

Stellungnahme zur Schweregradbeurteilung von Peritonitis- Modellen

1. Einführung

Die Peritonitis ist beim Menschen eine schwere Erkrankung mit sehr variablen klinischen Verläufen. Die Mortalitätsrate schwankt zwischen 10 und 80%. Diese hohe Mortalitätsrate zeigt nicht nur, dass es sich bei einer Peritonitis um eine schwere Erkrankung handelt sondern auch, dass hier weitere Forschung und die Entwicklung verbesserter Therapien notwendig sind. Hierzu existiert eine Reihe von Peritonitis-Modellen im Tierversuch, die die Situation in der Klinik unterschiedlich gut nachbilden. Je nach konkreter Fragestellung, Zielsetzung, Steuerbarkeit der Peritonitis, Empfindlichkeit der Tierart und des Tierstamms, Abbruchkriterien und Endpunkt können verschiedene Modelle bevorzugt Auskunft geben. Aufgrund dieser Punkte hat sich die Kommission zu einer Stellungnahme und einigen Empfehlungen entschlossen, die den Forschenden eine Hilfestellung bei der Zuordnung von Schweregraden bietet. Diese Stellungnahme bezieht sich auf Mäuse und Ratten, die in der Regel für diese Versuche verwendet werden.

2. Zu den Modellen und Methoden

I. Cecal Ligation and Puncture (CLP)

Darunter versteht man die Induktion eines intra-abdominalen Sepsis-Herdes durch chirurgische Schaffung einer endogenen Fäkalquelle. Dies erfolgt im Allgemeinen durch Laparotomie, Ligatur des Caecums, Punktion mit Kanüle, Kompression und Verschluss des Bauches. Die Zuordnung des Schweregrades wird durch die Länge des ligierten Caecums, die Größe und Anzahl der Punktionen und das Vermeiden einer Kompression des Caecums beeinflusst.

II. Bakterieninokulationsmodelle

Unter Bakterieninokulationsmodellen versteht man das Einbringen von Erregern per i. p. Instillation (ev. auch mit Adjuvans) oder Dauerkatheter (unsterile Implantation). Häufig verwendete Erreger sind *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* oder auch Kombinationen. Bei Bakterieninokulationsmodellen

wird die Belastung¹ der Tiere und die Zuordnung von Schweregraden durch die Art und Menge der Bakterien entscheidend beeinflusst.

III. Sterile Peritonitis-Modelle

Hierzu gehört die Instillation von Immunogenen, wie Lipopolysaccharid (LPS), Zymosan oder Thioglykolat. Sterile Modelle wirken rasch und die tatsächlich auftretende Belastung kann je nach Art und Dosis sehr stark variieren (Thioglykolat z. B. kann eine akute, massive und sehr schmerzhaftige Entzündung erzeugen).

3. Empfehlungen

- Die Antragstellerin/der Antragsteller muss sich die Fragen stellen, ob das gewählte Peritonitis-Modell jenes ist, dass dem Projektziel am besten entspricht (Ätiologie und Symptomatik in der Klinik, Tierart etc.) und ob es das Modell mit der geringsten Belastung für die Tiere ist, mit dem das Projektziel erreicht werden kann.
- Die leitenden Grundsätze in § 6 und § 8 TVG 2012 verlangen, dass Tierversuche so zu gestalten sind, dass sie die geringsten Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhaften Schäden verursachen. Tierversuche mit Peritonitis-Modellen sind unter der Verwendung von geeigneten Schmerzmitteln durchzuführen, es sei denn, die Verabreichung der Schmerzmittel ist für das Tier belastender als der Tierversuch selbst. Ausnahmen sind schlüssig zu begründen (z. B. geringe Belastung durch kurze Beobachtungsdauer, bekanntes Agens oder niedrige Dosis; oder z. B. mit der Unvereinbarkeit mit dem Projektziel aufgrund des antiphlogistischen Einfluss des Schmerzmittels auf das Immunsystem oder anderen Nebenwirkungen, wie erhöhte Morbidität oder Mortalität, die mit den 3R Prinzipien unvereinbar sind). Ein weiteres Argument für den Einsatz von Schmerzmitteln ist, dass Tiermodelle der klinischen Praxis möglichst ähnlich sein sollten. Die Wahl des Schmerzmittels sollte mit Bedacht erfolgen und im Sinne des Tierwohls mit einer sachkundigen Tierärztin/einem sachkundigen Tierarzt abgestimmt werden. Es ist auch zu beachten, dass Mäuse und Ratten in einem späteren Stadium der Peritonitis nicht mehr trinken und daher eine Verabreichung über das Trinkwasser nicht zielführend ist.

