve? Hvor megen lidelse kan der være forbundet hermed? Hvad kan forværre lidelsen?	Hvordan begrænses lidelsen til et minimum?	
	Bivirkninger	Metodologi og indgreb	Endepunkter
Subkutane injektioner af bovint type II-kollagen i Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) ved halebasis op til tre gange	Stress ved fiksering Forbigående smerte, moderat hævelse på injektionsstedet og ubehag i en eller to dage Hudulceration mulig, men højst usandsynlig sammen med FIA	Empatisk tilgang og kompetent håndtering under hele forsøget Standardiseret dosis og formulering valgt for at minimere hævelse og smerte	Hvis hudulceration varer ved eller bliver inficeret, aflives dyrene på en human måde
Udvikling af arthritis (D0-D10)	Ubehag, smerte, funktionsnedsættelse og lidelse; dyrene kan vise tegn på dårligt helbred, herunder et sløvt udseende, manglende appetit, modvilje mod at flytte sig, vægttab, hævelser i led, hørlig vokalisation under håndtering	Omhyggelig klinisk overvågning ved hjælp af et generelt klinisk scoringsark med øget overvågningshyppighed ved starten på kliniske tegn (normalt fra omkring D8-D10) Der stilles ekstra blødt strøelse og redemateriale til rådighed under hele forsøget	Dyrene aflives på en human måde, når de opnår de forudbestemte kliniske scorer for humane endepunkter (se tabellen nedenfor)

		Nem adgang til vand og foder (f.eks. på burets gulv) under hele forsøget Der anvendes et klinisk scoringssystem for arthritis, som vurderer graden af hævelse og antallet af berørte led	
Indgivelse af farmakologiske stoffer (test og kontrol, 2 gange dagligt) subkutant eller intraperitonealt (fra D10 til D24)	Forbigående ubehag efter injektion Farmakologiske stoffer forventes ikke at forårsage bivirkninger, hvilket baseres på tidligere dyredata	Daglig omhyggelig klinisk overvågning ved hjælp af et generelt klinisk scoringsark	Humane endepunkter anvendes, hvis der er signifikante bivirkninger
Vurdering af effekten af farmakologiske stoffer på belastningsgraden af arthritis (D0, D10, D13, D16, D20 og D24)	Afhængigt af de anvendte metoder kan der være nogle yderligere forbigående smerter eller ubehag, f.eks. anvendelse af Von Frey-hår, brug af skydelærer, behov for håndtering	Omhyggelig klinisk overvågning Reducere overvågningshyppigheden (til et minimum i overensstemmelse med de videnskabelige mål), indtil dyret er kommet sig.	Se tabellen nedenfor

Bemærk

Et klinisk scoringssystem for arthritis skal drøftes med investigator, dyrlæge, dyreteknikere og pasningspersonale og aftales før forsøgsstart.

Analyse

Som en konsekvens af sandsynligheden for en stor klinisk indvirkning på dyret, som kan vare ved i nogle uger, anses en prospektiv klassificering efter belastningsgrad som **BETYDELIGT BELASTENDE** for at være hensigtsmæssig.

Kan belastningsgraden være MODERAT BELASTENDE?

Hvorvidt belastningsgraden kan reduceres til moderat belastende afhænger af formålet med forsøget. Eksempelvis med hyppig detaljeret overvågning af dyrene, og hvor der er mulighed for at implementere tidlige endepunkter (f.eks. ved starten af lammelsen eller efter en periode med let lammelse i et ben, eller anvendelse af billeddiagnostiske metoder in vivo til at påvise ændringer i ledpatologien), kan det være muligt at klassificere forsøget som MODERAT BELASTENDE. Sådanne tidlige endepunkter (f.eks. afslutning af forsøget på dag 6 efter billeddiagnostik) kan være mulige i projekter, som undersøger tidlige inflammatoriske forandringer. Profylaktisk behandling (starter før fuld udvikling af arthritis) med nye farmaceutiske stoffer, som har kraftige antiinflammatoriske virkninger og undertrykker udviklingen af fuld arthritis, kan også medføre en reduktion i belastningsgrad til **MODERAT BELASTENDE**. Formålet med den illustrerede type forsøg er imidlertid at evaluere behandlinger for fuldt udviklet arthritis, så klassificeringen efter belastningsgrad forbliver **BETYDELIGT BELASTENDE**.

Kan belastningsgraden være over den øvre grænse?

I direktivets artikel 15, stk. 2, hedder det "*Medlemsstaterne sikrer, at der ikke udføres forsøg, der medfører betydelig smerte, lidelse eller angst, som sandsynligvis vil være langvarig og ikke kan lindres*". Dette forsøg kan potentielt forårsage betydelig lidelse i et par uger, hvilket bør anses for at være langvarigt. Hvis der skulle udvikle sig svær arthritis i alle fire ben, og dyrenes lidelser ikke blev lindret, ville forsøget være over den øvre grænse for belastningsgrad, og det ville være nødvendigt at forfine det eller påberåbe sig "beskyttelsesklausulen" (direktivets artikel 55) og ansøge Kommissionen om tilladelse.

I dette eksempel er der imidlertid truffet foranstaltninger for at reducere lidelserne – under hensyntagen til det videnskabelige formål – herunder forfinelse af sammensætningen, indgivelsen og valget af adjuvans, som kun tillader, at arthritis udvikles i bagbenene, tilvejebringelse af et komfortabelt miljø og nem adgang til foder og vand, et omfattende overvågningssystem og humane endepunkter. Projektet vil således ikke blive anset for at ligge over den øvre grænse og kan godkendes med forbehold af ellers positiv projektvurdering, herunder evaluering af skader og fordele.

Nedenfor vises et eksempel på et klinisk scoringsark for dag til dag-observation af rotter med arthritis.

Dato:	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4
Udseende				
Kropsvægt				
Manglende soignering				
Dehydrering				
Kropsfunktioner				
Dyspnø				
Takypnø				
Adfærd				
Modvilje mod at flytte sig				
Letargi/apati				
Immobilitet				
Vokalisation				
Forsøgsspecifikke indikatorer				
Artritisk potescore (se tabel				

2)				
Andre observationer				
(fri tekst)				
Samlet score				

Bemærk: Hver indikator blev vurderet i henhold til systemet i tabel 1 og 2 nedenfor. Eksempelvis angives "1" i scoringsarket ved siden af "manglende soignering" (tabel 1) og "5" ved siden af "forsøgsspecifik indikator", hvis to bagben scorede henholdsvis "3" og "2" (tabel 2). De foranstaltninger og endepunkter, der er fastsat nedenfor, tager hensyn til kravene om at undgå betydelig lidelse, hvor det er muligt, men ikke til at aflive dyr på en human måde, før der opnået tilstrækkelige data, hvilket vil gøre det nødvendigt at anvende yderligere, naive dyr.

Tabel 1. Scoringssystem for indikatorer anvendt i det kliniske scoringsark

	Score
<u>Udseende</u>	
Normal < 5 % vægttab	0
5-10 % vægttab	1
11-15 % vægttab	2
16-20 % vægttab	3
Over 20 % vægttab	HEP
Manglende soignering	1
Sammenklemt hud/dehydrering	1
<u>Kropsfunktioner</u>	
Dyspnø	2
Takypnø	1

Tabel 2. Forsøgsspecifik indikator – artritisk potescore

0	Normal
1	Erytem på og hævelse i én ankel
2	Erytem og hævelse i ankel og den proksimale halvdel af tarsalled
3	Erytem og hævelse i ankel og alle tarsalled op til metatarsalledene
4	Erytem og hævelse af hele poten, herunder tær

Dette scoringssystem for arthritis, der anvendes som en forsøgsspecifik indikator, er baseret på stigende niveauer af hævelse og periartikulær erytem. Scorerne er baseret på fysisk undersøgelse og visuel kontrol og anvendes til at beregne et "artritisk indeks", der defineres som summen af scorerne for begge bagben.

