



Euthanasie van neonatale muizen

Een overzichtsartikel van de verschillende mogelijkheden, beperkingen en afwegingen

Afbeelding 1. Nestje muizenpups van zeven dagen oud.

Binnen elke instituut waar muizen als proefdier gehouden worden, komt het voor dat muizen voor de speenleeftijd (< 21 dagen) geëuthanaseerd moeten worden. Redenen hiervoor kunnen zijn, dat de jongen of de moedermuis een humaan eindpunt bereikt hebben, omdat dit onderdeel is van een experimenteel protocol, of omdat dieren een onjuist genotype hebben in het kader van het fokbeleid en de dieren bij doden voor de speenleeftijd nog niet vergunningplichtig zijn.

Doreen van Rijswoud-Ram, Mijke de Vreij-Kruidenier, Anne Marie Rhebergen
Nederlands Kanker Instituut te Amsterdam, afdeling Proefdieren. Contact: ivd@nki.nl

In het geval van een humaan eindpunt bij de pups kan gedacht worden aan aangeboren of verkregen afwijkingen. Bij een humaan eindpunt van de moeder kan het gaan om de ontwikkeling van een tumor of een andere aandoening, waarbij de jongen niet overgelegd kunnen worden. Welke euthanasiemethoden zijn in het geval van jonge muizenpups een optie? Kan dit op dezelfde manier gedaan worden als bij volwassen dieren?

Binnen de IvD (Instantie voor Dierwelzijn) van het NKI (Nederlands Kanker Instituut) ontstond discussie rondom het vraagstuk: wat is de beste euthanasiemethode voor niet gespeende pups (<21 dagen)? Op dat moment waren de toegepaste euthanasiemethoden voor de nog niet gespeende dieren: decapitatie (zonder voorafgaande anesthesie) bij dieren <14 dagen en blootstelling aan CO₂ (koolstofdioxide) van pups >14 dagen. Aanleiding voor de discussie vormde de EU-richtlijn 2010/63/EU (zie Bijlage 1).

Bijlage IV van deze richtlijn geeft namelijk aan dat decapitatie alleen is toegestaan als er geen alternatieven zijn of als er voorafgaand aan decapitatie anesthesie wordt toegepast.

Wij hebben echter de ervaring, zoals ook beschreven is in de literatuur [1], dat het doden van pups jonger dan veertien dagen met CO₂, als monotherapie of als inleidende anesthesie, niet op een verantwoorde manier mogelijk is. Naast de resistentie voor CO₂, met als gevolg een vertraagde werking, bestaat het risico dat er onduidelijkheid is over het daadwerkelijke moment van overlijden van de dieren wanneer CO₂ als monotherapie ingezet wordt [2].

Ook voor injecties met pentobarbital is het moment van overlijden lastig vast te stellen.

Daarnaast is het toedienen van de injectie pentobarbital bij zeer jonge muizenpups, gezien hun kleine afmeting, lastig [2]. De veiligheid van de medewerkers, met het oog op accidentele zelfinjectie of misbruik, staat daarin ook centraal.

De overige methoden die in bijlage IV genoemd worden, zijn in onze ogen niet mogelijk.

Kunnen wij op grond van bovenstaande overwegingen en ervaringen concluderen dat bij de euthanasie van muizen jonger dan veertien dagen, het geoorloofd is om decapitatie zonder voorafgaande anesthesie toe te passen?

Bij het kiezen van een geschikte euthanasiemethode voor zoogdierneonaten moet een onderscheid gemaakt worden in het type zoogdier: nestblijver of nestvlieder. De jongen van muizen zijn nestblijvers. Ze vertonen meer gelijkenis met embryo's dan met volwassenen. De voltooiing/eindontwikkeling van het zenuwstelsel gebeurt vanaf net voor de geboorte tot in de tweede week postpartum. Tot een leeftijd van tien dagen worden de muizen tot neonaten gerekend. De euthanasie van de nestblijvers is lastiger, ten gevolge van algehele onderontwikkeling. Voor dieren vanaf tien dagen oud kunnen, wanneer euthanasie noodzakelijk is, de richtlijnen voor volwassen dieren gevolgd worden [3,4,5]

Materiaal en methoden

Wij hebben diverse artikelen (zie Bronnen) en de AVMA (American Veterinary Medical Association) guidelines uit 2020 [3] geraadpleegd. Daarnaast hebben wij de artikelen en bijlagen uit de Wet op dierproeven [6] en de Richtlijn 2010/63 EU [7] die betrekking hebben op het doden van dieren geconsulteerd. Naast het raadplegen van deze literatuur, hebben wij dit vraagstuk via het IvD-Platform voorgelegd aan de andere IvD's in het land. Er waren zeven reacties. De respons was zeer divers: zie Tabel 1 bij de resultaten.

