



CO₂ euthanasie bij knaagdieren

Optimalisatie van de toepassing van de UNO euthanasiebox

**Corina van Kammen^{1,2}, Miriam van der Meulen-Frank³,
Hilda Jager², C.K. Mulder⁴**

¹Diermanagement, major Proefdierbeheer, Van Hall Larenstein; ²Centrale Dienst Proefdieren, UMCG, Groningen, h.g.jager@umcg.nl; ³Instantie voor Dierenwelzijn, Rijksuniversiteit Groningen; ⁴Faculteit Science and Engineering GELIFES, Rijksuniversiteit Groningen

In proefdiercentra worden muizen- en rattenkolonies in stand gehouden voor wetenschappelijk onderzoek. Ondanks het feit dat het genereren van fokoverschotten zoveel mogelijk wordt beperkt is het onvermijdelijk dat er dieren moeten worden geëuthanaseerd. Euthanasie van proefdieren moet plaatsvinden met een minimum aan pijn en stress. Muizen wordt in de praktijk vaak geëuthanaseerd door middel van CO₂. Qua gasmengsel en praktijkuitvoering zijn er verschillende methoden in omloop. Bovendien zou de optimale methode kunnen verschillen per geslacht of genetische achtergrond. In deze studie onderzoeken we welke instelling van de doorgaans gebruikte UNO euthanasiebox optimaal is voor muizen, met als uitgangspunt dat de dieren zo min mogelijk ongerief ervaren. Ook wordt onderzocht of geslacht of genetische achtergrond van invloed is op de keuze van de methode en de samenstelling van het gasmengsel.

De concentratie CO₂ in normale lucht is ongeveer 0,04%. Gelukkig is dit niet hoger, aangezien bij concentraties vanaf 3% gevoelens van verstikking kunnen optreden. Bij een hogere CO₂-concentratie, zoals in de euthanasiebox, treedt er bewustzijnsverlies op. Voordat de concentratie tot deze hoogte is gestegen kunnen er uitingen van verstikking en pijn optreden. Deze pijn is het gevolg van prikkeling van CO₂ op het slijmvlies in de neus. Dit is ongewenst, zolang het dier nog bij bewustzijn is. Bij een optimale euthanasieprocedure zou het dier zo snel mogelijk het bewustzijn moeten verliezen, met minimaal ongerief.

»

Wet en praktijk

In de richtlijn 2010/63/EU, bijlage IV staat dat CO₂ bij knaagdieren alleen mag worden gebruikt bij geleidelijke blootstelling aan het gas. Hoewel het bij geleidelijke blootstelling langer duurt voor de dieren bewusteloos zijn, wordt dit toch verkozen. Dit omdat de dieren niet meer bij bewustzijn zijn als zij worden blootgesteld aan pijnlijke concentraties CO₂, zoals het geval is bij boxen die vooraf gevuld zijn met CO₂ (1).

Bij CO₂-euthanasie-apparatuur stroomt er CO₂ de box in, waarin de dieren in de thuiskooi zijn geplaatst. Volgens de gebruiksaanwijzing van de UNO euthanasiebox wordt gestart met carboogeen (95% O₂ + 5% CO₂). Hierna wordt vervolgd met 100% CO₂. Hierdoor stijgt de CO₂-concentratie geleidelijk. De geleidelijke vervanging van O₂ door CO₂ zorgt er in theorie voor dat er zo min mogelijk stress optreedt. Echter, niet in alle gevallen zullen de dieren volledig het bewustzijn verliezen en kunnen er uitingen van pijn en verstikking optreden door de hoge CO₂-concentratie. Er wordt aangeraden om per minuut 20-30% van de lucht in de box te vervangen door CO₂ (2). Vanuit de literatuur wordt niet duidelijk welke CO₂:O₂ verhouding het beste is en of vooraf vullen dan wel geleidelijk vullen van de box betere resultaten geeft (3-5). Verschillende opvattingen hebben geleid tot verschillende ontwerpen van euthanasie-boxen met verschillende instroomsnelheden en gasmengsels. Ook de mate waarin het programma geautomatiseerd is kan verschillen.

In onze studie hebben we, met gebruik van de UNO euthanasiebox, onderzocht, wat de mate van ongerief is bij CO₂-euthanasie. Dit hebben we onderzocht gebaseerd op gedrag, bij twee verschillende muizenlijnen, bij zowel mannetjes als vrouwtjes. Hierbij hebben we het effect van twee gasmengsels onderzocht, het effect van vooraf vullen of geleidelijk vullen van de euthanasiebox, en het effect van hoog of laag instromen in de thuiskooi.