<u>Adfærd</u>	
Modvilje mod at flytte sig	1
Letargi/apati	2
Vedvarende immobilitet < 24 timer	3
Immobilitet > 24 timer	HEP
Vokalisation under håndtering	1
Vokalisation, anspændt og nervøs under håndtering	2
Vokalisation under bevægelse/spontan	3
Forsøgsspecifik indikator	
Artritisk potescore (tabel 2)	0-8

HEP: humant endepunkt implementeret, uafhængigt af forekomsten eller fraværet af andre kliniske tegn

Eksempler på relevante indgreb som respons på samlede kliniske scorere

Foranstaltninger, der skal træffes	Samlet score
Øge overvågningshyppighed; overveje supplerende væske/pleje	≥ 4
Gennemgå fremskridt med dyrlæge	5-15
Humant endepunkt	≥ 16

Bemærk: De samlede scorere tages fra de kliniske scoringsark, som er udfyldt i henhold til scoringssystemerne i tabel 1 og 2. Eksempelvis ville et dyr med et vægttab på 12 %, tegn på reduceret soignering og hævelse i begge bagben have en samlet score på 5.

Retrospektiv vurdering:

36 rotter blev immuniseret med bovint type II-kollagen i Freund's Incomplete Adjuvant (FIA). Alle dyr udviklede arthritis: De artrittiske potescorer var 6 ved D10. Alle dyr viste et vægttab på 5-10 %. Målinger af leddiameter viste en væsentlig ændring i forhold til data ved baseline. Daglige kliniske observationer omfattede manglende soignering, modvilje mod at flytte sig, apati, vokalisation under håndtering (under observation og burskifte), nedsat foderindtag og perioder med immobilitet.

- Der indgik 12 forsøgsdyr i den gruppe, som blev behandlet med saltvand. De højeste artrittiske potescorer lå på mellem 6 og 8 for samtlige målinger (D13, D16, D20 og D24). Målinger af leddiameter viste også væsentlige stigninger i forhold til baseline på hvert tidspunkt. De kliniske scorere lå på mellem 4 og 8 med et tab af kropsvægt på 5-15 % undtagen hos 1 dyr, der nåede et vægttab på 21 % på D17, og som derefter blev aflivet på en human måde.

Retrospektiv vurdering: BETYDELIGT BELASTENDE

- 12 dyr blev behandlet med STOF A ved **lav** dosis. Hos alle dyrene adskilte de artrittiske potescorer sig ikke fra den gruppe, som blev behandlet med saltvand frem til D16. På D20 havde 1 dyr en potescore på 8, de andre dyrs scorere lå mellem 6 og 7.

På D24 havde 5 dyr en noget reduceret potescore (5-7). De kliniske tegn for disse 5 dyr viste nogen forbedring, kropsvægten var fortsat reduceret med 5-10 %, og deres mobilitet i buret forblev også nedsat.

De 7 andre dyr viste ikke reducerede artrittiske og kliniske tegn sammenlignet med den gruppe, der blev behandlet med saltvand.

Retrospektiv vurdering: BETYDELIGT BELASTENDE

- 12 dyr blev behandlet med STOF A ved **høj** dosis. På D13 lå de artrittiske potescorer mellem 4 og 6; leddiametre viste også et ikke-signifikant fald. Kliniske tegn omfattede manglende soignering og et vægttab på $< 10\%$. På D16 faldt de artrittiske potescorer til 4, og leddiametrene viste signifikante reduktioner. Kropsvægten blev stabiliseret på D16. Der blev fortsat observeret modvilje mod at flytte sig hos nogle af dyrene. Fra D20 og frem blev ledhævelsen reduceret til mellem 2 og 4. Der blev observeret normal adfærd i buret. Kropsvægten nåede atter niveauerne fra før forsøget.

Retrospektiv vurdering: BETYDELIGT BELASTENDE

Bemærk: Ved afslutningen af forsøget i den tredje gruppe på 12 dyr viste teststoffet "STOF A", som blev givet ved den **høje** dosis, sig at være effektivt med hensyn til at reducere den konkrete belastningsgrad til moderat belastende. Da modellen imidlertid krævede fuldt udviklet arthritis i alle dyr inden påbegyndelse af behandling, på hvilket tidspunkt dyrene viste kliniske tegn svarende til klassificeringen "betydeligt belastende", var klassificeringen efter konkret belastningsgrad for disse dyr fortsat **betydeligt belastende**.

Da dette projekt omfatter adskillige forsøg, foretager brugeren regelmæssigt vurderinger af belastningsgraden i samarbejde med dyrevelfærdsorganet, dyreteknikeren og den udpegede dyrlæge for at sikre, at 3R-princippet anvendes kontinuerligt.

Illustrative eksempler på proceduren til klassificering efter belastningsgrad

Model 4 – slagtilfælde

Senest opdateret: 05/02/2013

Generel baggrund

Slagtilfælde defineres som tab eller ændring af normal kropsfunktion, som resulterer i en utilstrækkelig blodforsyning til dele af hjernen. Til trods for en bedre forståelse af patofysiologien ved vaskulær hjerneskade udgør effektiv behandling af slagtilfælde fortsat et vigtigt udækket medicinsk behov, og der forskes i at finde passende præventive og terapeutiske tiltag.

Der findes tre forskellige typer af slagtilfælde hos humane patienter: iskæmisk, intracerebral blødning og subaraknoid blødning, men de fleste af de dyremodeller, der er til rådighed i øjeblikket, er baseret på den iskæmiske type. Modeller for slagtilfælde udgør i sagens natur en udfordring set ud fra et dyrevelfærdsmæssigt synspunkt. Godt samspil og kommunikation mellem alle individer, der er involveret i videnskabelige forsøg (dyrlæger, investigatore, dyreteknikere og pasningspersonale), er afgørende, for at sikre at der er tilstrækkelig balance mellem opnåelse af en gyldig model på dette forskningsområde og minimering af dyrets lidelser.

Slagtilfælde induceres rutinemæssigt hos gnavere ved midlertidig eller permanent okklusion af arteria cerebri media (Middle Cerebral Artery Occlusion; "MCAO-modellen"). Formålet med denne MCAO-model er på forsøgsbasis at reproducere den fokale cerebrale iskæmi, som forekommer ved slagtilfælde, og den har været anvendt i vid udstrækning til at undersøge skadesmekanismen, identificere potentielle mål og teste formodede neuroprotektive stoffer. Der er blevet identificeret stammeforskelle hos mus og rotter samt den komplekse og signifikante betydning af alder, køn og komorbiditeter såsom diabetes, hypertension og arteriosklerose. Mens præklinisk forskning i slagtilfælde ofte anvender sunde unge gnavere, kan virkningen af faktorer såsom de ovennævnte undersøges ved hjælp af modeller med komorbide tilstande (f.eks. spontant hypertensive rotter, streptozotocin-induceret diabetes i rotter). I sådanne tilfælde med komorbide tilstande kan det være nødvendigt med mere omhyggelige observationer af kliniske tegn og tidligere humane endepunkter (HEP).

I et standardforsøgsdesign bliver dyrene trænet i at udføre bestemte adfærdstest forud for MCAO-forsøget. I løbet af den terapeutiske tidsramme, som er fastlagt i overensstemmelse med virkningsmekanismen for lægemidler og forsøgets formål, får dyrene teststoffet. Resultatanalysen bør omfatte oplysninger om infarktstørrelse, dødelighed, komplikationernes hyppighed (f.eks. subaraknoid blødning) samt en funktionel og neurologisk vurdering for at overvåge udviklingen. MR-scanning har vist sig at være et effektivt værktøj til at opnå oplysninger om ændringer i infarktstørrelse over tid, men kan også give yderligere oplysninger om blodgennemstrømningen eller den metaboliske tilstand. Histologiske, biokemiske og molekylære endepunkter kan også inkluderes.

Der er forskellige adfærdstest, som kan anvendes i forbindelse med modeller for slagtilfælde. De enkleste test omfatter neurologiske scoringssystemer, som vurderer den globale neurologiske status, samt benplaceringstest, som anvendes til at måle motoriske reflekser. Disse anvendes generelt til at vurdere dyr i den akutte fase umiddelbart efter slagtilfældet. I langvarige forsøg kan der anvendes mere komplekse test til at vurdere sensoriske og motoriske funktioner (f.eks. bilateral test med selvklæbende labels, gangtest på bom, rotarod-test eller trappetest) og kognitive funktioner såsom hukommelse (f.eks. passive undvigetest eller vurderinger af indlæringsstrategier).

