

Laboratorijas dzīvnieku (peles, žurkas) veselības veterinārā stratēģija, saskaņā ar 3Rs vadlīnijām

Nacionālās Komitejas un Latvijas Organiskā sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas vadlīnijas/rekomendācijas

Saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes 2010.gada 22.septembra Direktīvas Nr.2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību, Latvijas Republikas Ministru kabineta noteikumiem Nr.52 "Noteikumi par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību" un Latvijas Republikas "Dzīvnieku aizsardzības likumu".

Izmēģinājumu dzīvnieku izmitināšanas, audzēšanas un kopšanas apstākļi

Izmēģinājuma dzīvnieki tiek turēti individuāli ventilējamās kastēs (Allentown, ASV), kurās ir iebērtas izmēģinājumu dzīvnieku turēšanai paredzētas koksnes skaidas EcoPure™ Shavings (Datesand, Lielbritānija). Kastēs, kurās dzīvo dzīvnieki ir pieejami koka klucīši graušanai un vides bagātināšanas priekšmeti (speciāli polimēra būrīši). Peles tiek turētas līdz 5 pelēm vienā standarta izmēra (~38 × 19 × 13 cm) sprostā, savukārt žurkas tiek turētas līdz 3 žurkām vienā standarta izmēra (~39 × 29 × 20 cm) sprostā. Dzīvnieku sprosti tiek tīrīti un mainīti divas reizes nedēļā. Dzīvnieku turēšanas telpās tiek nodrošināti, kontrolēti un reģistrēti dzīvnieku uzturēšanas standarta apstākļi (gaisa temperatūra 21-23°C, relatīvais gaisa mitrums 65±10%, 12 stundu gaismas/tumsas cikls). Dzīvnieku telpu mitrā uzkopšana notiek 2 reizes nedēļā, savukārt sausā telpu uzkopšana (darba galdu, svaru un grīdas uzkopšana) notiek katru darba dienu. Dzīvniekiem bez ierobežojuma ir pieejama grauzēju standartizētā diēta, R70 (Lantmännen, Zviedrija), un dzeramais ūdens.

Personāls, kas strādā ar izmēģinājuma dzīvniekiem

Darbības ar izmēģinājuma dzīvniekiem veic personāls, kas ir apmācīts veikt šādas darbības: procedūras ar izmēģinājuma dzīvniekiem, izmēģinājuma dzīvnieku kopšanu, izmēģinājuma dzīvnieku nogalināšanu. Darbinieki ir atbilstoši izglītoti, kompetenti un nepārtraukti apmācīti, kā arī ir apguvuši izmēģinājuma dzīvnieku labturības minimālās prasības un bioloģijas pamatelementus konkrētām dzīvnieku sugām, šajā gadījumā pelēm un žurkām.

Karantīna jauniegūtiem izmēģinājuma dzīvniekiem

Jauniegūtos dzīvniekus izolē 2 nedēļas karantīnas telpās pirms pārvietošanas uz laboratorijas dzīvnieku telpām. Dzīvnieku izolēšana karantīnā nepieciešama, lai dzīvnieki aklimatizētos pēc transportēšanas, pielāgotos jaunajiem vides apstākļiem un novērtētu veselības stāvokli, lai līdz minimumam samazinātu iespējamo veselības apdraudējumu pārējiem dzīvniekiem. Dažādām dzīvnieku sugām, šajā gadījumā, žurkām un pelēm, tiek nodrošinātas atsevišķas karantīnas telpas. Laboratorijas veterinārārsts (turpmāk-veterinārārsts) pirms ievietošanas karantīnā un pārvietošanas uz laboratorijas dzīvnieku telpām veic dzīvnieku vispārējo veselības stāvokļa

novērtējumu. Dzīvnieki, kuriem tiek konstatēts traucēts veselības stāvoklis (skat.Dzīvnieku veselības pārbaude) pēc karantīnā pavadītā laika, netiek pārvietoti uz laboratorijas dzīvnieku telpām.