¹ Belastung: Schmerzen, Leiden, Ängste und dauerhafte Schäden gemäß § 2 Z 1 lit. a TVG 2012

- Der Tod ist als Endpunkt eines Tierversuchs, wegen des in dem Zeitraum vor dem Tod empfundenen schweren Leidens, möglichst zu vermeiden und durch frühe und möglichst schmerzlose Endpunkte zu ersetzen. Diese sollten die frühestmöglichen klinischen Anzeichen verwenden, mit denen der bevorstehende Tod früh erkannt werden kann, um es dadurch zu ermöglichen, das Tier möglichst schmerzlos zu töten. Sobald aus dem Verlauf der Peritonitis keine entscheidenden wissenschaftlichen Erkenntnisse mehr gewonnen werden können, sollte das Tier ebenfalls möglichst schmerzlos getötet werden. Ist der Tod als Endpunkt unvermeidbar, muss der Tierversuch so gestaltet sein, dass a) möglichst wenige Tiere sterben, b) die Dauer und Intensität der Schmerzen, des Leidens und der Ängste auf das geringstmögliche Maß reduziert wird und c) die Tötung soweit als möglich schmerzfrei ist (§ 6 TVG 2012).
- Eine detaillierte Beschreibung der Abbruchkriterien bzw. frühen und möglichst schmerzlosen Endpunkte ist essentiell. Die gewählten Kriterien und Endpunkte sollten ausführlich begründet werden und sicherstellen, dass eine Überschreitung des in der Projektgenehmigung festgelegten Schweregrades, durch rechtzeitiges Erkennen und rasches Eingreifen (durch z.B. Abbruch, Euthanasie oder Schmerzmittel) vermieden werden kann. Die Abbruchkriterien haben nicht nur auf die Schweregradbeurteilung, sondern auch auf die Schaden-Nutzen-Analyse einen Einfluss.
- Es müssen Aufzeichnungen über die Belastung des einzelnen Tieres geführt werden. Zur individuellen Beurteilung des tatsächlich aufgetretenen Schweregrades können die Aufzeichnungen z. B. Körpertemperatur und Körpergewicht, die physische Erscheinung, Dehydration, klinische Zeichen, die Reaktionsfähigkeit, Mouse oder Rat Grimace Scale oder Body Condition Scoring (letzteres v. a. bei chronischem und subchronischem Verlauf) (siehe Literaturhinweise) herangezogen werden. Die Erfassung solcher Daten kann jedoch ebenfalls eine Belastung darstellen und sollte daher mit den durch das Peritonitis-Modell ausgelösten Belastungen in Relation stehen. Der tatsächlich auftretende Schweregrad kann je nach Peritonitis-Modell, Tierart, Genotyp und Versuchsverlauf sehr stark variieren.
- Antragsteller/Antragstellerinnen, die mit den beantragten Peritonitis-Modellen bereits erfahren sind, wird empfohlen ihrem Antrag Dokumentation zu ihren Beobachtungen über die Belastung der Tiere beizulegen. Zur