Det er god praksis at foretage en række adfærdstest, herunder mindst én for hver fase (akut og langsigtet) med henblik på at indsamle oplysninger om virkningen på sensoriske, motoriske og kognitive funktioner. Disse test skal udvælges nøje for at registrere alle virkninger af de formodede terapeutiske strategier. Detaljerede beskrivelser af hver enkelt af disse adfærdstest, herunder træningsplaner, er ikke medtaget her, men en omfattende evaluering og diskussion af deres anvendelse gives i Schaar et al. 2010)

Referencer

- Braeuninger S og Kleinschnitz C. Recent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009 Nov; 1:8.
- Freret T og Bouet V. Improvements of the Stroke Model Guidelines – Animal body weight and long-term functional concerns. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009; 2(2): 28-31
- Graham SM et al. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, 2004 Oct; 54(5): 486-496
- Yanamoto H et al. Evaluation of MCAo stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *ExpNeurol*, 2003 Aug; 182(2):261-74

- Liu S et al. Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1. udgave). Journal of experimental stroke and translational medicine, 2009 Jan 1;2(2):2-27.
- Schaar KL et al. Functional assessments in the rodent stroke model. Experimental & Translational Stroke Medicine, 2010; 2: 13; åben adgang på adressen: <http://www.etsmjournal.com/content/2/1/13>
- Virley et al. A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behaviour. J Cereb Blood Flow Metab, 2000;20: 563-582.

Forsøg

Effekt af et nyt terapeutisk stof på den intraluminale MCAO-model i rotter

I dette eksempel vil 40 unge Sprague-Dawley-hanrotter (300-350 g) gennemgå permanent MCAO ved hjælp af den intraluminale filamentteknik under generel anæstesi. Rotterne randomiseres (n = 10/gruppe) til at få enten vehikel (10 ml/kg) eller et nyt teststof (stof A) med 1, 3 eller 10 mg/kg, som infunderes intravenøst i en halevene i løbet af 1 time startende 30 min. efter MCAO. Efterfølgende doser (enten vehikel eller stof A med 1, 3 eller 10 mg/kg) gives intraperitonealt 6 og 24 timer efter MCAO. Rotterne huses først parvis i bure med fast bund indeholdende dybstrøelse og redemateriale. Foder begrænses under fortræningen for at fremme præstationen i trappetesten, hvilket var en appetitmotiveret opgave. Dyrene får foder ad libitum fra 6 timer før kirurgi til 6 dage efter MCAO for at forbedre den postoperative vægt og restitution.

De funktionelle resultater vurderes dagligt ved hjælp af et neurologisk scoringssystem (Bederson-skalaen; se Schaar et al. 2010) og adfærdstest (bilateral test med selvklæbende label og gangtest på bom). Trappetesten udføres også dagligt fra dag 7 efter MCAO for at give tilstrækkelig tid til restitution efter operation, før der igen indføres foderrestriktioner. Ingen af adfærdstestene forventes at forårsage signifikant angst. MR-scanning udføres på bedøvede rotter på dag 1, 7, 14 og 28 for at vurdere læsionsvolumen. Alle dyr aflives 28 dage efter MCAO.

Indledende prospektiv vurdering og overvejelse af specifikke forfinelser og humane endepunkter

Hvad bliver der gjort ved dyrene i forsøget?	Hvad oplever dyrene? Hvor megen lidelse kan der være forbundet hermed? Hvad kan forværre lidelsen?	Hvorledes vil lidelsen blive reduceret til et minimum?	
	Bivirkninger	Metodologi og indgreb	Endepunkter
Præoperativ træning i adfærdstest i en periode på 2-3 uger: bilateral test med selvklæbende label (for kontralateral neglect), gangtest på bom (med henblik på koordinering af bagben) og trappetest (indlært løft af forbenspoter)	Der kan forårsages minimalt stress/ængstelse, inden dyrene har vænnet sig til testene, da testning er forbundet med flytning af dyrene til nye rum/anlæg	Gradvis tilvænning til testapparatur Rolig, empatisk håndtering .	Tages ud af forsøg, hvis der observeres tegn på angst Dyr, der ikke opnår en vis præstation inden for et givent tidsrum, tages ud af forsøget
Foderrestriktion (85-90 % af normal dagsration) præoperativt og fra dag 7 efter MCAO for at fremme præstationen i trappetesten	Mild sult, mulig frustration og ængstelse	Vægttabet må ikke overstige 10 %, ellers vil foderrestriktionen blive ophævet	Hvis der observeres adfærdsmæssige problemer på grund af manglende foderindtag, tages dyret ud af forsøget
Under generel anæstesi forbigående (90 min.) okklusion af MCA ved	Smerte og ubehag forbundet med	Anvendelse af relevant og minimalt afskrækkende anæstesi	Dyrene aflives på en human måde, hvis et af

hjælp af en intraluminal tråd via arterie carotis communis	operation Risikoen for uventede kirurgiske komplikationer, f.eks. subaraknoid blødning, ipsilateral retinal skade, intraluminal trombosedannelse, involvering af hypothalamus ved hjerneødem med deraf følgende hypertermi eller temporal muskelnekrose. Disse kan optræde på en række forskellige måder, f.eks. pludseligt kollaps, paralyse, svær grad af skrå hovedstilling eller krampeanfald Skyhed og mulige virkninger af anæstesi på psykologiske variabler (f.eks. hypotermi, hypotension eller hypoksi) Ringe foderindtag som et resultat af reduceret bevidsthedsniveau,	med passende analgetika (dvs. effektivt, men med minimale neuroprotektive egenskaber) Veluddannet kirurg, som anvender den relevante aseptiske kirurgiske teknik (med regelmæssige vurderinger af succesrater) Opretholdelse af homeostase under anæstesi Anvendelse af standardiserede monofilamenter og kirurgisk teknik for at reducere variabiliteten og komplikationer afledt af omfattende læsioner Intensiv postoperativ pleje i de første 3-5 dage, herunder eksterne varmekilder.	følgende forhold forekommer – • Signifikante tekniske problemer under kirurgi • Manglende evne til at opnå fuld restitution efter anæstesi • Tegn på uventede komplikationer ved kirurgi • Hvis dyrets vægttab overstiger 20 % i forhold til den prækirurgiske vægt på trods af ekstra fodring og/eller rehydrering, eller hvis immobiliteten varer over 24 timer
---	---	---	---

	nedsat tyggeevne og dårlig motilitet, generelt i de første 48 timer efter MCAO Grad af lokomotorisk deficit, hvilket kan forårsage stress og/eller frustration	Regelmæssige vægtkontroller; daglig observation og sårpleje Adgang til nemt tilgængelig foder og vand i restitutionperioden eller ekstra foder (mask, væske) og hjælp til foderindtagelse om nødvendigt; rehydrering (f.eks. via saltvandsinjektion) efter behov	
Adfærdstest (bilateral test med selvklæbende labels og gangtest på bom) udføres dagligt fra dag 1 til dag 28 efter MCAO; trappetest udføres dagligt fra dag 7 efter MCAO	Dyr med motoriske problemer kan opleve stress i forbindelse med opgaverne	Overvågning af adfærdsmæssige indikatorer for ængstelse eller angst Dyrene observeres kontinuerligt af erfarent personale	Der fastsættes typisk en maksimal tid (cut-off) for udførelse af den pågældende opgave, og der gives en endelig score
Indgivelse af nyt terapeutisk stof subkutan/intravenøst/intraperitonealt før og/eller efter kirurgi	Forbigående ubehag forbundet med indgivelsesvej	Indgivelse i henhold til god praksis ved hjælp af den mindst smertefulde/angstfremkaldende	Dyrene aflives på en human måde, hvis der bemærkes alvorlige

(profylaktisk/terapeutisk)	Der forventes ingen bivirkninger ved de indgivne dosisniveauer	indgivelsesvej og mulige teknik i overensstemmelse med videnskabelige formål. Dyrene observeres nøje for bivirkninger ved teststoffer	bivirkninger ved de nye terapeutiske stoffer
Longitudinel MR-scanning under anæstesi på dag 1, 7, 14 og 28 efter MCAO	Gentagen anæstesi Skyhed og mulige virkninger af anæstesi på psykologiske variabler (f.eks. hypotermi, hypotension eller hypoksi)	Anvendelse af passende og minimalt afskrækkende anæstetika Opretholdelse af homeostase under anæstesi, herunder væskebehandling før eller under, hvis der er problemer med dehydrering og overophedning, for at opretholde normotermi	Dyr, som ikke kommer sig helt efter anæstesi, aflives Dyrene aflives på en human måde, hvis homeostase ikke kan opretholdes efter restitutionsfasen

Analyse

Denne model anses for at være BETYDELT BELASTENDE på grund af den hermed forbundne kirurgiske procedure, bivirkningerne ved MCAO (som normalt er forbigående) på dyrets velfærd og muligheden for signifikante perioperative komplikationer. Den negative indvirkning på dyrets velfærd kan imidlertid begrænses ved intensiv postoperativ pleje i mindst de første 48 timer og tæt overvågning i den efterfølgende

fase, hvor der hurtigt træffes foranstaltninger i tilfælde af problemer. Ud fra et forsøgsmæssigt synspunkt kan opmærksomhed omkring forfinelse og standardisering af hvert af de enkelte forsøg medføre en begrænset forekomst af komplikationer og variabilitet og dermed bedre datakvalitet og en reduktion i antallet af anvendte dyr.