Izmēģinājuma dzīvnieku veselības pārbaudes

Reizi dienā dzīvniekus pārbauda kompetenta persona, šajā gadījumā, veterinārārsts. Dzīvnieku pārbaudi drīkst veikt arī apmācīts personāls, šajā gadījumā, dzīvnieku kopēji un eksperimentu veicēji, kas, identificējot slimus vai ievainotus dzīvniekus, ziņo veterinārārstam.

Veselības stāvokli novērtē, vadoties pēc šādiem parametriem:

- Ķermeņa stāvoklis telpā (brīvs/nepiespiests, mundrs, reaģē uz apkārtējiem stimuliem);
- Ķermeņa kondīcija (1-5 ballu sistēmā)
 - 1 – ķermeņa svara zudums >20%. Parasti novērojams kopā ar apātiju, letarģiju, kifozi, nekoptu apmatojumu un dehidratāciju – eitanāzija
 - 2 - ķermeņa svara zudums <20%. Parast novērojams kopā ar muskuļu zudumu un viegli pamanāmām kaula struktūrām, kā arī apātiju un nekoptu apmatojumu – atbalsta terapija
 - 3 – ķermeņa svars normā. Kauli ir viegli izpalpējami, bet tikko redzami.
 - 4 – neliela aptaukošanās, kaulu struktūras nav redzamas
 - 5 - aptaukošanās
- Ķermeņa temperatūra (vispārīgi var vadīties pēc dzīvnieka astes temperatūras)
 - Peles 37,0°C
 - Žurkas 37,5°C
- Apmatojums (vienmērīgs, gluds, spīdīgs, tīrs)
- Glotādas (gludas, valgas, spīdīgas, bāli sārtas)
- Oftalmoloģiskā izmeklēšana (konjunktīva, plakstiņi, radzene)
- Gremošanas sistēma
 - Zobi (sugai raksturīgi)
 - Izkārnīšanās (sugai raksturīgs daudzums, krāsa, smaka, konsistence)
- Uroģenitālās sistēmas izmeklēšana
 - Perianālais apvidus (tīrs, dzimumorgāni neizslīdējuši)

Literatūra

1. The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NCR. ILAR. Eighth Ed. 2011. P.31.
2. Rodent Clinical Conditions Library (Charles River).

Pirms/pēc-operācijas rīcības plāns, pārbaude un aprūpe:

Pirms procedūras novērtē kopējo dzīvnieka veselības stāvokli, izvairoties no slimu dzīvnieku izmantošanas procedūrai. Operāciju telpā nodrošina vismaz +25°C. Pirms ilgstošas procedūras (ilgak par 30 min), ja paredzēta dzīvnieka intubācija, lai pasargātu no pastiprinātas siekalošanās, ievada atropīnu (*atropine sulfate*), deva 0,05 mg/kg, s.c. Dzīvniekiem anestēzijai izmanto 10 % ketamīna (*ketamine hydrochloride*) un 2% ksilazīna (*xylazine hydrochloride*) maisījumu (deva attiecīgi 100 mg/kg un 10 mg/kg,

i.p.) vai inhalāciju ar izoflurānu (5%). Uzturošai anestēzijai izmanto izoflurāna inhalāciju (2-3%). Pirms procedūras uzsākšanas veic anestēzijas dziļuma pārbaudi, pārbaudot astes un acs refleksu. Lai pasargātu dzīvnieku no atdzišanas, procedūras laikā nodrošina sildīšanu, izmantojot sildošos paklājus. Fizioloģiskie rādītāji, kā skābekļa piesātinājums un pulss tiek novēroti visas procedūras laiku, izmantojot pulsa oksimetru, kas pievienots pie pakaļējās kājas plantārās virsmas. Ķermeņa temperatūru novēro, izmantojot rektālo zondi.