Materiaal en methoden

Dieren

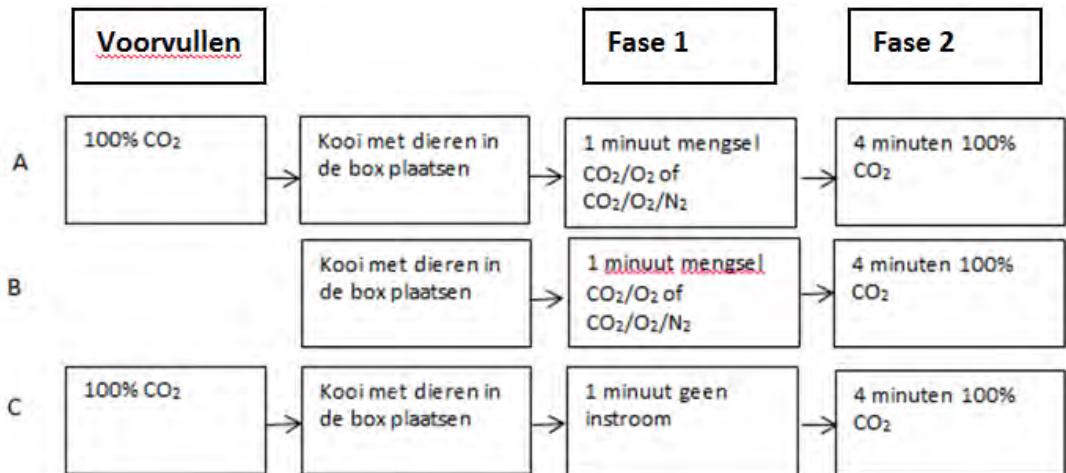
Voor ons onderzoek hebben we gebruik gemaakt van overschot van foklijnen met een C57BL/6 en BALB/c achtergrond van de IVC-fok afdeling van de Centrale Dienst Proefdieren (CDP). In totaal zijn er 241 dieren, 176 met een C57BL/6 achtergrond en 65 met een BALB/c achtergrond, gebruikt.

Methoden

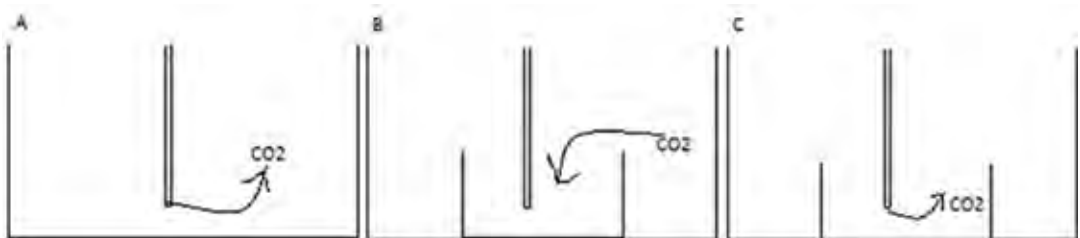
De CDP standaard euthanasieprocedure is weergegeven in afb. 1c. Deze wordt al enige tijd in de CDP gebruikt, omdat de diervverzorgers aangeven dat, gebaseerd op gedrag, de dieren hiermee minder ongerief lijken te ervaren dan met de standaardinstellingen van de euthanasiebox (afb. 1B) of bij gebruik van 100% CO₂ tijdens de eerste fase (afb. 1A). Na het al dan niet aanvullen van de euthanasiebox (afb. 2a) worden de dieren in de thuiskooi in de box geplaatst (afb. 2b). Hierbij stroomt de CO₂ geleidelijk de kooi in. Daarna wordt in twee fases nog gas toegevoerd. Eerst wordt de kooi gevuld met een mengsel van CO₂/O₂/N₂, vervolgens met 100% CO₂ (afb. 2c).