En prospektiv klassificering efter belastningsgrad som BETYDELIGT BELASTENDE er derfor hensigtsmæssig.

Vil belastningsgraden kunne være MODERAT BELASTENDE?

Selv om en prospektiv klassificering efter belastningsgrad altid bør være BETYDELIGT BELASTENDE for denne model af de årsager, der er skitseret ovenfor, kan forekomsten af alvorlige bivirkninger begrænses i hænderne på erfarne operatører i kombination med dyrlægetilsyn og pleje af dyrene, og der kan aftales tidlige indgreb i tilfælde af komplikationer. Potentielt vil der kunne gives tilladelse til belastningsgraden MODERAT BELASTENDE i nogle tilfælde, men kun på et fra sag til sag-grundlag til individuelle forskningsgrupper, som har dokumenterbare erfaringer med denne specifikke model og er kendt for deres evne til at anvende modellen uden at forårsage mere end moderat lidelse.

Kliniske observationer

Dyrene blev nøje overvåget i den postoperative periode. Analgetika og lokal understøttende behandling gives efter behov

Et eksempel på et kombineret neurologisk/klinisk scoringssystem, der anvendes som hjælp til at overvåge dyrenes kliniske tilstand under hele forsøget, er medtaget i slutningen af dette eksempel.

Resultater

Alle dyr, undtagen 1 i den vehikelbehandlede gruppe, kom sig efter operationen og havde ingen uventede komplikationer, hvilket skyldes den intensive perioperative støtte.

- Alle 10 vehikelbehandlede dyr viste den laveste neurologiske score under hele forsøget sammen med et dårligt resultat i adfærdstestene i forhold til de behandlede dyrs. Den kliniske score lignede den for de behandlede dyr umiddelbart efter MCAO (første 48 timer), men derefter blev der konstateret forskelle blandt dyrene i vehikelgruppen:
 - 1/10 måtte aflives på dag 2 efter operation på grund af et tab af kropsvægt på > 20 % (til trods for ekstra fodring og rehydrering).

Vurdering: BETYDELIGT BELASTENDE

- 6 ud af 10 udviklede moderat neurologisk deficit, men viste minimal forbedring i klinisk score over tid
Vurdering: BETYDELIGT BELASTENDE
- 3 ud af 10 dyr udviklede moderat neurologisk deficit og viste en gradvis reduktion i klinisk score over tid, hvilket muligvis skyldes deres evne til at kompensere og tilpasse sig et langvarigt neurologisk deficit.
Vurdering: MODERAT BELASTENDE
- Alle 20 dyr, der blev behandlet med stof A ved lavere doser (1 og 3 mg/kg), viste en forbedring i neurologisk scoring 48 timer efter MCAO og en forbedring i klinisk scoring.
Vurdering: MODERAT BELASTENDE
- Alle 10 dyr, der blev behandlet med stof A ved den højeste dosis (10 mg/kg), viste en forbedring i neurologisk scoring sammenlignet med vehikelgruppen 24 timer efter MCAO. Desuden havde de et minimalt vægttab på kun 5 % og en signifikant forbedring i klinisk scoring 48 timer efter MCAO.
Vurdering: MODERAT BELASTENDE

Vurdering af konkret belastningsgrad

Den konkrete belastningsgrad blev for 7 dyr vurderet som værende **BETYDELIGT BELASTENDE**, og for 33 dyr blev den vurderet som værende **MODERAT BELASTENDE**

Scoringssystem

Vurderingen af belastningsgrad foretages ved en kombination af generelle kliniske observationer (kropsvægt, udseende, adfærd og burmiljø) sammen med en forsøgsspecifik neurologisk vurdering. Bederson-skalaen er en global neurologisk vurdering, som blev udviklet for at måle neurologisk svækkelse efter et slagtilfælde. Der anvendes en klassifikationsskala på 0-3, hvor 0 = normal og 3 = højeste niveau af funktionsnedsættelse. Test omfatter fleksion af forben, modstand mod lateralt pres.

0: intet observerbart deficit

1: fleksion af forben

2: nedsat modstand mod lateralt pres (og fleksion af forben) uden cirkelbevægelse

3: samme adfærd som 2, uden cirkelbevægelse

HEP: humant endepunkt

	Score
Udseende	
5-10 % vægttab	1
11-15 % vægttab	2
16-20 % vægttab	3
Over 20 % vægttab	HEP
Lettere uplejet pels	1
Let piloerektion	2
Markant piloerektion	3
Adfærd	
Let anormal gang	1
Markant anormal gang	2
Signifikante mobilitetsproblemer	3

Foranstaltninger	
Score 1	Evaluer overvågningshyppighed
4	Giv supplerende pleje, f.eks. ekstra væske og våd mask
5	Gennemgå udvikling med dyrlæge
12	Implementér humane endepunkter

Immobilitet > 24 timer	HEP
Anspændt og nervøs under håndtering	2
Markant angst under håndtering, f.eks. rysten, vokalisation, aggression	3
Miljø	
Let ustruktureret rede	1
Rede kan knap nok identificeres	2
Ingen rede	3
Neurologisk scoring	
Fleksion af forben	1
Nedsat modstand over for lateralt pres (og fleksion af forben) uden cirkelbevægelse	2
Samme adfærd som 2, uden cirkelbevægelse	3

Foranstaltninger – bemærk, at eftersom der generelt noteres kirurgiske komplikationer i den umiddelbare postoperative restitutionsperiode, er tæt overvågning og empatisk ekspertvurdering i løbet af de første 24 timer vigtigt, for at sikre at bivirkninger identificeres, og at der træffes foranstaltninger til at imødegå disse, og dyrene aflives på en human måde, hvis deres lidelse overskrider klassificeringen "betydeligt belastende".

Eksempel på et individuelt scoringsark (dag 0-4)

Dag	0	1	2	3	4
<u>Udseende</u>					
Kropsvægt (g) (score)	320 (0)	292 (1)	285 (2)	287 (1)	292 (1)
<u>Pelstilstand</u>					
Uplejet pels/piloerektion	1	1	0	1	0
<u>Adfærd</u>					
Gang	3	2	2	2	1
Respons på håndtering	0	0	2	0	0
<u>Miljø</u>					
Redetilstand	3	2	1	0	0
<u>Forsøgsspecifik neurologisk scoring</u>	2	2	1	1	1
Samlet score	9	8	8	5	3
Læsionsvolumen (MR-vurdering)*		11 %			

<u>Andre observationer</u>	Kom sig hændelsesfrit efter kirurgi, ingen komplikationer Doseret ved 30 min. og 6 timer	Aktiv i buret og har forsøgt at bygge en rede	Adfærdstest, indledningsvis angst, men alle test afsluttet, rede mere struktureret	Pels mindre soigneret i dag, men stabil vægt og god rede	Adfærdstest afsluttet, mindre ængstelig og markant forbedret gang
-----------------------------------	---	---	---	---	---

* "læsionsvolumen" (vurderes ved hjælp af MR-scanning) skal udfyldes af investigator ved forsøgets afslutning. Disse data kan derefter samkøres med kliniske og adfærdsmæssige observationer for at muliggøre yderligere forfinelse af overvågning, dyrepasning og forsøg.

Illustrative eksempler på proceduren for klassificering efter belastningsgrad

Model 5 – Produktion af polyklonale antistoffer i kaniner

Senest opdateret: 05/02/2013

Generel baggrund

Det primære mål for udvikling af antistoffer i laboratoriedyr er at opnå antisera med høj titer og høj affinitet til brug i eksperimentielle eller diagnostiske test.