Optimierung der Versuchsbedingungen sind gegebenenfalls zuerst Pilotversuche an einer kleinen Anzahl von Tieren durchzuführen. Pilotversuche sollten auch durchgeführt werden um festzustellen, ob die definierten Abbruchkriterien und das verwendete Analgesie-Regime zu einer Verminderung der Belastung führen. Als Alternative können Projekte mit Peritonitis-Modellen auch stufenweise und mit „Milestones“ aufgebaut werden um die Belastung für die Tiere besser abzuschätzen und um rechtzeitig zu erkennen, ob das Projektziel mit der gewählten Methode erreichbar ist. Eine Zwischenevaluierung (z. B. nach ersten Pilotversuchen mit bis zu 30 Tieren) ist möglich und wird ausdrücklich empfohlen. Die Vorlage von Zwischenberichten an die Behörde kann als Auflage in der Genehmigung vorgesehen werden.

I. Cecal Ligation and Puncture (CLP) und ähnliche Modelle

Diese Modelle erfordern einen chirurgischen Eingriff (zumindest Schweregrad „mittel“), sind schwierig zu standardisieren und damit ist die Belastung der Tiere schwierig abzuschätzen. Die Schwere der Reaktion bzw. Belastung hängt von Faktoren wie Größe der Caecum-Punktion, Menge des austretenden Darminhalts, Immunsystem oder Genetik der Tiere, Beobachtungsdauer usw. ab. Da eine schwere Belastung für einzelne Tiere nicht dezidiert ausgeschlossen werden kann, ist bei diesen Tierversuchen im Allgemeinen von einem höchsten zu erwartenden Schweregrad „schwer“ auszugehen.

II. Bakterieninokulationsmodelle

Bei Bakterieninokulationsmodellen wird die Belastung hauptsächlich durch die Art und Menge der Bakterien, aber auch durch das Immunsystem oder die Genetik der Tiere oder durch die Beobachtungsdauer beeinflusst. Diese Modelle sind gut zu standardisieren und damit ist auch die Belastung der Tiere wesentlich besser abzuschätzen. Die Tierversuche können im Einzelfall aufgrund der vorgelegten Dokumentation einem Schweregrad zugeordnet werden. Die Dokumentation muss eindeutige Beobachtungen über die Belastung der Tiere enthalten (z. B. aus früheren Projekten). Verweise auf Publikationen ohne Belastungs-relevante Beobachtungen sind für die Zuordnung von Schweregraden nicht ausreichend.

III. Sterile Peritonitis-Modelle

Bei sterilen Inflammationsmodellen wird die Belastung hauptsächlich durch die Art und Menge des induzierenden Agens, aber auch das Immunsystem oder die Genetik der Tiere oder die Beobachtungsdauer beeinflusst. Auch diese Modelle sind gut zu standardisieren und die Belastung für die Tiere gut abzuschätzen. Die Zuordnung zum Schweregrad wird durch die Vorlage von Dokumentation aus früheren Versuchen erleichtert.

– Thioglykolat

Thioglykolat erzeugt eine akute, massive und sehr schmerzhafteste Entzündung und ist daher bei Standardprotokollen (meist 1 ml 4% Thioglykolat-Medium oder 2 bis 3 ml 3% Thioglykolat-Medium) dem Schweregrad „schwer“ zuzuordnen. Bei einer Beobachtungsdauer bei der nur das Einwandern von Neutrophilen und kaum Schmerzen zu erwarten sind (Abbruch <12h), kann die Belastung auch dem Schweregrad „mittel“ zugeordnet werden.

– Lipopolysaccharid (LPS) oder Zymosan

Wegen möglicher Variationen in den Eigenschaften des induzierenden Agens, sollte bei diesen Modellen jede Produktionscharge zur Kontrolle der Wirkung im Tier in einem Pilotexperiment getestet werden. Die Tierversuche sind im Einzelfall aufgrund der vorgelegten Dokumentation einem Schweregrad zuzuordnen.