Resultaten en discussie

Wat vertelt de wetgeving ons over euthanasiemethoden? In de Wet op de dierproeven (Wod) staat in artikel 13c beschreven [6]:

- Dieren worden in de inrichting van de fokker, leverancier of gebruiker door een deskundige persoon op een zodanige wijze gedood dat de dieren zo weinig mogelijk pijn, lijden en angst wordt berokkend. In geval van veldonderzoek kan een dier buiten de instelling van de fokker, leverancier of gebruiker door een deskundig persoon worden gedood.
- Voor het doden van de in richtlijn vermelde dieren wordt gebruik gemaakt van een in de richtlijn opgenomen passende methode voor het doden van deze dieren.
- In afwijking van het tweede lid kan een projectvergunning worden verleend voor een project waarbij een methode voor het doden van dieren wordt gebruikt, die niet als passende methode is opgenomen in de richtlijn, indien door middel van een wetenschappelijke motivering is aangetoond dat het doel van de dierproef niet kan worden bereikt met de in de richtlijn opgenomen methoden. Voorts kan Onze Minister een vrijstelling of ontheffing van het tweede lid verlenen, indien de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan wordt geacht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

De Wod refereert dus naar de Richtlijn 2010/63 EU [7]. In artikel 6 (methoden voor het doden) en bijbehorende bijlage IV (zie Bijlage 1) staan de methoden voor euthanasie, plus eventuele kanttekeningen, genoemd voor de diverse diersoorten (zie Bijlage). Belangrijk daarin lijkt vooral lid 4. In lid 4 van artikel 6 van de Richtlijn 2010/63 EU staat [7]:

- De bevoegde instanties kunnen uitzonderingen op het voorschrift van lid 3 toestaan:
 - teneinde het gebruik van een andere methode toe te staan, op voorwaarde dat de methode op basis van wetenschappelijke bewijzen ten minste even humaan wordt geacht, of
 - wanneer middels een wetenschappelijke motivering wordt aangetoond dat het doel van de procedure met een in bijlage IV vermelde methode voor het doden niet kan worden bereikt.

De reactie van de zeven IvD's hebben wij geïnventariseerd en uitgezet in onderstaande tabel. Decapitatie, met of zonder voorafgaande anesthesie, lijkt de meest toegepaste methode.

Euthanasiemethode pups < 14 dagen	Aantal keer genoemd	Kanttekening
Schedel verbrijzelen	1 x	Manueel
Cervicale dislocatie	1x	Eventueel verdoving vooraf
Decapitatie	5x	<7 dagen of <4 dagen i.v.m. onderzoek; eventueel nadien onderdompelen in vloeibaar stikstof
Isofluraan & decapitatie	1 x	>4 dagen oud; daarvoor zonder sedatie i.v.m. onderzoek
CO ₂ (vanaf 7 dagen)	1 x	vanaf 7 dagen
CO ₂ & isofluraan		4% isofluraan, 100% CO ₂ , graduele instroom 20% bakvolume/min; 5 min
CO ₂ & isofluraan		4% isofluraan, 100% CO ₂ , graduele instroom 20% bakvolume/min; 5 min

Tabel 1. Reactie van de zeven lvd's op onze vraagstelling.