Lai panāktu analgēziju, 10 minūtes pirms procedūras ievada nesteroīdo pretiekaisuma līdzekli – meloksikamu 15ml/1,5mg (*meloxicamum*, deva 2 mg/kg/24h, s.c.) vai opioīdu - buprenorfinu (*buprenorphinum*, deva 50-100 mg/kg/12h, s.c.) vai to kombināciju un tramadolu 100mg/2ml (*tramadoli hydrochloridum*, deva 10-20 mg/kg, s.c.), saskaņā ar izmēģinājuma mērķi. Analgēziju nodrošina 3 dienas pēc procedūras vai atkarībā no dzīvnieka vispārējā veselības stāvokļa. Ja operācijas laikā dzīvniekam uz ilgu laiku tiek traumēta tikai āda, tad atsāpināšanai izmanto vienreizēju tramadola (5 mg/kg), meloksikama (2 mg/kg) vai buprenorfina (50 mg/kg) devu .

Ja operācija paredzēta ilgāka par 30 minūtēm, tad 30 minūtes pirms operācijas ievada antibakteriālus līdzekļus, šajā gadījumā benzilpenicilīnu (*benzylpenicillinum*, deva 150 mg/kg, s.c.).

Novērtē kopējo dzīvnieka veselības stāvokli, apzinoties procedūras smagumu, dzīvnieka vecumu, sugu un līniju. Pārbaudi veic 1h, 2h, 6h pēc operācijas un 1 reizi dienā 3 dienas pēc kārtas vai atkarībā no dzīvnieka vispārējā veselības stāvokļa.

- Sāpju monitorings
 - Acis (0-plaši atvērtas, 1-vidēji aizvērtas, 2-cieši aizvērtas)
 - Ausu novietojums telpā (0 – parasts, 1- nedaudz vērstas uz aizmuguri, 2- paralēli vērstas ķermenim)
 - Ūsu novietojums telpā (0 – parasts, 1 – nedaudz vērstas uz aizmuguri, 2 – paralēli vērstas ķermenim)
- Temperatūra
 - Peles - 37,0°C
 - Žurkas - 37,5°C
- Ķermeņa stāvoklis telpā
 - brīvs/nepiespiests, mundrs, reaģē uz apkārtējiem stimuliem
 - saspūris, nekopts apmatojums, mazkustīgs, nereaģē uz apkārtejiem stimuliem, kifoze
- Ķermeņa kondīcija
 - 1 – ķermeņa svara zudums >20%. Parasti novērojams kopā ar apātiju, letarģiju, kifozi, nekoptu apmatojumu un dehidratāciju – eitanāzija
 - 2 - ķermeņa svara zudums <20%. Parast novērojams kopā ar muskuļu zudumu un viegli pamanāmām kaula struktūrām, kā arī apātiju un nekoptu apmatojumu – atbalsta terapija
 - 3 – ķermeņa svars normā. Kauli ir viegli izpalpējami, bet tikko redzami.
 - 4 – neliela aptaukošanās, kaulu struktūras nav redzamas
 - 5 - aptaukošanās

Literatūra

1. American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006) Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits.
2. American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006) Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits.
3. EC Working document on a severity assesment framework (Directive 2010/63/EU).
4. Recommended Methods of Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia for Laboratory Animal Species, Albert Einstein College of Medicine Institute for Animal Studies Van Etten 460 (718) 839-7100, 2009.
5. The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NCR. ILAR. Eighth Ed. 2011. P.31.

Mikrobiolģiskā uzraudzības programma

Izmģģinģjuma dzģvnieki tiek iepirkti no reģistrģtam audzģtavģm, kas nodroģina, ka dzģvnieki ir veseli un brģvi no infekcijas un invģzijas slimģbģm (saskaņģ ar derģģu un apstiprinģtu Dzģvnieku veselģbas sertifikģtu).