Konsensus

Bei der Zuordnung der Schweregrade zu Tierversuchen mit Peritonitis-Modellen ist den folgenden Prinzipien zu folgen: 1) das Risiko für eine höhere Belastung als den angegebenen Schweregrad kann ausgeschlossen werden und 2) dies kann von der Antragstellerin/dem Antragsteller nachvollziehbar begründet und durch entsprechende Dokumentation belegt werden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Peritonitis-Modelle

| Modell | Charakteristika | Schweregrad | Begründung |
|--|---|--------------------|--|
| Cecal Ligation and Puncture (CLP) und ähnliche Modelle | erfordern einen chirurgischen Eingriff, schwierig zu standardisieren | schwer | schwere Belastung kann nicht für alle einzelnen Tiere dezidiert ausgeschlossen werden; |
| Bakterieninokulationsmodelle | Belastung von Art und Menge der Bakterien, dem Immunsystem oder Genetik der Tiere oder der Beobachtungsdauer beeinflusst. | gering – schwer | besser zu standardisieren, Belastung gut abschätzbar; sind im Einzelfall aufgrund der vorgelegten Dokumentation einem Schweregrad zuzuordnen; |
| Sterile Inflammationsmodelle | Belastung von Art und Menge des induzierenden Agens, dem Immunsystem oder Genetik der Tiere oder der Beobachtungsdauer beeinflusst. | gering – schwer | sind im Einzelfall aufgrund der vorgelegten Dokumentation einem Schweregrad zuzuordnen; |
| – Thioglykolat | > 12h Beobachtungszeit, akute, massive Entzündung | schwer | erzeugt eine akute, massive und sehr schmerzhaft Entzündung; |
| | < 12h Beobachtungszeit, nur Einwandern von Neutrophilen | mittel | kaum Schmerzen zu erwarten; |
| – Lipopolysaccharid (LPS) oder Zymosan | gut zu dosieren und abzuschätzen, reversibel | gering – schwer | sind im Einzelfall aufgrund der vorgelegten Dokumentation einem Schweregrad zuzuordnen; |

Schweregrade (nach § 3 TVG 2012) im Kontext Peritonitis

Einstufungen in die Schweregrade „gering“ und „mittel“ sind unter folgenden Voraussetzungen möglich:

Für eine Einstufung in Schweregrad „gering“ sollte die Belastung nicht länger als bis maximal 6 Stunden nach Verabreichung des induzierenden Agens anhalten und eine Wiederherstellung des Normalzustandes des Tieres zu erwarten sein (z. B. geringe Dosis LPS).

Für eine Einstufung in Schweregrad „mittel“ sollte die Belastung nicht länger als bis maximal 12 bis 16 Stunden nach Verabreichung des induzierenden Agens anhalten (mit vollständiger Wiederherstellung des Normalzustandes des Tieres oder Sakrifizierung), z. B. kurze Beobachtungszeiten nach Thioglykolatgabe (maximal 12h) oder Bakterienmodelle mit mildem Verlauf (maximal 16h).

Grimace scales und Body Condition Scoring

Mouse Grimace Scale (<https://www.nc3rs.org.uk/grimacescales>)

Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, Lacroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS. Nat Methods. 2010 Jun;7(6):447-9.

Rat Grimace Scale (<https://www.nc3rs.org.uk/rat-grimace-scale>)

Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Maplebeck JCS, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. Molecular Pain 7: 55.

Body Condition Scoring

Ullman-Culleré MH1, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. Lab Anim Sci. 1999 Jun;49(3):319-23.

Hickman DL, Swan M. Use of a Body Condition Score Technique to Assess Health Status in a Rat Model of Polycystic Kidney Disease. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS. 2010;49(2):155-159.

