

Fachinformation

**Aus dem Ausschuss für Genetik und
Labortierzucht – (GV-SOLAS)**

Kennzeichnung und Genotypisierung von Nagern

Stand November 2018

**Autoren: Boris Jerchow, Dirk Wedekind,
Thorsten Buch, Peter Dobrowolski**

Inhaltsverzeichnis

1.	Ausgangslage und Ziel.....	3
2.	Gleichzeitige Entnahme von Gewebe und Markierung	3
2.1.	Ohrlochung.....	3
2.2.	Amputation der distalen Phalanx	3
3.	Markierungsmethoden.....	4
3.1.	Tätowierung	4
3.2.	Mikrochips	4
3.3.	Farbmarkierungen	5
3.4.	Ohrmarken	5
4.	Gewebeentnahme	5
4.1.	Amputation der Schwanzspitze	5
4.2.	Blutentnahme	6
4.3.	Nicht-invasive Methoden	6
5.	Tierschutzrechtliche Einordnung	7
6.	Empfehlungen	8
7.	Literatur	9

Stichwörter: Genotypisierung, Biopsien, Gewebeentnahme, Kennzeichnung, Tierschutz

1. Ausgangslage und Ziel

Labornager, vor allem die Maus *Mus musculus* sowie die Ratte *Rattus norvegicus*, stellen traditionell wichtige und viel genutzte Labortiere dar. Durch die Entwicklung und Etablierung von Methoden zur gentechnischen Veränderung dieser Spezies hat sich in den vergangenen 25 Jahren die Zahl von Linien mit unterschiedlichen mutierten Allelen und Transgenen sprunghaft vergrößert. Heute werden viele unterschiedliche Linien parallel in Labortierhaltungen gehalten. Es ist daher für Labortierhaltungen unerlässlich, die Tiere all dieser Linien so zu markieren, dass eine eindeutige Unterscheidung aller Individuen möglich ist. Darüber hinaus besteht in den meisten Fällen die Notwendigkeit, genomisches Material der Tiere zu isolieren, um deren exakten Genotyp festzustellen. Über die Jahre fanden dabei verschiedene Methoden Anwendung. Ziel dieses Manuskripts ist es, eine Auswahl von Methoden näher zu beleuchten und deren Praktikabilität der den Tieren zugefügten Belastung gegenüberzustellen. Nachfolgend beschreiben wir zunächst Techniken, die ein gleichzeitiges Markieren und Biopsieren der Tiere erlauben. Im Anschluss werden Methoden diskutiert, die ausschließlich der Markierung bzw. ausschließlich der Gewebegewinnung dienen. Diese sind zu kombinieren, wenn die Genotypen von Nagern in einer Gruppe bestimmt werden müssen. Alle Methoden werden, wenn nicht anders angegeben, ohne Narkose durchgeführt.

2. Gleichzeitige Entnahme von Gewebe und Markierung

2.1. Ohrlochung

Gegenüber den meisten anderen Methoden hat die Ohrlochung den Vorteil, dass dabei die Tiere sowohl markiert werden, als auch eine Gewebeprobe gewonnen wird. Das Biopsiematerial kann dann für die Genotypbestimmung mittels molekularbiologischer Methoden verwendet werden. Anhand eines Schemas mit einer Kombination von Löchern und Kerben über beide Ohren können Tiere mit Nummerncodes von 1 bis 100 nummeriert werden¹. Um die Belastung der Tiere so gering wie möglich zu halten, ist die Verwendung eines scharfen Werkzeugs zum Ausstanzen der Löcher und Kerben wichtig. Außerdem muss darauf geachtet werden, das Werkzeug zwischen zwei Tieren gründlich zu reinigen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