Op basis van de literatuur hebben wij een overzichtsschema gemaakt, waarin de verschillende euthanasiemethoden bij neonaten, met daarbij de voor- en nadelen, tegen elkaar zijn uitgezet. Hierin wordt een onderverdeling gemaakt op basis van type euthanasiemethode [3,4]:

1. Chemisch:

- Injectietechniek
- inhalatiegassen

2. Fysiek:

- cervicale dislocatie
- decapitatie
- hypothermie

Euthanasie-methode	Voordelen	Nadelen	Kanttekening
Injectie barbituraten [2,3,4]	- werken snel en goed - goedkoop	- fixatie nodig - liefst intraveneus (IV) toegediend lastig - intraperitoneaal (IP) injectie mogelijk pijnlijk en effect vertraagd (t.o.v. IV) - IP injectie moeilijk bij hele jonge pups - registratie nodig/ gevaarlijk	Manueel
Injectie ethanol [3,4]	- makkelijk en goedkoop	- bij dieren <35 dagen vertraagd werkzaam (volwassen muizen in 2-4 min) - werkt erg irriterend dus alleen onder sedatie	-volwassen dieren 0,5 ml 70-100% ethanol intraperitoneaal (IP)
Inhalatie anesthesie (CO ₂) [1,2,3,4,5]	- makkelijk toepasbaar - goedkoop - dier kan in eigen kooi blijven	- aversie met als gevolg apneu of stress - bij neonaten kan het 50 min duren voor overlijden (tgv resistentie voor hypoxie) - meer geschikt voor anesthesie dan euthanasie	- liefst aanvullende euthanasie methode toepassen (CD of decapitatie) zodra dier niet meer op pijnlijke stimuli reageert

Hypothermie [3,4,5]	- makkelijk toepasbaar	- alleen bij dieren <10 dagen oud - kan erg lang duren: eerst sedatief dan euthanasie	- geen direct huidcontact met koude oppervlak → weefselschade → pijn - bewusteloze foetussen of neonaten <5 dagen bevriezen in vloeibaar N ₂ of haarloze dieren <4g
Decapitatie (d.m.v. schaar of scherp mes) [3,4,5]	- snel en makkelijk toepasbaar - geen chemische contaminatie	- fixatie - alleen dieren <7 dagen - kan pijn veroorzaken bij niet scherp materiaal - kans op letsel bij uitvoerder - vereist bekwaamheid - bezwaarlijk voor degene die het uitvoert	- let op gebruik scherp en geschikt materiaal - eventueel hoofdjes in vloeibaar stikstof onderdompelen - mogelijk is er nog even elektrische activiteit in de hersenen (verlies corticale functie in 5-30 seconden)
Cervicale dislocatie (CD) [3,4,5]	- snelle uitvoering - geen chemische contaminatie	- fixatie - lastig uitvoerbaar bij hele jonge dieren - vereist bekwaamheid - bezwaarlijk voor degene die het uitvoert	- eventueel met toepassing pincet - mogelijk is er nog even elektrische activiteit in hersenen aanwezig (verlies corticale functie in 5-10 seconden)
Stomptrauma kop [3,4]	- goedkoop en effectief - geen chemische contaminatie	- geeft weefselschade (in het kader van weefselonderzoek) - bezwaarlijk voor degene die het uitvoert	

Tabel 2. Een overzichtsschema op basis van de literatuur naar de verschillende euthanasiemethoden bij neonaten.

Uit het artikel van Pritchett [1] blijkt dat de tijd tot het overlijden van neonatale muizen bij CO₂-euthanasie afhangt van de leeftijd en tot wel 50 minuten kan duren (Tabel 3) (bij dieren van een dag oud). Nestblijvende neonaten hebben door verschillende mechanismes, zoals een laag metabolisme en een gewenning aan een lage zuurstofdruk in de baarmoeder, een verhoogde resistentie tegen blootstelling aan CO₂ [1,2].

Leeftijd muizen	Tijd van CO ₂ blootstelling
Niet-behaarde pups: 0-6 dagen	60 min
Behaarde pups, ogen gesloten: 7-13 dagen	20 min
Niet-gespeende pups, ogen open: 14-20 dagen	10 min
Gespeende pups + volwassen dieren: >21 dagen	5 min

Tabel 3. Tijdsduur tot euthanasie na blootstelling CO₂ per leeftijdscategorie. Let op: deze tijden kunnen per instituut verschillen, afhankelijk van factoren zoals type kooi en gebruikte apparatuur.