Meget af den moderne biologi og biokemi hviler på tilgængeligheden af højspecifikke antistoffer til brug i en række teknikker såsom immunhistokemi, ELISA'er, immunpræcipitation og immunblotting. Fremstillingen af store mængder antistoffer mod proteiner eller interessante peptider er således afgørende for den succes, som opnås i mange grundlæggende forskningsprogrammer og programmer for anvendt forskning.

I dette eksempel anvendes der en kanin for at øge mængden af antistoffer mod små peptider, der anses for vigtige i reguleringen af celledeling, som en del af et forskningsprogram, som involverer biokemiske forsøg med deling af pattedyrsceller.

Referencer

- Canadian Council on Animal Care guidelines on; antibody production (2002). Kan downloades på adressen: http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf
- EFPIA/ECVAM (Diehl K-H et al.) (2001) A good practice guide to the administration of substances and the removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21**: 15-23
- JWGR (2001) Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals* **35**: 1-41
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA og Leach MC (2012) Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS ONE* **7(9)**: e44437 (åben adgang, <http://www.plosone.org>)
- Leenars M, Hendriksen CFM (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendation. *ILAR Journal* **46**:269-279

- Stills HF (2005) Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal* **46**:280-293
- UFAW/RSPCA (2008) *Refining Rabbit Care: A Resource for Those Working With Rabbits in Research*. Southwater, Det Forenede Kongerige: RSPCA (kan downloades gratis på adressen: <http://www.rspca.org.uk/researchrabbits>)

Forsøg

På baggrund af tidligere erfaringer blev det besluttet, at én kanin skulle give tilstrækkeligt materiale for det enkelte interessante peptid. Kaninen anbringes i en dyrefold på gulvet i en stabil gruppe af individer, der kan forliges (benyttes også til fremstilling af antistoffer) med tilstrækkelig plads til berigelse, motion og normal social adfærd (UFAW/RSPCA 2008). Dyret immuniseres med en blanding af antigen og adjuvans. På foruddefinerede tidspunkter udtages små mængder blod, for at fastslå om immuniseringen har været vellykket. Hvis der er opnået en tilstrækkelig antistoftiter, forbløder dyret under dyb anæstesi uden restitution for at indsamle antistofferne i blodet.

Håndtering af kaniner kan være stressende og bør kun foretages af kompetent og empatisk personale. Kaninadfærd kan være vanskelig at tolke, og det er god praksis at bevare viden fra litteraturen vedrørende kaninadfærd og -velfærd. Eksempelvis har nylig litteratur indikeret, at der kan vise sig "ansigtssmerter" hos kaniner under bestemte omstændigheder (Keating et al. 2012), og muligheden for at anvende dette som et værktøj til velfærdsvurdering bør undersøges i hvert enkelt tilfælde.

På grund af den ringe immunogenicitet ved det kortkædede peptid vil det være nødvendigt at indgive det i kombination med en adjuvans. FCA (Freund's Complete Adjuvant) er blevet anvendt tidligere, men der findes nu syntetiske adjuvanter, som også er effektive i forbindelse med dette forsøg og minimalt irriterende.

Indledende prospektiv vurdering og overvejelse af specifikke forfinelser og humane endepunkter

Hvad indebærer forsøget for dyrene?	Hvad kommer dyrene til at opleve? Hvor megen lidelse kan der være forbundet hermed? Hvad kan forværre lidelsen?	Hvordan begrænses lidelsen til et minimum?	
	Bivirkninger	Metodologi og indgreb	Endepunkter
Immunisering med antigen og adjuvans; tre subkutane injektioner på dag 8, 22 og 37.	Ubehag efter injektion Der kan udvikles smertefrie knuder som respons på adjuvansen Mulighed (sjældent) for ulceration på injektionsstedet	Injektionsmængde, formulering og hyppighed vil være i overensstemmelse med retningslinjer for god praksis (f.eks. EFPIA/ECVAM eller JWGR), typisk maksimalt fire steder og 0,25 ml pr. sted Eventuelle sår behandles straks på passende vis af dyrlægen	Dyrene aflives, hvis der er tegn på forlænget ubehag, smerte eller angst (f.eks. vedvarende opmærksomhed på injektionssteder eller knuder), eller hvis der dannes sår, som ikke heles
Blodprøvetagning for at vurdere antistofresponsen (op til 5 gange)	Indfangning, håndtering og fiksering, hvilket kan være stressende. Mindre ubehag i forbindelse med nålestik Lav risiko for blødning eller hæmatomdannelse	Blodprøve udtages fra en overfladisk vene (øre). Kun små mængder blod (< 5 ml) for at kontrollere antistoftitre Læg pres på prøvetagningsstedet	Hvis dyret bliver urimeligt stresset af forsøget, udskydes blodprøvetagningen, indtil dyrets adfærd igen er normalt

Afblødning under generel anæstesi	Mindre ubehag og mulig aversion mod stoffet under induktion af anæstesi	Der anvendes et minimalt afskrækkende anæstetikum	Dyret forbliver under anæstesi, indtil døden indtræder
-----------------------------------	---	---	--

Analyse

Der forventes kun en let belastningsgrad som følge af forfinelse af dyrehold og -pleje, god praksis for indgivelse og blodprøvetagning samt valg af en minimalt irriterende adjuvans.

En prospektiv vurdering af belastningsgraden som LET BELASTENDE er derfor hensigtsmæssig

Vil forsøget kunne forfines yderligere?

Muligheden for at anvende minimalt irriterende adjuvanter og mindre afskrækkende anæstetika bør vurderes regelmæssigt gennem overvågning af litteraturen og drøftelse af spørgsmålet med kolleger. Der vil kunne udarbejdes et program for tilvænning af ungkaniner til håndtering med henblik på at reducere stressfaktoren yderligere (UFAW/RSPCA, 2008).

Kliniske observationer

Da der kun blev forventet mindre bivirkninger i dette forsøg, blev der anvendt et grundlæggende overvågningssystem, dvs. at dyret blev kontrolleret dagligt, og observationerne blev

registreret, men et struktureret registreringsark blev ikke anset for at være nødvendigt.

Et illustrativt eksempel på et observationsark er medtaget i slutningen af dette eksempel.

Vurdering af konkret belastningsgrad

Der blev registreret en forbigående let hævelse på et injektionssted, men behandling var ikke nødvendig. Kaninen viste kortvarigt en vis interesse for injektionsstederne, men dette blev anset for kun at være udtryk for mildt ubehag. Der blev ikke observeret nogen "ansigtssmerter".

Der blev ikke noteret nogen bivirkninger som følge af den konkrete blodprøvetagning fra ørevenen.

En vurdering af den konkrete belastningsgrad som **LET BELASTENDE** blev anset for at være hensigtsmæssig for dette dyr.

Eksempel på observationsark

Antistofproduktion i kaniner – Forsøg og observationsark		
Dato	Kropsvægt (kg)	Kommentarer
01/03	3,5	Testblødning – 5 ml ørevene; ingen noterede bivirkninger
02/03		Ingen påvist anormalitet
06/03		Ingen påvist anormalitet
07/03		Ingen påvist anormalitet
08/03	3,6	Immuniseret – 0,25 ml x 2 steder subkutan, let interesse for stederne (soignering) i flere minutter og derefter tilbage til normal adfærd
09/03		Ingen påvist anormalitet

10/03		Ingen påvist anormalitet
11/03		Ingen påvist anormalitet
12/03		Let, blød smertefri hævelse på LHS-stedet.
13/03		Fortsat hævelse på LHS-stedet, ingen forværring
14/03		Fortsat hævelse på LHS-stedet, men ikke smertefuld ved palpering
15/03	3,6	Hævelse forsvundet, alt er normalt

21/03		Ingen påvist anormalitet
22/03	3,6	Immuniseret – 0,25 ml x 2 steder subkutan, kortvarig interesse for stederne

28/09		Ingen påvist anormalitet
29/03	3,7	Ingen påvist anormalitet
30/03		Testblødning – 2 ml ørevene, ingen bivirkninger

05/04		Ingen påvist anormalitet
-------	--	--------------------------

06/04	3,6	Immuniseret – 0,25 ml x 2 steder
-------	-----	----------------------------------

14/04	3,6	Ingen påvist anormalitet
15/04		Testblødning – 2 ml ørevene, ingen bivirkninger

26/04		Ingen påvist anormalitet
27/04	3,6	Afblødning under generel anæstesi, ingen bivirkninger

Der skal føres journal over, at dyret som minimum er blevet kontrolleret dagligt – f.eks. i den pågældende dyrejournale (som ovenfor) eller i lokalejournalen.