Slimie un ievainotģ izmģģinģjuma dzģvnieki

Slimos un ievainotos izmģģinģjuma dzģvniekus identificģ kompetenta persona, šajģ gadģģjumģ veterģnģrģrsts un apmģcģts personģls. Personģls par slimģm un ievainotģm dzģvniekiem ziņģ veterģnģrģrstam vai reģistrģ darba lapģ, kas atrodas dzģvnieku telpģs. Visģ slimģ un ievainotģ dzģvnieki tiek reģistrģti elektronģskģ slimģ dzģvnieku uzskaites žurnģlģ, kur tiek norģdģts saslimģšanas datums, dzģvnieka identģfikģcija (numurs, vecums, dzimums), eksperimenta nosaukums, eksperimenta atbildģģģ persona, veselģbas stģvoklis, diagnoze un ārstģšanas plģns.

Rģcģba veselģbas traucģģjumu gadģģjumģ

Slimos un ievainotos izmģģinģjuma dzģvniekus noģķģr no pģrģģģm dzģvniekiem un tur atseviģģģ lģdz uzlabojas veselģbas stģvoklis. Papildus ārstģšanai nepiecieģamģbas gadģģjumģ tiek nodroģģnģta mģksta barģba, kas novģtota uz grģdas bģrģ. Dzģvniekus cenģsas turģt izolģtus pģc iespģģas ģsģku laika posmu, lai izvairģtos no stereotģpiskas dzģvnieku uzvedģbas, ko novģro, ja bara dzģvniekus izolģ. Atkģrtotu iekģlauģšanu pģc izolģģšanas rģpģģģ novģro, lai izvairģtos no nesaderģbas problģmģm un sociģlo attiecģbu traucģģģģm.

Zģles tiek lietotas saskaņģ ar kaskģdes principu zģģģ lietoģnģ dzģvniekiem, kur visģpirms:

- 1) Tiek izmantotas zģles, kas paredzģtas konkrģtai dzģvnieku sugģģ;
- 2) Citģm dzģvnieku sugģm paredzģtģs zģles vai tai paģai dzģvnieku sugģģ citas slimģbas ārstģģģģģ;
- 3) Cilvģģģm paredzģtģs zģles;
- 4) Citģs ES dalģbvalģģģ reģistrģtģs veterģnģrģs zģles;
- 5) Aptģkģģ pagatavojamģs veterģnģrģs zģles;

Zģles lieto tģ, lai nebģtu pretrunģ ar izmģģinģjuma mģrģģģ.

Antibiotiskie zāļu līdzekļi tiek izmantoti tikai gadījumos, kad citas ārstēšanas metodes nav efektīvas un tiek konstatēti infekciozas dabas veselības traucējumi.

Rekomendējošie adatu izmēri un devas tilpumi ml kg⁻¹ pelēm*

Zemāda, s.c.		Vēdera dobums, i.p.		Muskulis, i.m.		Orāli, p.o.	Vēna, i.v.		
Adata G	Tilpums, ml	Adata G	Tilpums, ml	Adata G	Tilpums, ml	Tilpums, ml	Adata G	Tilpums, ml	
								Bolus	Infūzija
25	10	25	20	27	0,05-0,1 ^a	10	26	5	12-25

^aTilpums ml vienā vietā

* Karl-Heinz Diehl¹, Robin Hull, David Morton³, Rudolf Pfister, Yvon Rabemampianina, David Smith, Jean-Marc Vidal and Cor van de Vorstenbosch. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *J. Appl. Toxicol.* **21**, 15–23 (2001).