2.2. Amputation der distalen Phalanx

Die *Phalanx distalis* stellt das äußerste Zehenglied dar. Zur richtigen Zeit mit einer scharfen Mikroschere präzise durchgeführt erlaubt die Amputation der distalen Phalanx eine frühe Gewinnung von Gewebe zur DNA-Isolation sowie eine permanente Markierung bei geringer Belastung der Tiere. Zu einem so frühen Zeitpunkt erlaubt dies keine andere Methode. Dazu muss das Zehenglied groß genug jedoch noch nicht verknöchert sein. Gleichzeitig sollten die Jungtiere möglichst noch in einem Entwicklungsstadium sein, in dem sie wenig motorische Aktivität zeigen. Nach den vorliegenden Daten ergibt sich ein Alter von 5 bis 7 Tagen als optimaler Zeitraum²⁻⁴. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl der Amputationsvorgang selbst als auch das Fehlen des Zehengliedes nur eine sehr geringe Belastung der Tiere darstellt^{2,3}. Zur Beurteilung der Schmerzbelastung gelten dieselben Überlegungen, wie bei der Amputation der Schwanzspitze. Demnach ist von einer stark verminderten Schmerzwahrnehmung bei Mäusen in den ersten 10 Lebenstagen auszugehen. Neben dem Einhalten des optimalen Zeitfensters ist darauf zu achten, nicht zu viel, aber auch nicht zu wenig vom Zeh abzusetzen – also die distale Phalanx präzise zu amputieren. Andernfalls kann die Haltekraft beeinträchtigt bzw. eine Identifikation des Tieres unmöglich werden, da die Krallen

nachwächst. Aus diesem Grund sollte die Technik nur von erfahrenem Personal nach gründlicher Einarbeitung durchgeführt werden. Bei der Neueinführung der Zehenspitzenamputation sollte bei der Vermittlung berücksichtigt werden, dass diese Methode durch ihre Verwechslung mit der Amputation der gesamten Zehe sowie eine anthropozentrische Sichtweise bei vielen Tierpflegern und Wissenschaftlern auf Ablehnung stößt. Insgesamt ist die Technik als eine robuste Markierungsmethode zu empfehlen, bei der gleichzeitig Gewebe für eine Genotypisierung anfällt und die Belastung der Tiere gering ist

3. Markierungsmethoden

3.1. Tätowierung

Das Tätowieren von Mäusen ist relativ leicht zu erlernen. Im einfachsten Fall wird dabei Tätowiertinte mit einer feinen Kanüle ohne weitere Werkzeuge in die Dermis der Haut eingebracht (Mikrotätowierung). Alternativ wird auch eine Tätowierpinzette zum Halten der Kanüle verwendet. Prinzipiell eignen sich alle nicht behaarten Körperteile von Nagern für die Tätowierung. In der Regel werden der Schwanz oder die Fußballen verwendet. Während gerade auf dem Schwanz einer Ratte genügend Raum, gegebenenfalls auch für mehrstellige Zahlen, ist, kann eine Vielzahl von Individuen auch durch einen Punktkode unter Einbeziehung der vier Pfoten oder der beiden Ohren unterschieden werden. Zur Tätowierung der Ohren ist jedoch der Einsatz einer speziellen Tätowierzange erforderlich. Es ist zu beachten, dass das Markieren von Ohren mit der Tätowierzange eine größere Belastung für die Tiere darzustellen scheint als die Mikrotätowierung der Fußballen⁵.

Verschiedene Firmen bieten auch Tätowierautomaten speziell für Labornager an, die das Tätowieren selbst noch einmal vereinfachen und es auch erlauben, Tiere mit leicht lesbaren alphanumerischen Codes zu markieren. Einzelne Geräte erlauben dabei einen vollautomatischen Tätowiervorgang und gewährleisten damit eine standardisierte Durchführung. Die Desinfektion der Geräte zwischen einzelnen Tieren stellt jedoch mitunter eine Herausforderung dar und kann so zu einem hygienischen Problem in der Haltung werden.

3.2. Mikrochips

In den letzten Jahren wurden Mikrochips oder Mikrotranspondern immer weiter verkleinert. Dadurch ist auch die Belastung der Tiere durch das Implantieren und das Tragen der Chips inzwischen sehr gering. In wenigen Fällen wurden Entzündungsreaktionen an der Implantationsstelle beobachtet⁶. Ebenfalls selten kann es zur Entwicklung von Tumoren an der Implantationsstelle kommen⁷⁻⁹. Die Verwendung von Mikrochips stellt jedoch eine kostspielige Methode dar, Nager zu markieren. Die Tiernummern werden mit Hilfe eines Lesegerätes ermittelt. Derartige Lesegeräte müssen also in allen Bereichen vorhanden sein, in denen mit den mit einem Chip versehenen Tieren gearbeitet wird. Die Programme zum Auslesen der Tiernummern erlauben es, mit dem Tier eine Reihe weiterer Informationen zu verknüpfen, die beim Einlesen sofort angezeigt und ergänzt werden können. Gerade bei komplexen Studien ist dies mitunter sehr hilfreich. Wenn der Empfänger bei einer Weitergabe der Tiere nicht über ein geeignetes Lesegerät verfügt und die Tiere anders nicht eindeutig zuzuordnen sind, kann eine erneute Markierung notwendig werden.