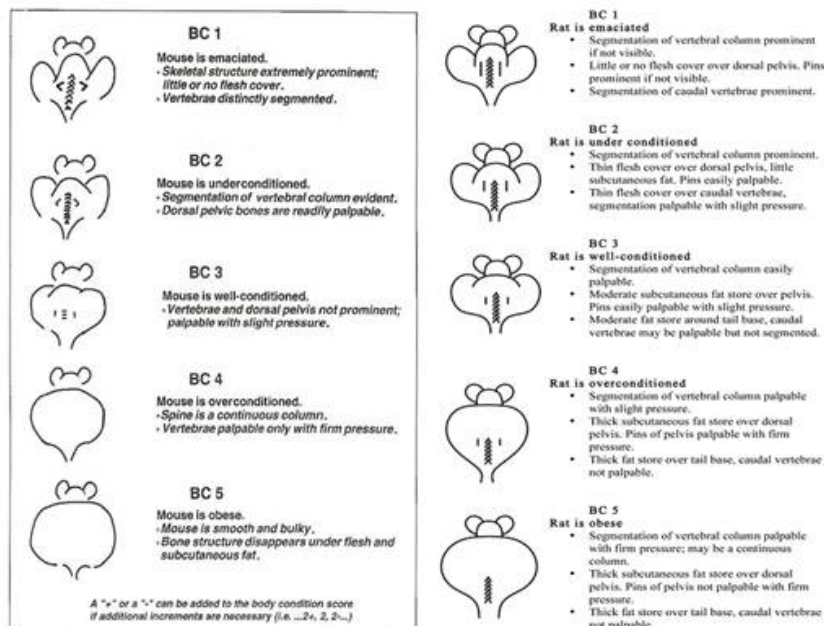


Abbildung 1: Body Condition Scoring

Empfohlene rezente Literatur (2012-2016)

Radermacher P, van Griensven M, Thiernemann C. Humane end points in experimental models of septic shock: a must, not a superfluous nightmare for researchers! *Shock*. 2013 Jun;39(6):541-2.

Huet O, Ramsey D, Miljavec S, Jenney A, Aubron C, Aprico A, Stefanovic N, Balkau B, Head GA, de Haan JB, Chin-Dusting JP. Ensuring animal welfare while meeting scientific aims using a murine pneumonia model of septic shock. *Shock*. 2013 Jun;39(6):488-94

Osuchowski M, Redl H, Radermacher P. Implementing refinements in preclinical sepsis modeling: walking a fine line between what ethics condones and the gaping investigative holes call for. *Shock*. 2015 Apr;43(4):422-3.

Lilley E, Armstrong R, Clark N, Gray P, Hawkins P, Mason K, López-Salesansky N, Stark AK, Jackson SK, Thiernemann C, Nandi M. Refinement of animal models of sepsis and septic shock. *Shock*. 2015 Apr;43(4):304-16.

Franco NH, Correia-Neves M, Olsson IA. How "humane" is your endpoint? Refining the science-driven approach for termination of animal studies of chronic infection. *PLoS Pathog*. 2012 Jan;8(1):e1002399.

Huet O, de Haan JB. The ethical dimension in published animal research in critical care: the dark side of our moon. *Crit Care*. 2014 Mar 13;18(2):120.

Shrum B, Anantha RV, Xu SX, Donnelly M, Haeryfar SM, McCormick JK, Mele T. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes*. 2014 Apr 12;7:233.

Cotroneo TM, Hugunin KM, Shuster KA, Hwang HJ, Kakaraparthi BN, Nemzek-Hamlin JA. Effects of buprenorphine on a cecal ligation and puncture model in C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012 May;51(3):357-65.

Nardi GM, Bet AC, Sordi R, Fernandes D, Assreuy J. Opioid analgesics in experimental sepsis: effects on physiological, biochemical, and haemodynamic parameters. *Fundam Clin Pharmacol*. 2013 Aug;27(4):347-53.

Schläpfer M, Piegeler T, Dull RO, Schwartz DE, Mao M, Bonini MG, Z'Graggen BR, Beck-Schimmer B, Minshall RD. Propofol increases morbidity and mortality in a rat model of sepsis. *Crit Care*. 2015 Feb 19;19:45.