Illustrative eksempler på proceduren til klassificering efter belastningsgrad

Model 6 – Fremstilling og bevarelse af genetisk modificerede dyr

Senest opdateret: 05/02/2013

1. Generel baggrund

Anvendelsen af genetisk modificerede dyr til forskningsformål har bidraget til forståelsen af genernes funktion og deres tilsvarende proteiner. Forskellige fænotyper kan have en lang række indvirkninger på dyrevelfærden, og nogle kan forårsage smerte, lidelse eller angst. Mens nogle fænotyper og resultater er forudsigelige, kan der forekomme mange uventede eller sekundære træk under udviklingen af genetisk modificerede stammer, således at det ikke altid er muligt at forudsige belastningsgraden nøjagtigt. I praksis påvirkes fænotypen ikke i mange genetisk modificerede stammer, og der kan udarbejdes vurderingsprotokoller, for at sikre at eventuelle uønskede fænotyper påvises. Alternativt kan den forventede fænotype ofte forbindes med uforudsete sekundære fænotyper, som viser sig på forskellige tidspunkter og kan påvirkes af forskellige miljømæssige faktorer.

Ved vurdering af den faktiske skade på dyret bør der tages hensyn til en lang række faktorer, f.eks. mutationstype, genotype, fænotype og avlsstrategi (f.eks. undgåelse af skadelige homozygote fænotyper ved at parre heterozygote individer med vildtype-individer) samt karakteren af eventuelle yderligere videnskabelige forsøg eller pasningsprocedurer og de potentielle konsekvenser af alt dette. Det er nødvendigt med systematiske og hensigtsmæssigt planlagte observationer, både i løbet af koloniens udvikling og i hele forsøgsfasen for en koloni, for at kunne foretage en effektiv vurdering af det enkelte dyrs velfærdsstatus.

Nye stammer bør overvåges nøje og underlægges en standardvelfærdsvurdering. Alle stammer skal vurderes individuelt af passende oplært og kompetent personale i løbet af koloniens udvikling og bevarelse, og oplysninger vedrørende observerede bivirkninger skal indsamles og rapporteres. Godkendt personale bør anvende alle involverede videnskabelige forsøg og i samarbejde med pasningspersonalet overvåge og registrere eventuelle virkninger på dyrene. Der bør fastsættes humane endepunkter prospektivt med hensyn til parametre såsom væggtab, kropstilstand og problematisk adfærd samt specifikke udviklingskarakteristika. Intet dyr bør holdes i live, hvis det overskrider den forventede

grænse for belastningsgraden, medmindre dette har tvingende videnskabelig interesse, og det bør i givet fald kun ske med godkendelse fra den kompetente myndighed.

Karakteren, planlægningen og varigheden af observationerne afhænger af en række andre faktorer end den anvendte mutation. Eksempelvis kan den genetiske baggrund og de miljømæssige forhold, som dyrene holdes under, signifikant ændre den måde, som fænotypen kommer til udtryk på. Disse specifikke faktorer bør registreres nøjagtigt for at gøre det nemmere at foretage bedre sammenligninger mellem faciliteter og overvågning af genetisk modificerede dyr generelt. Levetiden for hver linje inden for en særskilt facilitet bør også tages i betragtning, da nogle fænotyper har en sen start og således kun vil blive observeret, hvis dyrene holdes i længere perioder.

Referencer

RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, Det Forenede Kongerige: RSPCA (kan downloades på adressen: <http://www.rspca.org.uk/researchrabbits>)
Wells DJ et al (2006) *Assessing the welfare of genetically altered mice* *Laboratory Animals* **40(2)**: 111-114 (kan downloades på adressen <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=356&page=231&skin=0>)

2 Eksempler

De tre eksempler i afsnit 2.1 til 2.3 nedenfor illustrerer, hvordan belastningsgraden kan vurderes hos genetisk modificerede mus, herunder gennemgang af udviklingsmæssige milepæle, processuel indvirkning og koloniudvikling. Hvert eksempel fokuserer snarere på principperne for vurdering af belastningsgrad end hensyntagen til ethvert muligt scenario i løbet af koloniens udvikling.

Etableringen af hver enkelt model følger standardiserede procedurer, som kræver kirurgisk forberedelse af vasktomerede avlshanner, håndtering af embryoner og kirurgisk implantation heraf i pseudogravide recipienthunner. Der forventes god praksis med hensyn til aseptik, smertehåndtering og kirurgens kompetencer.

Bekræftelse af forekomsten i afkom, der stammer fra grundlæggerstammer eller kimcellelinjer, konstateres fra vævsprøver indsamlet som et biprodukt af identifikation (perforering af øret) eller ved hjælp af den mindst invasive metode, som leverer tilstrækkeligt væv til genotypebestemmelse. Strategien for fænotypebestemmelse for hver linje afhænger af genet, forskningsområdet og de forventede virkninger. Vurderingen af belastningsgrad afgøres ved hjælp af en række standardiserede observationer.

2.1 Genetisk modificeret musemodel – *GeneA*^{tm1a(Funding)Lab}

2.1.1 Generel baggrund

Der blev etableret en koloni af mus med en ny mutation i *GeneA*, som var målrettet mod en embryonisk stamcellelinje afledt af C57BL-/6N-baggrund med et ukendt fænotypisk potentiale. Modellen blev opretholdt i en defineret baggrund (C57BL/6N). Når overførslen af kimceller for G1-mus var blevet etableret, blev der gennemført en screeningsvurdering af den generelle velfærd ved hjælp af 30 unger i 3-5 kuld fra uafhængige parringer. Afkommet blev overvåget ved bestemte milepæle i koloniens udvikling – ved fødslen, 14 dage efter fødslen (i forbindelse med identifikation af unger og gendannelse af væv med henblik på genotypebestemmelse) og ved fravænning. Der blev udviklet et passende scoringsark på basis af et GA-velfærdsvurderingsark (Wells et al. 2006). Observationer af ungerne blev gennemført af dyreteknikere ved observation af burene, hvor de koloniansvarlige overvågede de genotypiske forhold. Musene blev placeret i grupper i individuelt ventilerede bure med strøelse, redemateriale og miljøberigelse efter behov. Dyreteknikere foretog vurderinger gennem observationer af burene under dyrenes daglige samspil, indtil musene nåede den kønsmodne alder. Langsigtede vurderinger for aldersrelaterede uønskede velfærdsvirkninger blev overvåget og registreret hos opdrætsdyr og fremtidige avlsdyr. Eventuelle observationer blev sammenlignet med baggrundsstammen, og deres relevans blev vurderet.

2.1.2 Prospektiv vurdering

Hvad bliver der gjort ved dyrene i forsøget?	Hvad oplever dyrene? Hvor megen lidelse kan der være forbundet hermed? Hvad kan forværre lidelsen?	Hvorledes vil lidelsen blive reduceret til et minimum?	
	Bivirkninger	Metodologi og indgreb	Endepunkter
Effekt af genetisk modificering ved	Genetisk modificering kan medføre kliniske bivirkninger	Løbende overvågning af bure Velfærdsvurdering på bestemte	Dyrene aflives, hvis der sker overskridelse af belastningsgraden

baseline	I tilfælde, hvor disse er uforudsigelige, vil enhver indikation af, at dyrene med mutationen har flyttet sig væk fra normale fysiske eller adfærdsmæssige parametre (dvs. dem, der er kendt, forekommer i genetiske baggrundsrelaterede fænotyper og/eller vildtypekontroller), kunne tyde på et velfærdsproblem.	udviklingstidspunkter; fødsel, fravænning og kønsmodenhed Afhængigt af karakteren af eventuelle påviste bivirkninger vil der blive anvendt passende lindrende faktorer, hvor det er muligt, f.eks. ændrede opdrætsstrategier eller forfinelser af pasningsfaciliteter (eksempelvis tildeling af mere redemateriale for at forebygge nedsat termoregulering)	moderat belastende
Vævsprøvetagning til genotypebestemmelse	Potentiel smerte og/eller angst forårsaget af metoden til vævsprøvetagning, f.eks. perforering/klipning af øret eller afklipning af halespids Halebiopsi anvendes normalt, hvis det er nødvendigt med større mængder DNA, men kan forårsage både kortvarig og langvarig smerte (sidstnævnte på grund af neuromdannelse)	Hvis enkeltindivider identificeres ved hjælp af øreklipning, er det god praksis at anvende ørevævet til genotypebestemmelse, hvor det er muligt. I forbindelse med halebiopsi bør der kun afklippes et mindre halestykke (vær opmærksom på, at gentagen prøvetagning er yderst uønsket), anæstesi og analgetika anvendes efter behov, og kraftig blødning behandles med det samme	Ikke relevant, da forsøget skal være en "éngangsforestilling", og det er usandsynligt, at dette medfører smerte eller angst på et niveau, hvor det vil være nødvendigt at foretage aflivning på en human måde.