3.3. Farbmarkierungen

Vor allem neugeborene Tiere können, bevor ein dichtes Fell gewachsen ist, also auf der Bauchseite, bis zum Alter von etwa 10 Tagen, gut mit Permanentmarkern oder auch Viehkennzeichnungsstiften gekennzeichnet werden. Ältere Tiere können an haarlosen Stellen, beispielsweise des Schwanzes oder der Ohren markiert werden. Die Belastung der Tiere durch das Markieren selbst ist zu vernachlässigen. Je nach Markierungsort müssen die Tiere zum Ablesen nicht einmal berührt werden. Nachteilig ist jedoch, dass die Markierung häufig erneuert und die Tiere dazu fixiert werden müssen. Die Farbstoffe können beim Putzen oder direkt durch die Haut aufgenommen werden. Gesundheitsschädliche oder reizende Farben sind entsprechend gekennzeichnet und dürfen nicht verwendet werden. Mögliche Effekte sind im Zusammenhang mit experimentellen Ansätzen zu prüfen.

3.4. Ohrmarken

Ohrmarken bieten den Vorteil, dass Tiere mit individuellen, relativ leicht zu lesenden Nummern oder mit maschinenlesbarem Code auch bei großen Tierzahlen eindeutig markiert werden können. Ohrmarken aus Plastik – genauer: aus Nylon – haben dabei eine Reihe von Vorteilen gegenüber denen aus Metall. Zunächst sind Nylonmarken erheblich leichter. Obwohl der Unterschied in absoluten Zahlen gering ist, spielt er in Relation zum Gewicht der Maus sehr wohl eine Rolle. Es wird immer wieder berichtet, dass Ohrmarken herausgerissen werden bzw. sich die Tiere beim Putzen oder auch beim Kämpfen darin verfangen. Abhilfe schaffen hier kleinere knopfartige Ohrmarken. Diese verringern nicht nur die Verletzungsgefahr, sondern sind, wegen ihrer geringeren Größe, auch leichter. Daneben gibt es verschiedene Berichte über negative Effekte von Entzündungsreaktionen bis hin zu vereinzelter Tumorentstehung, die in Zusammenhang mit Ohrmarken aus Metall stehen sollen¹⁰⁻¹³.

4. Gewebeentnahme

4.1. Amputation der Schwanzspitze

Die Schwanzspitzenamputation ist leicht durchzuführen und liefert im Vergleich zu anderen Biopsiemethoden viel genomische DNA. Damit wird sie insbesondere dann vorgezogen, wenn nachfolgende Analysemethoden auf große DNA-Menge angewiesen sind, wie dies beispielsweise beim Southern Blot der Fall ist. Die mitunter vorgebrachte Begründung, andere Methoden lieferten keine ausreichenden DNA-Mengen für eine PCR-Reaktion ist jedoch nicht haltbar.

Die Schwanzspitze kann auch schon bei neugeborenen Jungtieren am ersten Lebenstag leicht abgesetzt werden, so dass ein sehr frühes Genotypisieren möglich wird.

Studien legen nahe, dass das Schmerzempfinden bei der Amputation der Schwanzspitze mit dem Alter der Tiere und mit der damit einhergehenden Verknöcherung vorher knorpeliger Strukturen im Schwanz zunimmt. Die dem zugrundeliegenden Reifungsprozesse unterscheiden sich bei verschiedenen Hintergrundstämmen. Vor allem der häufig verwendete Hintergrundstamm C57BL/6 zeigt frühe Verknöcherung der distalen Schwanzwirbel. Das optimale Alter für eine Schwanzbiopsie ist demnach 1 bis 16 Tage. Hier ist die Menge an zu isolierender DNA im Verhältnis zur amputierten Schwanzlänge maximal^{14,15}.