Rekomendējošie adatu izmēri un devas tilpumi ml kg⁻¹ žurkām*

Zemāda, s.c.		Vēdera dobums, i.p.		Muskulis, i.m.		Orāli, p.o.	Vēna, i.v.		
Adata G	Tilpums, ml	Adata G	Tilpums, ml	Adata G	Tilpums, ml	Tilpums, ml	Adata G	Tilpums, ml	
								Bolus	Infūzija
25	5	25	10	25	0,1-0,2 ^a	10	25	5	20

^aTilpums ml vienā vietā

* Karl-Heinz Diehl¹, Robin Hull, David Morton³, Rudolf Pfister, Yvon Rabemampianina, David Smith, Jean-Marc Vidal and Cor van de Vorstenbosch. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *J. Appl. Toxicol.* **21**, 15–23 (2001).

* Waynforth HB&Flecknell PA. Experimental and Surgical Technique in the Rat, 2nd ed. London: Academic Press; 1992

Rīcības plāns biežāk sastopamāko veselības traucējumu gadījumā:

Ulceratīvais dermatīts (UD) – idiopātiska slimība, kas sastopama C57BL6/J līnijas pelēm. Vienīgā efektīvā ārstēšanas metode – nagu apgriešana. Atbalsta terapija sekundāras infekcijas gadījumā ar antiseptiskām, pretiekaisuma, dziedinošām ziedēm, joda šķīdumu vai nepieciešamības gadījumā arī antibiotiskas ziedes. Slimos dzīvniekus novērtē pēc smaguma pakāpes punktu sistēmas. Dzīvniekus, kuriem UD smaguma pakāpe ir >75 – eitanizē.

Smaguma pakāpes punktu sistēma (0-3 punkti):

1. Kasīšanās biežums 2 minūtēs: 0 (0); <5 (1); 5-10 (2); >10 (3)
2. Bojājuma raksturojums: Nav bojājums (0); ādas zvīņošanās vienā laukumā <2mm (1); ādas zvīņošanās vairākos laukumos >2mm (2); erozijas, čūlas (3)
3. Bojājuma garums: 0 cm (0); <1cm (1); 1-2cm (2); >2cm (3)
4. Skartie reģioni: nav (0); R2 vai R3 (1); R2 un R3 (2); R1 un citi reģioni (3)
 - a. R1 – galvas dorsālā virsma virzienā no ausīm, apakšžoklis līdz krūšu kaulam
 - b. R2 – iekšējā un ārējā auss, dorsālais kakla rajons kaudāli no ausīm, dorsālais un ventrālais krūškurvja rajons, priekškājas
 - c. R3 – kaudāli no ribu loka

Formula: [(1+2+3+4)/12]*100

Konjunktivīts, blefarīts – novērtēt acu apvidu/stāvokli. Nagu apgriešana, acs skalošana ar 0,5% joda šķīdumu vai sterilu 0,9% NaCl, nepieciešamības gadījumā pretiekaisuma vai antibakteriāli preparāti. *Nude* pelēm jāpārlicinās, vai nav svešķermeņa klātbūtne aiz plakstiņiem.

Traumatiskie ādas bojājumi – visbiežāk kaušanās rezultātā ar citiem grupas biedriem. Biežāk skartās vietas – astes saknes apvidus, muguras daļa krustu rajonā, uroģenitālais apvidus. Rīcības plāns – nošķirt agresoru, kas parasti ir dzīvnieks, kas nav skarts, bet jāatcerās, ka hierarhiju var pārņemt nākamais dzīvnieks. Ja skartajam dzīvniekam konstatē smagas kaušanās brūces, nošķir no pārējiem grupas biedriem, kamēr brūces sadzīst. Vieglas brūces sadzīst pašas. Smagākām brūcēm ar nekrotiskiem audiem nepieciešamas antibakteriālas ziedes un/vai antibiotiku lokāla terapija. Parasti ārstēšana veiksmīga. Lai samazinātu hierarhiju, ieteicams nelielu daudzumu veco pakaišu materiālu ievietot tīrajos būros.