		Udviklingen i mindre invasive teknikker bør overvåges, evalueres lokalt og implementeres, hvis det er muligt	
Fænotypebestemmelse	Stress induceret ved håndtering eller anvendelse af den fænotypiske metode, f.eks. stress i forbindelse med anbringelse i et uvant miljø, indgivelse af forsøgsstoffer for at inducere en respons, infektionsovervågning, anæstesi og fiksering i forbindelse med billeddiagnostik osv.	Oplæring af personale, som udfører fænotypebestemmelse gennem kompetent, empatisk og standardiseret håndtering og observationer. Anvendelse af anæstetika under billeddiagnostik eller smertefulde forsøg. Strukturering af fænotypiske test fra det mindst invasive (f.eks. observation af adfærd i et åbent anlæg) til det mest invasive (f.eks. forsøg, som kræver anæstesi)	Hvis mutationen udløser en svær respons på en fænotypisk analyse, nås de humane endepunkter, og dyrene aflives på en human måde.

Det undersøgte gen er en ny mutant med næsten ukendte bivirkninger. Erfaringerne i denne virksomhed har vist, at hovedparten af lignende modeller generelt viser en mild fænotype. Lejlighedsvis vil en model imidlertid uventet vise moderate kliniske tegn, og derfor ville dette eksempel på denne baggrund prospektivt blive klassificeret som MODERAT BELASTENDE.

2.1.3 Resultater

Indledende vurdering af nyfødte dyr (ved fødslen):

Ugernes farve: (kun for nyfødte unger)	Normal
Ugernes aktivitet (kun for nyfødte unger)	Normal
Mælkehvide pletter (kun for nyfødte unger)	Til stede
Kuld	Alle unger tilpassede sig baggrundsparemetrene med hensyn til kuldstørrelser, kuldhomogenitet samt udvikling og vækst

Følgende indikatorer blev observeret 14 dage efter fødsel og fravæning:

Generelt udseende	Alle unger var morfologisk "normale" Der blev ikke observeret nogen indikationer af misdannelser
Størrelse, form og	Normal vækst i henhold til standardvækstkurven for

vækst	baggrundsstammen
Pelstilstand	Normal
Adfærd – holdning, gang, aktivitet og samspil med miljøet i buret	Normal adfærd og samspil mellem alle burfæller; der blev ikke observeret nogen hyperaktivitet eller aggression.
Kliniske tegn	Ingen påvist
Relativ størrelse	Normal sammenlignet med baggrunden
Antal	Dødeligheden før fravænning var normal i forhold til baggrunden

Kliniske observationer

Alle observationer og forhold vedrørende nyfødte unger i forhold til fravænning blev anset for at være normale i relation til den genetiske baggrund (C57BL/6N) med homozygote mus, heterozygote mus og vildtype-mus født under normale mendelske forhold.

I 4-ugers alderen gennemgik homozygote mus og vildtypekontrolmus (7+7) en række observationstest og milde proceduretest såsom SHIRPA, dysmorfologi, open field, klinisk blodkemi, DEXA- og Faxitron-billeddiagnostik i en periode på 16 uger. Ved forsøgets afslutning fremhævede den fænotype analyse en reduktion i glukoseclearance hos homozygote mus efter en intraperitoneal glukosetolerancetest (ipGTT). Selv om glukoseclearance blev reduceret under provokationen, vendte alle dyrene efter forsøget tilbage til deres grundlæggende tilstand, og der blev ikke noteret yderligere bivirkninger.

2.1.4 Analyse af resultaterne

Vurdering af konkret belastningsgrad

Efter etablering af kolonien blev der anvendt heterozygote mus og vildtypesøskende fra kullet til at bevare og udvikle kolonien. Der blev ikke observeret nogen skadelige fænotyper hos nogen af de mus, der blev anvendt til opdræt og bevarelse, så disse blev anset for ikke at udvise nogen bivirkninger. Da der ikke forventes nogen skadelig fænotype, kunne denne stamme således gøres homozygot og bevares uden projektgodkendelse.

Ovennævnte parring af heterozygote og heterozygote mus resulterede i homozygote mus. En gruppe af disse mus blev anvendt til en standardfænotypebestemmelse, som bestod af en serie milde protokoller, herunder indsættelse af en nål med henblik på blodprøvetagning under den intraperitoneale glukosetolerancetest. Vildtypekontroller blev testet samtidigt. Den kumulative virkning på musene ville have været let på grund af blodprøvetagningen og efterfølgende fænotypebestemmelsesprocedurer i modsætning til den samlede virkning af den genetiske modificering.

Sammenfatning

Opdræt og bevarelse – ingen bivirkninger

Homozygote mus + kontrolmus – LET BELASTENDE – på grund af screeningstest (ikke virkningen af den genetiske modificering).

Sammenfattende kan denne genetisk modificerede musestamme anses for at have en ikke-skadelig fænotype. Avl i forbindelse med etablerede stammer ville ikke kræve projektgodkendelse under dette direktiv

2.2 Genetisk modificeret musemodel – *Tg(GeneB)^{Labcode}*

2.2.1 Generel baggrund

Der oprettes en koloni af mus med en mutation, der overudtrykker et transgen som en model til undersøgelse af en cancerform. Stammen udvikles i en C57BL/6N-baggrund. Starten på og hastigheden af tumorens udvikling kan ikke identificeres og vil kræve en vurdering som led i karakteriseringen af modellen. Når grundlæggerstammerne er blevet fastlagt, udføres der en screening med henblik på vurdering af den generelle velfærd som beskrevet i afsnit 2.1. Den mest anvendelige stamme progredieres for at undersøge denne type leukæmi.

2.2.2 Prospektiv vurdering

Hvad bliver der gjort ved dyrene i forsøget?	Hvad oplever dyrene? Hvor megen lidelse kan der være forbundet hermed? Hvad kan forværre lidelsen?	Hvorledes vil lidelsen blive reduceret til et minimum?	
	Bivirkninger	Metodologi og indgreb	Endepunkter
Vurdering og karakterisering af tumorudvikling	Tab af vægt og tilstand fortsætter med cancerens udvikling Subkutane hævelser kan forårsage ubehag, påvirke normal adfærd, holdning eller bevægelsesevne Dyrene kan være mere disponeret for sygdom på grund af et kompromitteret immunsystem.	Indgreb baseres på daglige observationer under anvendelse af kriterier såsom vægttab, tab af kropstilstand, letargi osv. Daglige observationer og overvågning af generel sundhed og tumurvækst	Opdræts- og avlsdyr, som viser kliniske tegn, der ikke falder ind under forsøgsprocedurerne, f.eks. vægttab på mere end 15 %, dårlig pelstilstand, letargi, aflives på en human måde. Dyrene aflives, hvis tumoren ulcererer eller interfererer med normal adfærd, holdning eller

			bevægelse eller er større end 1,2 cm i diameter Dyr, som viser tegn på interkurrent sygdom, aflives på en human måde.
--	--	--	--

Den undersøgte model muteres for at skabe den forudsete genetiske sygdom. Starten på sygdommen er ikke nem at forudsige, men kliniske tegn kan foruddefineres for at kunne identificere starten. Den karakteriserede model skal bevares for at muliggøre dens anvendelse i efterfølgende forsøg vedrørende potentielle behandlinger for denne type cancer i løbet af forsøget. På denne baggrund vil dette eksempel prospektivt blive klassificeret som MODERAT BELASTENDE.