Die Belastung der Tiere durch die Amputation der Schwanzspitze konnte bisher nicht sicher bestimmt werden. So überdeckt bei 7 Tage alten Jungtieren der akute Anstieg von Kortikosteron im Serum, der alleine durch das Handling ausgelöst wird, Effekte, die möglicherweise durch den Schmerzreiz verursacht werden². Dagegen konnte am Tag 15 eine Erhöhung durch die Amputation von 5 mm Schwanz gezeigt werden¹⁶. Bei älteren C57BL/6J-Mäusen sind keine und bei 129S6-Mäusen nur sehr geringe Langzeiteffekte auf nozizeptive Stimuli nachweisbar¹⁷. Genauso wenig konnten Einflüsse auf das Angstverhalten noch auf die Fähigkeit zu Klettern oder zu Balancieren nachgewiesen werden¹⁸. Aufgrund einer Reihe von Untersuchungen gehen wir davon aus, dass bei den Nesthockern der Spezies Maus und Ratte in den ersten 10 Tagen nach der Geburt die Wahrnehmung von Schmerz noch unterentwickelt ist¹⁹⁻²¹. Ein Übersichtsartikel aus dem Jahr 2014 kommt zu dem Schluss, dass bei neurologisch nicht ausgereiften Tieren insgesamt lediglich von einer relativ undifferenzierten Erfahrung von Unwohlsein auszugehen ist, die durch eine neurale Reizverarbeitung auf Ebenen unterhalb des Cortex erzeugt werden²². Die Primärliteratur ist hier jedoch unübersichtlich und gezielte Studien zu Langzeitfolgen von in der ersten Lebenswoche durchgeführten Biopsien liegen unseres Wissens nicht vor.

Der Nutzen von Anästhesie und Analgesie wird kontrovers diskutiert. Während eine Vollnarkose selbst stärker belastend sein kann als die Schwanzbiopsie, ist der Einsatz eines Lokalanästhetikums zu erwägen. Der beste analgetische Effekt konnte für eine eiskalte 70%ige Ethanollösung nachgewiesen werden, während Lidocain keinen positiven Effekt zeigte¹⁶. Eine Anästhesie sollte bis Tag 10 nicht, jedoch spätestens ab einem Alter von 4 Wochen durchgeführt werden.

Zusammenfassend halten wir eine innerhalb der ersten Lebenswoche durchgeführte Schwanzbiopsie für eine sehr belastungsarme Methode der Gewebegewinnung. Dabei sollte möglichst nur 1 mm Schwanz amputiert werden, bei älteren Tieren, wenn die Unerlässlichkeit nachgewiesen ist, bis zu 5 mm.

4.2. Blutentnahme

In den vergangenen Jahren wurden bei Nagern Blutentnahmetechniken so weit optimiert, dass diese mit einer relativ geringen Belastung für das Versuchstier angewendet werden können. Bei der Maus kann die Entnahme durch entsprechend geübtes Personal beispielsweise aus der *Vena saphena*, der *Vena facialis* oder der Schwanzvene ohne Narkose erfolgen²³. Je nach Tiermodell kann das Blut entweder als Quelle für genomische DNA dienen²⁴ oder mithilfe anderer Parameter, beispielsweise durch mikroskopische oder zytometrische Analysen, eine phänotypische Einordnung der Tiere erlauben²⁵. EDTA-Blut ist aufgrund der Inhibierung der PCR nicht für Genotypisierungszwecke geeignet.

Bei der Blutentnahme sollte immer so wenig Blut wie nötig gewonnen werden. In jedem Fall sollten jedoch die maximalen Entnahmemengen berücksichtigt werden, die bei der Maus bei 10% des Blutvolumens, bei wiederholter Entnahme bei 7,5% des Blutvolumens mit entsprechenden Regenerationszeiten liegen²³.

4.3. Nicht-invasive Methoden

Es gibt verschiedene Methoden, nicht-invasiv genomisches Material eines Individuums zu gewinnen. Dabei sollte beachtet werden, dass jedes Manipulieren eines Labornagers für diesen Stress darstellt und daher auch die vorgestellten nicht-invasiven Methoden eine