Geteste gasmengsels en instroomhoogtes

Bij onze testen is O₂ vervangen door een mengsel van verschillende concentraties CO₂ en O₂ (zie Tabel 1 voor een deel van de testsituaties). De gebruikte flow rate was 0,5 L/s voor de 100% CO₂-gasstroom uit centrale aanvoer en 0,8 L/s voor de gasmengsels uit gasflessen. Er is onderscheid gemaakt tussen het plaatsen van een kooi in de UNO box die gevuld was met CO₂ (afb. 1a en 1c) of met lucht (afb. 1b). Het euthanasieprogramma werd gestart nadat de kooi met dieren in de box werd geplaatst. Bij het vooraf vullen, stroomde de CO₂ uit de euthanasie-



Afbeelding 1: Schematische voorstelling van uitgevoerde euthanasietesten. a: vooraf vullen. b: niet vooraf vullen. c: CDP standaard.



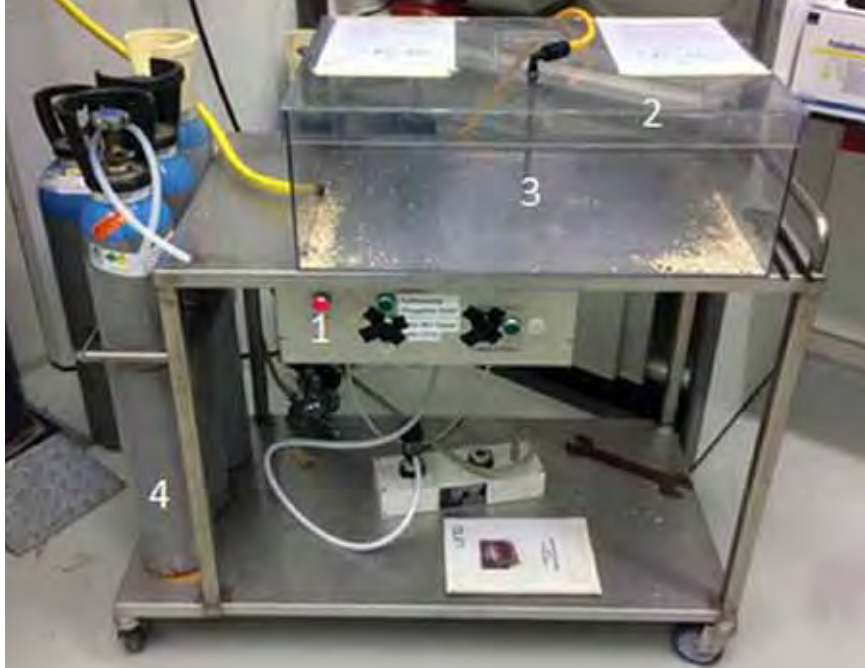
Afbeelding 2: Vooraf vullen van de euthanasiebox. Fase A: De euthanasiebox wordt vooraf gevuld met CO₂. Fase B: De kooi met dieren wordt in de euthanasiebox geplaatst, hierbij stroomt CO₂ vanuit de box in de kooi. Fase C: In twee fases wordt nog gas toegevoerd. In de eerste fase wordt de kooi gevuld met een mengsel van CO₂/O₂/N₂ in de tweede fase met 100% CO₂.

Test nr.	Vooraf vullen	Instroomhoogte	1e fase CO ₂ /O ₂ /N ₂
CDP	Ja	laag	100/0/0
1	Nee	laag	40/60/0
2	Nee	laag	50/50/0
6	Ja	laag	50/50/0
8	Ja	laag	70/30/0
9	Nee	hoog	50/50/0
10	Ja	hoog	50/50/0

Tabel 1: De verschillende testsituaties, variërend in al dan niet vooraf vullen, instroomhoogte en concentraties CO₂ en O₂

box langzaam de kooi in voordat het euthanasieprogramma gestart werd. Dit is weergegeven in afb. 1a en 1c en afb. 2. We hebben ook gevarieerd met de instroomhoogte. Volgens de 'standaard' situatie bij de CDP stroomt het gas uit een pijpje, met de opening ongeveer twee centimeter boven de bodem van de kooi. Daarnaast hebben wij ook een hoge gasinstroom getest waarbij het gas ca. 12 cm boven de bodem de kooi instroomt. De hypothese was dat hierdoor een betere verspreiding van de CO₂ in de kooi ontstond. De dieren werden geëuthanaseerd met gebruikmaking van een UNO Euthanasie UNIT (inhoud 93,75L; afb. 3).