Urinēšanas traucējumi vīriešu kārtas dzīvniekiem – parasti dzeltens perianālais apvidus kopā ar peņa izslīdēšanu. Visbiežākais cēlonis traumu rezultātā vai peņu idiopātiskais uroģiskais sindroms. Jāpārlicinās, vai iespējama urinēšana. Parasti šādos gadījumos dzīvnieku eitanizē dēļ nespējas urinēt.

Literatūra

1. Alvarado et al. 2016. Retrospective Evaluation of Nail Trimming as a Conservative Treatment for Ulcerative Dermatitis in Laboratory Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55(4):462-6.
2. Alvarado et al. 2016. Retrospective Evaluation of Nail Trimming as a Conservative Treatment for Ulcerative Dermatitis in Laboratory Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55(4):462-6.
3. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Academies Press.
4. Hampton et al. 2012. Progression of Ulcerative Dermatitis Lesions in C57BL/6Cr1 Mice and the Development of a Scoring System for Dermatitis Lesions. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 51(5): 586–593.
5. Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009) Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Washington, DC: National Academies Press.
6. Laboratory Animal Medicine, Third Edition (American College of Laboratory Animal Medicine).
7. Michaud et al. 2016. Comparison of 3 Topical Treatments against Ulcerative Dermatitis in Mice with a C57BL/6 Background. *Comp Med* 66(2): 100–104’.
8. Rodent Clinical Conditions Library (Charles River).

Agrīnie un humānie mērķa parametri:

Lai samazinātu dzīvnieku ciešanas ilgumu, intensitāti un nodrošinātu pēc iespējas nesāpīgāku nāvi, izmanto agrīnos un humānos mērķa parametrus, kuru konstatēšanas gadījumā, dzīvnieki tiek priekšlaicīgi izslēgti no eksperimenta un eitanizēti:

- Ciešanas, sāpes, kas vairs nav kontrolējamas
- Ķermeņa svara zudums $\geq 20\%$
- Ilgstošs ķermeņa svara zudums/ vājums 20% no ķermeņa masas (neatbild atbalsta terapijai)
- Hipotermija
- Pirmsnāves stāvoklis - mazkustīgums/imobilitāte, bezsamaņa, depresija, nereaģē uz apkārtējiem stimuliem, anoreksija

- Smagas kaušanās brūces, čūlas, dermatīts, kas nedzīst un neatbild uz terapiju (tai skaitā, ulceratīvais dermatīts C57BL/J līnijas pelēm, ja bojājums >10% no ķermeņa virsmas)
- Jaunveidojumi, kas >5-10% no ķermeņa masas (>2-4cm)
- Jaunveidojumi, kas traucē normālai fizioloģisko funkciju darbībai. Jaunveidojumi ar čūlām, nekrozi
- Neiroloģiski traucējumi - Ilgstoši, nekontrolējami krampji, parēze/paralīze

Literatūra

1. Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009) Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Washington, DC: National Academies Press.
2. Rodent Clinical Conditions Library (Charles River).

Izmēģinājuma dzīvnieku nogalināšanas metodes

Tiek veiktas saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes 2010.gada 22.septembra Direktīvas Nr.2010/63/ES VI pielikumu un, Latvijas Republikas Ministru kabineta noteikumiem Nr.52 6.pielikumu. Dzīvnieku nogalināšanu veic konstatējot nevajadzīgas sāpes, ciešanas, diskomfortu vai ilgstošu kaitējumu, no kura nav iespējams izvairīties, kā arī humāno mērķa parametru pārkāpšanas gadījumā:

Kakla skriemeļa dislokācija grauzējiem, kuru ķermeņa masa nav lielāka par 150 g;

Nātrija pentobarbitāla (*sodium pentobarbital*) pārdozēšana grauzējiem, kas ir smagāki par 150 g, deva 120 mg/kg, i.v.

Literatūra

1. Recommended Methods of Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia for Laboratory Animal Species, Albert Einstein College of Medicine Institute for Animal Studies Van Etten 460 (718) 839-7100, 2009.