Belastung für das Tier darstellen können. So können beispielsweise durch Zupfproben Haarfollikel isoliert werden, die sich für eine DNA-Isolierung eignen. In der Literatur sind Probleme mit Kreuzkontaminationen beschrieben^{26,27}, die sich aber bei aufmerksamen Vorgehen verhindern lassen. DNA lässt sich auch über einen Wangenabstrich gewinnen. Bei diesem muss sehr vorsichtig vorgegangen werden, damit die Tiere nicht verletzt werden oder sich selbst verletzen²⁶. Personen, die die Proben nehmen, müssen entsprechend geschult werden, um zum einen eine Verletzung der Tiere zu vermeiden und zum anderen genügend Material für die Bestimmung des Genotyps mittels PCR zu gewinnen. Bei der Nutzung von geeigneten Tupfern kann die Gefahr von Kreuzkontaminationen praktisch ausgeschlossen werden. Abstriche aus dem Rektum verhalten sich ähnlich wie Wangenabstriche^{26,28}. Tatsächlich belastungsfrei kann DNA aus Kotpellets gewonnen werden²⁹⁻³². Diese sollten dabei jedoch nicht älter als 24 Stunden sein und es sollten immer wenigstens zwei Pellets gesammelt werden, um eine ausreichende DNA-Menge gewinnen zu können. Diese Methode lässt sich gut anwenden, wenn nur wenige Tiere genotypisiert werden müssen. Bei größeren Kolonien von Labornagern müssten alle Tiere vereinzelt werden. Damit ist die Methode aus praktischen Gründen ungeeignet.

Alle hier unter der Überschrift nicht-invasive Methoden subsummierte Verfahren haben gemein, dass die Mengen an DNA, die gewonnen werden können, gering sind³³. Mit einer modernen Analytik sollte dies jedoch kein Hindernis darstellen. Aufgrund der geringen DNA-Mengen und dem Kontaminationsrisiko besteht derzeit noch eine gewisse Unsicherheit bezüglich der Robustheit der Genotypisierung großer Tierbestände über nicht-invasive gewonnene Proben. Hier müssen weitere Studien die Eignung für den täglichen Einsatz noch nachweisen. Empfohlen werden können die nicht-invasiven Methoden für die Fälle, in denen eine erneute DNA-Gewinnung notwendig ist – beispielsweise wenn eine Biopsie verloren wurde oder es Zweifel an der korrekten Zuordnung gibt.

5. Tierschutzrechtliche Einordnung

Nach Artikel 1 Absatz 5 der EU-Richtlinie 2010/63/EU werden Eingriffe, die vornehmlich der Kennzeichnung von Tieren dienen, ausdrücklich nicht erfasst und haben damit nicht als Tierversuche zu gelten. Nach einem Rechtsgutachten des Nationaler Ausschusses für den Schutz von für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tieren am Bundesinstitut für Risikobewertung wird „die Ohrlochung nicht zur Beantwortung einer wissenschaftlichen Frage durchgeführt (...), sondern mit dem Ziel, die Tiere auseinanderhalten zu können“. Dadurch „scheidet ein Tierversuch gem. § 7 Abs. 2 S. 1 TierSchG aus.“ Dagegen zählt das Gewinnen von Geweben zu Untersuchungszwecken – also beispielsweise die Schwanzspitzenamputation – nach §7 Absatz 2 Satz 2 Nummer 2 Buchstabe c TiersSchG als Tierversuch. Allerdings sind derartige Tierversuche nicht genehmigungs- sondern nur anzeigepflichtig. Diese Ausnahme regelt §8a Absatz 1 Nummer 3 Buchstabe b, denn es handelt sich offensichtlich um ein erprobtes Verfahren, das rein diagnostischen Zwecken dient³⁴.

Bei der Markierung von Versuchstieren muss in der Schweiz die am wenigsten belastende Methode verwendet werden (TSchV Art. 120 Abs 2). Artikel 5 der schweizerischen Tierschutzverordnung regelt die Markierung von Tieren sowie die Biopsienahme zur Genotypisierung im Einzelnen. So ist in der Zucht die Anwendung von invasiven Methoden der Markierung wie Tätowierungen, Mikrochips, Ohrlochung oder Zehenspitzenamputationen möglich, allerdings ist die Kombination von Markierung und Biopsie vorgeschrieben. Damit handelt es sich bei der Ohrlochmarkierung und der Amputation der ersten Phalanx um die

einzigem im Rahmen der Zucht von transgenen Tieren sinnvoll erlaubten Methoden. Ausnahmen hiervon, müssen versuchsbedingt beantragt werden. Auch die Markierung außerhalb der Zucht, aus Versuchsgründen, bedarf einer Begründung im Einzelfall. Eine Markierung mit Ohrmarken ist generell nicht zulässig. Während laut Artikel 10 Absatz 1 der Tierschutzverordnung Blutentnahmen für die Genotypisierung gestattet sind, sind nach Artikel 10 Absatz 2 Schwanzbiopsien bis maximal 5 mm Länge nur in versuchsbedingt begründeten Einzelfällen erlaubt.