Conclusie

Dierenwelzijn is de belangrijkste factor in de keuze voor een euthanasiemethode. Na het raadplegen van het werkveld en de literatuur kunnen wij concluderen dat decapitatie bij muizen-

pups jonger dan tien dagen de voorkeur heeft. Bij muizen van tien dagen oud tot de speenleeftijd, moet bij het gebruik van CO₂ als euthanasiemethode extra aandacht zijn voor de verlengde blootstellingstijd die nodig is ten opzichte van volwassen dieren. Iedere instelling moet zijn eigen referentietijden hiervoor bepalen. Er mag afgeweken worden van de richtlijn indien er een goede wetenschappelijk onderbouwde reden is. Deze afweging moet vermeld worden in de desbetreffende projectvergunning.

Bronnen

1. Pritchett K et al. (2005). Euthanasia of neonatal mice with carbon dioxide. *Comparative Med*, 55(3):275-281
2. Klaunberg B et al. (2004). Euthanasia of Mouse Fetuses and Neonates. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 43(5) 29-34
3. Leary S et al. (2020). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. American Veterinary Medical Association
4. Close B et al. (1996; 1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1 (1996). *Laboratory Animals* 30, 293-316 Part 2 (1997). *Laboratory Animals* 31, 1-32
5. Guidelines for euthanasia of rodent fetuses and neonates: Animal Research Advisory Committee Guidelines | OACU (nih.gov)
6. Wet op de Dierproeven: wetten.nl - Regeling - Wet op de dierproeven - BWBR0003081 (overheid.nl)
7. Richtlijn 2010/63/EU: Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt Voor de EER relevante tekst (europa.eu) (EER = Europese Economische Ruimte)

BIJLAGE 1: RICHTLIJN 2010/63/EU VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD (22 september 2010) ARTIKEL 6: METHODEN VOOR HET DODEN

1. De lidstaten zorgen ervoor dat dieren worden gedood op zodanige wijze dat hun zo weinig mogelijk pijn, lijden en angst wordt berokkend.
2. De lidstaten dragen er zorg voor dat dieren worden gedood in de inrichting van een fokker, leverancier of gebruiker, door een deskundig persoon. In het geval van veldonderzoek mag een dier evenwel buiten een inrichting worden gedood door een deskundig persoon.
3. Voor het doden van de in bijlage IV vermelde dieren wordt gebruikgemaakt van de in die bijlage opgenomen passende methode voor het doden.
4. De bevoegde instanties kunnen uitzonderingen op het voorschrift van lid 3 toestaan:
 - a) teneinde het gebruik van een andere methode toe te staan, op voorwaarde dat de methode op basis van wetenschappelijke bewijzen ten minste even humaan wordt geacht, of
 - b) wanneer middels een wetenschappelijke motivering wordt aangetoond dat het doel van de procedure met een in bijlage IV vermelde methode voor het doden niet kan worden bereikt.
5. De leden 2 en 3 zijn niet van toepassing wanneer een dier om redenen van dierenwelzijn, volksgezondheid, openbare veiligheid, diergezondheid of het milieu, in een noodsituatie moet worden gedood.

BIJLAGE IV: METHODEN VOOR HET DODEN VAN DIEREN

1. Voor het doden van dieren worden de methoden van onderstaande tabel gebruikt.
Er kunnen methoden worden gebruikt die niet in de tabel staan:
 - a. voor bewusteloze dieren, op voorwaarde dat het dier voor zijn dood niet weer bij bewustzijn komt
 - b. dieren die in landbouwkundig onderzoek worden gebruikt, wanneer het doel van het project vereist dat de dieren worden gehouden onder soortgelijke omstandigheden als dieren in de commerciële landbouw, kunnen worden gedood overeenkomstig de voorschriften in bijlage I bij Verordening (EG) nr. 1099/2009 van de Raad van 24 september 2009 inzake de bescherming van dieren bij het doden
2. Het doden van de dieren wordt voltooid met één van onderstaande methoden:
 - a. bevestiging dat de circulatie definitief is gestopt
 - b. vernietiging van de hersenen
 - c. dislocatie van de nek
 - d. leegbloeden
 - e. bevestiging dat rigor mortis is ingetreden