»



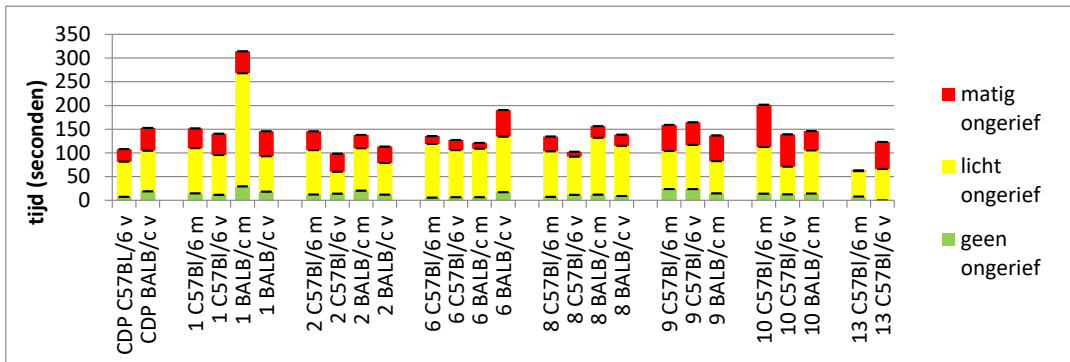
Afbeelding 3: de UNO-euthanasiebox bij de CDP, gebruikt tijdens de testen.
1: bedieningspaneel;
2: euthanasiebox;
3: gasuitlaat;
4: gasflessen

Analyse gedrag en bepalen ongerief

Van alle euthanasietesten zijn filmopnames gemaakt. Gedragsanalyse is gedaan aan de hand van deze filmopnames. Aan elk gedrag is een ongeriefscategorie met een wegingsfactor gekoppeld. We hebben drie ongeriefscategorieën gebruikt, namelijk: geen ongerief (weging 0,1), licht ongerief (weging 0,3) en matig ongerief (weging 0,6). Deze wegingsfactoren zijn toegekend op basis van het ingeschatte ongerief dat tot uiting kwam in het gedrag. Daarnaast is de tijdsduur bepaald tot bewusteloosheid (het moment van wegzakken van de kop) en tot de dood (15 sec. na de laatste ademhaling). De ongeriefsscore is bepaald door de wegingsfactoren te vermenigvuldigen met de tijdsduur van het gedrag uit de categorieën (gewogen gemiddelde). De resultaten van de ongeriefscores zijn geanalyseerd met het statistische programma Sigmaplot. De data werd gepoold en geanalyseerd door middel van non-parametrische One way ANOVA's (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) waarbij de effecten van de onafhankelijke variabelen achtergrond, geslacht, test, gasmengsel, vulslang (hoog/laag) en vooraf vullen (wel/niet) werden onderzocht op de afhankelijke variabelen ongeriefscore en tijdsduur. Significante effecten werden, waar toepasbaar, verder onderzocht door middel van Posttest (All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method)), $P < 0.05$ werd significant geacht.

Resultaten

In afb. 4 is de tijdsduur tot bewusteloosheid van de verschillende ongeriefscategorieën gevisualiseerd van de uitgevoerde testen. Er werden geen significante verschillen gevonden tussen de verschillende testen op basis van het ongerief. Ook werden er geen significante effecten gevonden van gasmengsel en wel of niet vooraf vullen op het ongerief. Wel werd er een significant effect gevonden van een hoge of lage vulslang op het ongerief. Het ongerief was significant lager bij een lage vulslang. Dit was te zien bij de CDP standaard, waarbij de box werd gevuld en er gebruik werd gemaakt van 100% CO_2 . Hetzelfde effect was aanwezig bij de testen die gebruik maakten van een mengsel van $\text{CO}_2/\text{O}_2/\text{N}_2$: 50/21/29, zowel bij de gevulde box, als bij niet voorvullen (niet in Tabel 1 en afb. 4 opgenomen). Deze testen zijn uitgevoerd op muizen met een C57BL/6 achtergrond. Bij muizen met een BALB/c achtergrond werd ook een positieve invloed van een lage instroom gevonden, het verschil was echter niet significant.



Afbeelding 4: Tijd tot de dood onderverdeeld in gedragsmatig vertoon van geen, licht, of matig ongerief bij een aantal testen. Er is onderscheid gemaakt tussen de twee onderzochte muizenlijnen (C57BL/6 en BALB/c) en geslacht (m = man, v = vrouw). Testnummers zijn aangegeven op de categorische x-as (CDP, 1, 2, 6, 8, 9, 10, 13). De testcondities zijn op basis van het testnummer na te zoeken in Tabel 1. CDP staat voor de CDP standaard methode.