In Österreich findet das Tierschutzgesetz laut §1 Absatz 2 Nr. 4. bei „Praktiken, die hauptsächlich zur Identifizierung von Tieren angewandt werden“ keine Anwendung. Dies gilt für die Ohrlochung und die Amputation der distalen Phalanx, wenn diese gleichzeitig der Markierung dienen. Dies gilt ebenso für die Kombination nicht-invasiver Techniken der Materialgewinnung kombiniert mit Ohrmarken, Tätowierungen und ähnlichem.

6. Empfehlungen

In der Regel müssen genetisch veränderte Nager in der Versuchstierhaltung sowohl gekennzeichnet als auch genotypisiert werden. Um die Belastung der Tiere so gering wie möglich zu halten, empfehlen wir, eine Methode zu wählen, bei der neben der Markierung auch eine Gewebeprobe anfällt. Dies ist sowohl bei der Amputation der distalen Phalanx als auch der Markierung durch Ohrlochung der Fall. Alternativ sehen wir auch die Kombination einer Kennzeichnung durch Tätowierung oder Nylon-Ohrmarken mit einer nicht-invasiven Methode der Genotypisierung als belastungsarm an. Diese ist offensichtlich nur dann möglich, wenn das analysierende Labor in der Lage ist, den Genotyp auch mit geringsten DNA-Mengen sicher nachzuweisen.

Es sollte angestrebt werden, den Genotyp möglichst schon innerhalb der ersten drei Lebenswochen zu bestimmen. Nur so ist es möglich, gleich beim Absetzen stabile Tiergruppen zu bilden. Andernfalls kommt es regelmäßig vor, dass Gruppen nach dem Töten von Tieren mit falschem Genotyp neu zusammengestellt werden müssen, was zusätzlichen Stress für die Tiere bedeutet, der bei früher Bestimmung des Genotyps vermieden werden kann (zur rechtlichen Bewertung des Tötens von Tieren mit falschem Genotyp siehe³⁵). Bei einer Biopsienahme ist ein möglichst früher Zeitpunkt vorzuziehen, da davon auszugehen ist, dass jüngere Tiere alleine durch die Tatsache, dass sie weniger ausgereift sind, weniger Schmerz empfinden. Insofern ist auch die Schwanzbiopsie in Kombination mit der Mikrotätowierung eine empfehlenswerte Methode. Diese Kombination kann sicher in der ersten Lebenswoche durchgeführt werden. In dieser Zeit sind die Tiere neurologisch nicht ausgereift und es ist somit von einer stark verminderten Schmerzwahrnehmung auszugehen.