2.2.3 Resultater

Der blev gennemført velfærdsvurderinger som i afsnit 2.2 ovenfor. Der blev ikke observeret nogen anormaliteter i udviklingsmæssige milepæle, og der blev noteret vækst frem til den kønsmodne alder. Kolonien blev udvidet med opdrætsdyr og fremtidige avlsdyr parret fra 10-ugers alderen for at bevare kolonien og fremavle nye forsøgsdyr. Dyrene blev overvåget i hele denne periode, og tumorudviklingen blev noteret fra 18-ugers alderen hos 60 % af de dyr, som bar mutationen. Det kliniske forløb af denne sygdom var 4-6 uger, hvorefter det var nødvendigt at aflive dyrene.

2.2.4 Analyse af resultaterne

Vurdering af konkret belastningsgrad

Dyr, som bar mutationen, blev noteret til at udvikle tumorer hos 60 % af dyrene fra 18-ugers alderen. I henhold til avlsstrategien blev dyrene parret fra 10-ugers alderen. Potentialet for avlspar til at udvikle tumorer blev anset for tilstrækkeligt til at ændre opdrættet og bevarelsen. Avlspar blev derefter parret fra 6-ugers alderen, og parringer, som blev opløst inden 12-ugers alderen med avlshanner, blev aflivet. Opdræts- og avlshunner blev overvåget dagligt for at identificere tidlige tegn på tumorudvikling. Dyr, som ikke blev anvendt eller var nødvendige, blev aflivet på en human måde før starten på eventuelle kliniske tegn.

Sammenfatning

Dyr under 18 uger – ingen bivirkninger

Dyr over 18 uger, som udviklede tumorer – LET BELASTENDE på grund af tidlige kliniske endepunkter

Dyr over 18 uger, som udviklede tumorer og blev indsat til anvendelse – LET eller MODERAT BELASTENDE afhængigt af anvendelsen af kliniske endepunkter.

2.3 Genetisk modificeret musemodel – *GeneC*^{tm1a(Funding)Lab}

2.3.1 Generel baggrund

Der blev udviklet en koloni af mus med en mutation i *GeneC*, som er målrettet mod en embryonisk stamcellelinje afledt af C57BL/6N-baggrunden med et kendt fænotypisk potentiale, for at teste adfærd og hukommelse. Modellen blev opretholdt i en defineret baggrund (C57BL/6N). Når overførslen af kimceller for G1-mus var blevet etableret, blev der gennemført en screeningsvurdering af den generelle velfærd.

2.3.2 Prospektiv vurdering

Som i afsnit 2.1 er det undersøgte gen en ny mutant. Det er hensigten at anvende modellen i fremtidige adfærdsforsøg med henblik på at teste nye farmaceutiske forbindelser. Erfaringerne i denne virksomhed har vist, at hovedparten af lignende modeller generelt viser en mild fænotype. Lejlighedsvis vil en model imidlertid uventet vise moderate kliniske tegn, og derfor ville dette eksempel på denne baggrund prospektivt blive klassificeret som MODERAT BELASTENDE.

2.3.3 Resultater

Alle observationer og forhold blev anset for at være normale i relation til denne models genetiske baggrund (C57BL/6N) med homozygote mus, heterozygote mus og vildtype-mus født under normale mendelske forhold.

Da de var 4 uger gamle, gennemgik homozygote mus og vildtype-kontrolmus en række observationer og test for at vurdere indlæring og hukommelse. Disse test blev gennemført over en 10-ugers periode. Ved afslutningen af denne fænotypiske analyse blev der ikke observeret nogen skadelige fænotyper. Modellen blev derefter anvendt til at teste effekten af nye farmaceutiske forbindelser.

Opdrættet af de heterozygote mus betød sunde homozygote dyr, som udviste lignende reproduktionsegenskaber i forhold til baggrundsstammen. Som sådan blev der anvendt en avlsstrategi med homozygote parringer for at reducere antallet af dyr. I modsætning til den oprindelige parring, hvor homozygote mus blev fremavlet ved en parring af heterozygote og heterozygote mus, så den nye gruppe af homozygote dyr, som var fremavlet ved en homozygot forældreparing, ud til at vantrives og genvandt ikke fuldt ud deres størrelse og vægt i sammenligning med deres søskende.

Selv om stammen oprindeligt var tænkt som en adfærds- og hukommelsesmodel, blev der udført yderligere analyse af væv og blod indsamlet fra disse dyr. Under analysen af blodkemiresultater og efterfølgende gennemgang af litteraturen blev *GeneC* fundet at være et afgørende transportprotein, som bindes til vitamin B12. Udeladelsen af *GeneC* resulterede i en afbrydelse af den ekstracellulære transportmekanisme, hvilket giver svækkelser i DNA-syntesen samt i fedt- og proteinmetabolismen. Virkningen af denne mutation ville ikke have kunnet konstateres hos mus født af en heterozygot hunmus, da den maternelle vitamin B12-kilde overføres i livmoderen via placentaen til det udviklende foster. De oprindelige knockout-mus for dette gen havde derfor tilstrækkelig B12 lagret til at gøre det muligt for dem at overleve og trives til mindst 16-ugers alderen, hvilket sikrer normal opdræt og fertilitet i forhold til baggrundsstammen.

2.3.4 Analyse af resultaterne

Vurdering af konkret belastningsgrad

Dette eksempel viser, at kolonibevarelse kan have en omfattende og ofte uventet indvirkning på musene. På baggrund af de hidtil tilgængelige oplysninger og resultater af det primære opdræt og den primære fænotypebestemmelse ville denne koloni ikke have virket påfaldende. Logisk set ville bevarelse af en koloni i forbindelse med en homozygot avlsstrategi normalt sikre, at der blev fremstillet et minimalt antal dyr, hvilket er ønskeligt med henblik på at minimere anvendelsen af dyr. Uforudsete skadelige fænotyper kan forekomme i stammer, som tidligere er blevet bevaret som normale dyr uden projektgodkendelse. Som en konsekvens af de velfærds-mæssige bivirkninger på dyrene i dette eksempel vil denne model skulle bringes tilbage under projektgodkendelse, hvis denne type avlsstrategi blev anvendt.

Sammenfatning

Opdræt og bevarelse af heterozygote parringer – ingen bivirkninger

Opdræt og bevarelse af homozygote parringer – LET BELASTENDE for afkommet af denne generation på grund af manglende trivsel

Eksempel 2.3 – Dette understreger behovet for overførsel af nøjagtige og brugbare velfærdsdata mellem institutterne, hvis der viser sig skadelige fænotyper, f.eks. i form af et "musepas"ⁱ.

ⁱ RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, Det Forenede Kongerige: RSPCA (kan downloades på adressen: <http://www.rspca.org.uk/researchrabbits>)

SÅDAN KONTAKTER DU EU

PERSONLIGT

Der findes flere hundrede Europe Direct-informationscentre i hele EU. Find dit nærmeste center på: https://europa.eu/european-union/contact_da

PR. TELEFON ELLER E-MAIL

Europe Direct er en tjeneste, der besvarer spørgsmål om EU. Kontakt Europe Direct:

- på gratisnummer: **00 800 6 7 8 9 10 11** (visse operatører tager betaling for disse opkald)
- på følgende nummer: **+32 22999696** eller
- pr. e-mail: https://europa.eu/european-union/contact_da

SÅDAN FINDER DU OPLYSNINGER OM EU

ONLINE

Oplysninger om EU er tilgængelige på alle EU's officielle sprog på Europawebstedet: https://europa.eu/european-union/index_da

EU-PUBLIKATIONER

Du kan downloade eller bestille EU-publikationer gratis eller mod betaling på: <https://publications.europa.eu/da/publications>. Du kan bestille flere eksemplarer af de gratis publikationer ved at kontakte Europe Direct eller dit lokale informationscenter (se https://europa.eu/european-union/contact_da).

EU-RET OG RELATEREDE DOKUMENTER

Du kan nemt få adgang til EU's juridiske oplysninger (herunder al EU-ret siden 1952) på alle officielle EU-sprog på EUR-Lex: <http://eur-lex.europa.eu>

ÅBNE DATA FRA EU

EU's portal for åbne data (<http://data.europa.eu/euodp/da>) giver adgang til datasæt fra EU. Dataene kan downloades og genanvendes gratis til både kommercielle og ikkekommercielle formål.