Gekeken naar de tijdsduur werden meer significante verschillen gevonden. De analyses van 'Test', gasmengsel, wel/niet vooraf vullen en hoge/lage vulslang toonden allen significante effecten op de tijdsduur. De tijdsduur bij de CDP standaard test (CDP) was significant korter dan bij testen 1, 2, 9 en 10. Het 100/0/0 gasmengsel (CDP standard) resulteert in een significant kortere tijdsduur tot bewusteloosheid dan gasmengsels 40/60/0 (gebruikt bij testen 1 en 13), 50/50/0 (gebruikt bij testen 2, 6, 9, 10) en 70/30/0 (gebruikt bij test 8).

Vooraf vullen met een lage instroom resulteerde bij muizen met een C57BL/6 achtergrond niet in een significant kortere tijdsduur in vergelijking met de CDP standaard, het effect was vooral zichtbaar op het ongerief, doordat muizen bij deze testen minder tijd besteden aan gedrag uit de categorie 'matig ongerief', en meer tijd aan gedrag uit de categorieën 'licht ongerief' en 'geen ongerief'.

Daarnaast hebben we ook de effecten van achtergrond en geslacht op ongerief en tijdsduur onderzocht. Hieruit kwam naar voren dat C57BL/6 muizen over het algemeen significant minder ongerief vertonen dan BALB/c muizen. De tijdsduur tot bewusteloosheid was ook significant korter bij C57BL/6 muizen dan bij BALB/c muizen. Vrouwtjes vertoonden over het algemeen minder ongerief dan mannetjesmuizen, en de tijdsduur tot bewusteloosheid was bij vrouwtjesmuizen ook significant korter dan bij mannetjesmuizen. Bij een aantal testen bleken enkele muizen met BALB/c achtergrond bloedneuzen te hebben. Hier valt op dat dit gebeurt bij testen die vrij goed scoren als gekeken wordt naar gedrag. De bloedneuzen worden meestal zichtbaar nadat de dieren buiten bewustzijn zijn geraakt.

Conclusie

In deze studie hebben we onderzocht wat het effect was van verschillende gasmengsels, een hoge of lage vulslang en wel of niet vooraf vullen op ongerief en tijdsduur tot bewusteloosheid. Uit onze resultaten kunnen we de conclusie trekken dat de toevoeging van zuurstof geen effect heeft op ongerief, maar wel de tijdsduur tot bewusteloosheid verlengt. De toevoeging van zuurstof is, gebaseerd op deze resultaten, dus af te raden. Een gasinstroom op grotere hoogte zorgt voor significant meer ongerief en een langere tijdsduur vergeleken met een gasinstroom vlak boven de bodem. Een hoge gasinstroom wordt niet aangeraden. Met betrekking tot het wel of niet vooraf vullen is er geen effect op ongerief, vooraf vullen verkort echter wel de tijdsduur tot bewusteloosheid. Vooraf vullen van de euthanasiebox is daarom aan te raden.

Daarnaast hebben we significante verschillen gevonden tussen achtergronden en geslachten >>



Achtergrond	Geslacht	Beste test	Omschrijving
C57BL/6	Mannelijk	Test 13	Vooraf vullen, hoge instroom, 40% CO ₂ tijdens fase 1
	Vrouwelijk	Test 8	Vooraf vullen, lage instroom, 70% CO ₂ tijdens fase 1
BALB/c	Mannelijk	Test 6	Vooraf vullen, lage instroom, 50% CO ₂ tijdens fase 1
	Vrouwelijk	Test 2	Geleidelijk vullen, lage instroom, 50% CO ₂ gedurende fase 1

Tabel 2: Beste euthanasiemethode per stam en geslacht.

op ongerief en tijdsduur. Afhankelijk van achtergrond en geslacht kwamen verschillende testen als beste naar voren. Dit zou aanleiding kunnen geven tot het ontwikkelen van geoptimaliseerde euthanasieprogramma's per achtergrond/geslacht (Tabel 2).