7. Literatur

1. Donovan J, Brown P. 2006. Animal identification. Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.] Chapter 1, Unit 1 5, doi:10.1002/0471142735.im0105s73.
2. Schaefer DC, Asner IN, Seifert B, Burki K, Cinelli P. 2010. Analysis of physiological and behavioural parameters in mice after toe clipping as newborns. Lab Anim 44:7-13, doi:10.1258/la.2009.009020.
3. Castelhana-Carlos MJ, Sousa N, Ohi F, Baumans V. 2010. Identification methods in newborn C57BL/6 mice: a developmental and behavioural evaluation. Lab Anim 44:88-103, doi:10.1258/la.2009.009044.
4. Vachon P. 1998. Anatomical and histological observations of fore- and hind limb toes in adult mice after amputations performed at the age of two weeks. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire 62:311-313.
5. Kasanen IH, Voipio HM, Leskinen H, Luodonpaa M; Nevalainen TO. 2011. Comparison of ear tattoo, ear notching and microtattoo in rats undergoing cardiovascular telemetry. Lab Anim 45:154-159, doi:10.1258/la.2011.010113.
6. Gruda MC, Pinto A, Craelius A, Davidowitz H, Kopacka Wm, Li J, Qian J, Rodriguez E, Kuspiel E, Mandecki W. 2010. A system for implanting laboratory mice with light-activated microtransponders. J Am Assoc Lab Anim Sci 49:826-831.
7. Le Calvez S, Perron-Lepage MF, Burnett R. 2006. Subcutaneous microchip-associated tumours in B6C3F1 mice: a retrospective study to attempt to determine their histogenesis. Exp Toxicol Pathol 57:255-265, doi:10.1016/j.etp.2005.10.007.
8. Elcock, LE, Stuart BP, Wahle BS, Hoss HE, Crabb K, Millard DM, Mueller RE, Hastings TF, Lake SG. 2001. Tumors in long-term rat studies associated with microchip animal identification devices. Exp Toxicol Pathol 52:483-491, doi:10.1016/S0940-2993(01)80002-6.
9. Tillmann T, Kamino K, Dasenbrock C, Ernst H, Kohler M, Morawietz G, Campo E, Cardesa A, Tomatis L, Mohr U. 1997. Subcutaneous soft tissue tumours at the site of implanted microchips in mice. Exp Toxicol Pathol 49:197-200, doi:10.1016/S0940-2993(97)80007-3.
10. Baron BW, Langan G, Huo D, Baron JM, Montag A. 2005. Squamous cell carcinomas of the skin at ear tag sites in aged FVB/N mice. Comp Med 55:231-235.
11. Cover CE, Keenan CM, Bettinger GE. 1989. Ear tag induced *Staphylococcus* infection in mice. Lab Anim 23:229-233.
12. Waalkes MP, Rehm S, Kasprzak KS, Issaq HJ. 1987. Inflammatory, proliferative, and neoplastic lesions at the site of metallic identification ear tags in Wistar [CrI:(WI)BR] rats. Cancer Res 47:2445-2450.
13. Kitagaki M, Hirota M. 2007. Auricular chondritis caused by metal ear tagging in C57BL/6 mice. Vet Pathol 44:458-466, doi:10.1354/vp.44-4-458.
14. Hankenson FC, Garzel LM, Fischer DD, Nolan B, Hankenson KD. 2008. Evaluation of tail biopsy collection in laboratory mice (*Mus musculus*): vertebral ossification, DNA quantity, and acute behavioral responses. J Am Assoc Lab Anim Sci 47:10-18.
15. Hankenson FC, Braden-Weiss GC, Blendy JA. 2011. Behavioral and activity assessment of laboratory mice (*Mus musculus*) after tail biopsy under isoflurane anesthesia. J Am Assoc Lab Anim Sci 50:686-694.
16. Dudley ES, Johnson RA, French DC, Boivin GP. 2016. Effects of topical anesthetics on behavior, plasma corticosterone, and blood glucose levels after tail biopsy of C57BL/6NHSD mice (*Mus musculus*). J Am Assoc Lab Anim Sci 55:443-450.