Discussie

Met de interpretatie van deze resultaten moet voorzichtig worden omgaan. We hebben in dit onderzoek veel variabelen onderzocht en er zijn een aantal factoren die het niet mogelijk maken harde conclusies te trekken. Bijvoorbeeld: hoe schat je het ongerief in, hoe bepaal je de wegingsfactor, hoe stel je (de tijd tot) bewusteloosheid/dood vast, hoe interpreteer je (stamverschillen in) gedrag. Hiervoor zou het experiment eenvoudiger van opzet moeten zijn, met minder variabelen en beter gestandaardiseerd (bijvoorbeeld alleen dieren van dezelfde stam, »

geslacht, leeftijd), gevalideerde meetmethoden, meer dieren per experimentele groep, etc. Met dit in het achterhoofd, zijn de beschreven effecten en verschillen vastgesteld en voorzichtige conclusies getrokken.

Het vaststellen van het intreden van bewusteloosheid op basis van visuele waarnemingen aan de dieren is niet eenvoudig. Wij hebben ervoor gekozen om het tijdstip van bewusteloosheid te bepalen aan de hand van het naar beneden zakken van de kop. We hadden ervoor kunnen kiezen om het tijdstip van bewusteloosheid te bepalen door het verlies van de terugtrekreflex te meten. De reden dat we hier niet voor hebben gekozen is dat deze handeling tot verstoring van gedrag en het euthanasieproces kan leiden.

Tussen muizenlijnen bestaan verschillen in gedrag. We hebben de verschillende testen daarom uitgevoerd op twee veelgebruikte achtergronden, dieren met een C57BL/6 achtergrond en dieren met een BALB/c achtergrond. Veel genetisch gemodificeerde lijnen zijn op een C57BL/6 achtergrond gefokt. Omdat het aantal muizen met BALB/c achtergrond zeer laag was, kunnen er over muizen met deze achtergrond weinig conclusies uit dit onderzoek worden getrokken.

De toekenning van (vooraf bepaalde) wegingsfactoren die gebruikt zijn om de ongeriefscore te berekenen, is van grote invloed op het resultaat. Er is hierbij geen gebruik gemaakt van een referentiesysteem. Deze wegingsfactoren zijn door ervaren personen toegekend, desondanks blijft het subjectief. Wordt de wegingsfactor anders gekozen, dan zullen de resultaten ook anders uitvallen.

Tijdens CO₂ euthanasie van fokoverschot worden veel dieren in een kooi verzameld. Dit is praktisch, omdat het euthanasieprogramma op deze manier minder vaak hoeft te draaien dan wanneer alle dieren in hun eigen thuiskooi worden geëuthanaseerd. Voor het dierenwelzijn is het minder goed, omdat de dieren in een vreemde kooi bij vreemde dieren worden gezet. Dit zou extra stress kunnen veroorzaken.

Bij een aantal testen bleken enkele muizen met BALB/c achtergrond bloedneuzen te hebben. Hier valt op dat dit gebeurt bij testen die vrij goed scoren als gekeken wordt naar gedrag. De bloedneuzen worden meestal zichtbaar nadat de dieren buiten bewustzijn zijn geraakt. Het is niet uitgesloten dat de bloedingen toch ongerief bij bewustzijn hebben veroorzaakt, dit hebben we niet kunnen meten in deze studie en het is dan ook niet meegenomen in de resultaten. Mogelijk worden deze bloedneuzen veroorzaakt door de toegevoegde zuurstof, aangezien hierdoor bloedingen in de longen kunnen optreden. Onderbouwing voor deze theorie is het feit dat er geen bloedneuzen zijn opgetreden bij testen met toegevoegde N₂.

Referenties

- 1 Danneman PJ, Stein S en Walshaw SO (1997) *Human and practical implications of using carbon dioxide mixed with oxygen for anesthesia or euthanasia of rats*. American Association for Laboratory Animal Science, Vol. 47, 376-385.
- 2 Moody CM, Chua B en Weary DM (2014) *The effect of carbon dioxide flow rate on the euthanasia of laboratory mice*. Laboratory Animals, Vol. 48(4), 298-304.
- 3 Coenen AML et al. (1995) *Carbon dioxide euthanasia in rats: oxygen supplementation minimizes signs of agitation and asphyxia*. Laboratory Animals, Vol. 29, 262-268.
- 4 Makowska IJ et al. (2009) *Evaluating methods of gas euthanasia for laboratory mice*. Applied Animal Behaviour Science, pp. 230-235.
- 5 Corbach S (2006) *Untersuchung der CO₂-Euthanasie bei Labormäusen auf Tierschutzgerechtigkeit*. Institut für Tierschutz und Verhalten. Hannover: sn, 2006

Deze literatuurlijst is niet volledig. Een volledige literatuurlijst is op te vragen bij de auteurs.

«