17. Morales ME, Gereau RW. 2009. The effects of tail biopsy for genotyping on behavioral responses to nociceptive stimuli. *PLoS One* 4, e6457, doi:10.1371/journal.pone.0006457.
18. Sørensen DB, Stub C, Jensen HE, Ritskes-Hoitinga M, Hjorth P, Ottesen JL, Hansen AK. 2007. The impact of tail tip amputation and ink tattoo on C57BL/6JBomTac mice. *Lab Anim* 41:19-29, doi:10.1258/002367707779399383.
19. Baccei ML, Bardoni R, Fitzgerald M. 2003. Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: glutamate release by capsaicin and menthol. *J Physiol* 549:231-242, doi:10.1113/jphysiol.2003.040451.
20. Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A. 2002. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3:342-355, doi:10.1038/nrg799.
21. Ayala R, Shu T, Tsai LH. 2007. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128, 29-43, doi:10.1016/j.cell.2006.12.021.
22. Campbell ML, Mellor DJ, Sandoe P. 2014. How should the welfare of fetal and neurologically immature postnatal animals be protected? *Anim Welf* 23:369-379, doi:10.7120/09627286.23.4.369.
23. GV-SOLAS. 2009. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT. http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/tie_blutentnahme09.pdf
24. Horváth A, Sántha P, Horváth V, Török N, Nagy I, Jancsó G, Vágvölgyi C, Somogyvári F. 2013. Rapid genotyping of genetically modified laboratory animals from whole blood samples without DNA preparation. *Acta Biol Hung* 64:262-265, doi:10.1556/ABiol.64.2013.2.11.
25. Hellrung DJ, Rossi G, Link CJ. 2006. High-throughput fluorescent screening of transgenic animals: phenotyping and haplotyping. *Cytometry A* 69:1092-1095, doi:10.1002/cyto.a.20328.
26. Cinelli P, Rettich A, Seifert B, Burki K, Arras M. 2007. Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Lab Anim* 41:174-184, doi:10.1258/002367707780378113.
27. Schmitteckert EM, Prokop CM, Hedrich HJ. 1999. DNA detection in hair of transgenic mice--a simple technique minimizing the distress on the animals. *Lab Anim* 33:385-389.
28. Lahm H, Hoeflich A, Rieger N, Wanke R, Wolf E. 1998. Identification of transgenic mice by direct PCR analysis of lysates of epithelial cells obtained from the inner surface of the rectum. *Transgenic Res* 7:131-134.
29. Hamann M, Lange N, Kuschka J, Richter A. 2010. Non-invasive genotyping of transgenic mice: comparison of different commercial kits and required amounts. *Altex* 27:185-190.
30. Broome RL, Feng L, Zhou Q, Smith A, Hahn N, Matsui SM, Omary MB. 1999. Non-invasive transgenic mouse genotyping using stool analysis. *FEBS Lett* 462:159-160.
31. Kalippke K, Werwitzke S, von Hornung M, Mischke R, Ganser A, Tiede A. 2009. DNA analysis from stool samples: a fast and reliable method avoiding invasive sampling methods in mouse models of bleeding disorders. *Lab Anim* 43:390-393, doi:10.1258/la.2008.008057.
32. Murgatroyd C, Bilko D, Spengler D. 2006. Isolation of high-quality DNA for genotyping from feces of rodents. *Anal Biochem* 348:160-162, doi:10.1016/j.ab.2005.10.004.
33. Garzel LM, Hankenson FC, Combs J, Hankenson KD. 2010. Use of quantitative polymerase chain reaction analysis to compare quantity and stability of isolated murine DNA. *Lab Anim* 39:283-289, doi:10.1038/labani0910-283.
34. Chmielewska J, Bert B, Grune B, Hensel A, Schönfelder G. 2017. Probleme aus der tierversuchsrechtlichen Praxis: Rechtliche Einordnung der Genotypisierungsmethoden sowie der Zucht immunmodifizierter Tiere. *Natur und Recht* 39:385-392, doi:10.1007/s10357-017-3190-4.

35. Chmielewska J, Bert B, Grune B, Hensel A, Schönfelder G. 2015. Der "vernünftige Grund" zur Tötung von überzähligen Tieren. Eine klassische Frage des Tierschutzrechts im Kontext der biomedizinischen Forschung. *Natur und Recht* 37:677-682, doi:10.1007/s10357-015-2903-9.

Haftungsausschluss

Die Benutzung der Veröffentlichungen (Fachinformationen, Stellungnahmen, Hefte, Empfehlungen, u. ä.) der GV-SOLAS und die Umsetzung der darin enthaltenen Informationen erfolgt ausdrücklich auf eigenes Risiko. Die GV-SOLAS und auch die Autoren können für etwaige Unfälle und Schäden jeder Art, die sich durch die Nutzung der Veröffentlichung ergeben (z.B. aufgrund fehlender Sicherheitshinweise), aus keinem Rechtsgrund eine Haftung übernehmen. Haftungsansprüche gegen die GV-SOLAS und die Autoren für Schäden materieller oder ideeller Art, die durch die Nutzung oder Nichtnutzung der Informationen bzw. durch die Nutzung fehlerhafter und/oder unvollständiger Informationen verursacht wurden, sind grundsätzlich ausgeschlossen. Rechts- und Schadenersatzansprüche sind daher ausgeschlossen. Das Werk inklusive aller Inhalte wurde unter größter Sorgfalt erarbeitet. Die GV-SOLAS und die Autoren übernehmen jedoch keine Gewähr und keine Haftung für die Aktualität, Korrektheit, Vollständigkeit und Qualität der bereitgestellten Informationen, ebenso nicht für Druckfehler. Es kann keine juristische Verantwortung sowie Haftung in irgendeiner Form für fehlerhafte Angaben und daraus entstandene Folgen von der GV-SOLAS und den Autoren übernommen werden. Für die Inhalte von den in diesen Veröffentlichungen abgedruckten Internetseiten sind ausschließlich die Betreiber der jeweiligen Internetseiten verantwortlich. Die GV-SOLAS und die Autoren haben keinen Einfluss auf Gestaltung und Inhalte fremder Internetseiten und distanzieren sich daher von allen fremden Inhalten. V.i.S.d.P. der Vorstand der GV-SOLAS.