



Trainen van ratten en muizen: ervaringen in onderzoek en onderwijs

In deze speciale uitgave van Biotechniek gaat het over het trainen van proefdieren in het algemeen. In Utrecht zijn we sinds ongeveer een jaar bezig met het trainen van ratten en muizen voor onderzoek en onderwijs. In dit stukje willen wij onze ervaringen tot nu toe met jullie delen en de mogelijke voor- en nadelen van trainen verder toelichten.

Esther Langen¹, Lisa Drost², Mieneke Luijendijk², Ilse Ros¹, Kathy van Eldik¹

¹ Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Departement Population Health Sciences, Afdeling Dier in Wetenschap en Maatschappij, contact: E.M.A.Langens@uu.nl

² UMC Utrecht Brain center, Departement Translational Neuroscience

Het hoe en waarom van trainen wordt in het stuk van Claudia Vinke en Chantal Kapteijn in deze Biotechniek al uitgelegd: indien op de juiste manier aangepakt kan het trainen van (proef)dieren tot welzijnsverbeteringen leiden. Daarnaast kan het ook helpen om invasieve handelingen efficiënter en veiliger te laten verlopen (omdat dieren bijvoorbeeld gemakkelijker meewerken). Waar trainen bij grotere proefdieren zoals apen en honden al langere tijd wordt toegepast, is het trainen van kleinere proefdieren zoals ratten en muizen nog relatief onbekend. Toch zien we ook in het trainen van ratten en muizen in dierproeven steeds meer ontwikkelingen. Een prachtig voorbeeld daarvan is wat men bij de Research Institutes of Sweden (RISE) doet: zij trainen ratten en muizen in onderzoek op verschillende soorten handelingen en delen hun ervaringen via filmpjes en verhalen op hun website [1].

Trainen in onderwijs

In het kader van de cursus Proefdierkunde geven we in Utrecht veel onderwijs met ratten en muizen. Omdat deze dieren meestal voor een langere periode bij ons blijven, en we in het onderwijs ook aandacht willen besteden aan verfijning, hebben we besloten een deel van onze onderwijsdieren te trainen op de handelingen die studenten in practica op ze oefenen (in dit geval subcutane injecties bij muizen en het inbrengen van een orale canule bij ratten om vloeistoffen toe te kunnen dienen, ofwel orale gavage). We hopen daarmee enerzijds de practica voor deze dieren minder invasief te maken, anderzijds willen we hiermee aan de studenten laten zien wat de mogelijkheden zijn wanneer het om trainen van proefdieren gaat, en wat de mogelijke voor- en nadelen zijn. Door slechts een deel van de dieren te trainen kunnen we studenten tijdens de practica ook zelf laten ervaren wat de verschillen tussen getrainde en niet getrainde dieren zijn.

Trainen in onderzoek

Het bewust maken van de mogelijkheden van het trainen van proefdieren tijdens de cursus Proefdierkunde is zeer belangrijk om uiteindelijk ook in het onderzoek de dieren te trainen voor bepaalde handelingen. Parallel aan het trainen van de onderwijsdieren, zijn we ook in diverse onderzoeken gestart met trainen. Hierbij zijn we begonnen met het trainen van zowel ratten als muizen voor orale gavage. We hebben hierbij ook goed gekeken naar hoe de mensen van RISE in Zweden hun trainingen hebben aangepakt en hierop een plan opgesteld om de dieren

te trainen. Als trainen van de dieren tot minder stress leidt bij handelingen als orale gavage, en de aanpak van het trainen praktisch toepasbaar blijkt in onderzoek, zou dit een mooie verfijning kunnen zijn.

Voordat je begint...

Omdat wij zelf eigenlijk nog maar beginners zijn op het gebied van trainen weten we heel goed waar je allemaal tegenaan kunt lopen wanneer je begint met trainen. Het belangrijkste punt dat we iedereen op dit gebied kunnen meegeven is: zorg dat je zelf getraind bent! Zonder ervaring en voorkennis maak je al heel snel fouten: signalen die voor het dier net niet helemaal duidelijk zijn, net iets te veel tijd tussen de gewenste gedraging en de beloning laten, te snel of juist te langzaam door de trainingsniveaus heen lopen... Het is dus raadzaam om je goed in te lezen en te oefenen, liefst onder begeleiding van experts (zie ook het stuk van Marit Vernes, Martina Stocker en Annet Louwerse in deze Biotechniek).

Tijdsinvestering en trainingsprotocollen

Trainen kost natuurlijk tijd, en dat is iets om rekening mee te houden, zoals in het stuk van Claudia Vinke en Chantal Kapteijn al genoemd is. Voor onze onderwijsmuizen hebben we tussen de 14 en 19 sessies nodig gehad om ze te trainen op het ondergaan van een subcutane injectie (we injecteerden hierbij fysiologisch zout, 0,1 ml via een 30G naald). Een trainingssessie duurde vijf minuten, en we doorliepen een sessie per dag en drie tot vier sessies per week.

Daarmee was de eerste muis pas na vier weken volledig getraind. Daarbij moet wel gezegd worden dat we bij het trainen van deze dieren nog erg onervaren waren, en we bij het uitvoeren van de protocollen zeker nog tijd kunnen winnen (door de beloningen beter te koppelen aan de gewenste gedragingen van de dieren, en duidelijkere signalen te geven aan de dieren).

We maken op dit moment plannen om de training met nieuwe muizen te herhalen op een efficiëntere manier, om zo een beter beeld te kunnen krijgen van de benodigde tijd om te trainen op subcutane injecties.

Daarnaast hebben we muizen in een onderzoekssetting geprobeerd te trainen voor 'vrijwillige' orale gavage. Hierbij hebben we ongeveer 1 tot 1,5 week (vijf tot acht keer à vijf minuten per dier) de tijd genomen om de muizen goed te hanteren en vertrouwd te maken met ons en de manier van vasthouden voor de gavage. Hierbij hoefden we de dieren niet te fixeren bij het nekveld, maar voldeed het vasthouden van de kop waarbij de rest van het lichaam in onze handpalm rustte. We merkten dat de dieren hierdoor al een stuk minder gestrest waren.

Na de eerste stap wilden we de dieren laten wennen aan de orale canule (een voedingssonde van Vygon: RXC PUR CH04, 40 cm). Hierbij werd de canule alleen in de bek geschoven, zonder voorbij de slikreflex te gaan. Deze stap hebben we ongeveer drie keer per dier herhaald en kostte ongeveer drie minuten per dier. Hierna zijn we verder gegaan naar de complete gavage, waarbij de eerste twee keer nog niets toegediend werd. De canule wordt hierbij tot voorbij de slikreflex ingebracht, hoe diep zal uiteraard afhangen van de grootte van het dier. Maximaal de afstand van de kin tot onder het sternum (borstbeen) is een goede richtlijn (dit kan van buitenaf worden gemeten door de canule voor het sternum te houden en de benodigde diepte te bepalen).

Ratten zijn door ons zowel in een onderwijs- als in een onderzoekssetting getraind op het inbrengen van een orale canule (Vygon: RXC PUR CH04, 40 cm). De ervaringen wat betreft tijdsinvestering lopen hier wat uiteen. Bij de onderzoeksratten namen deze trainingen ongeveer twee weken in beslag (dagelijks ca. 5-10 minuten per rat, vijf dagen per week), een vergelijkbaar trainingsschema als bij muizen. Bij de onderwijsdieren waren er tussen de 16 en 23 sessies van vijf minuten nodig om de dieren te trainen., Omdat we hier slechts drie sessies per week hebben

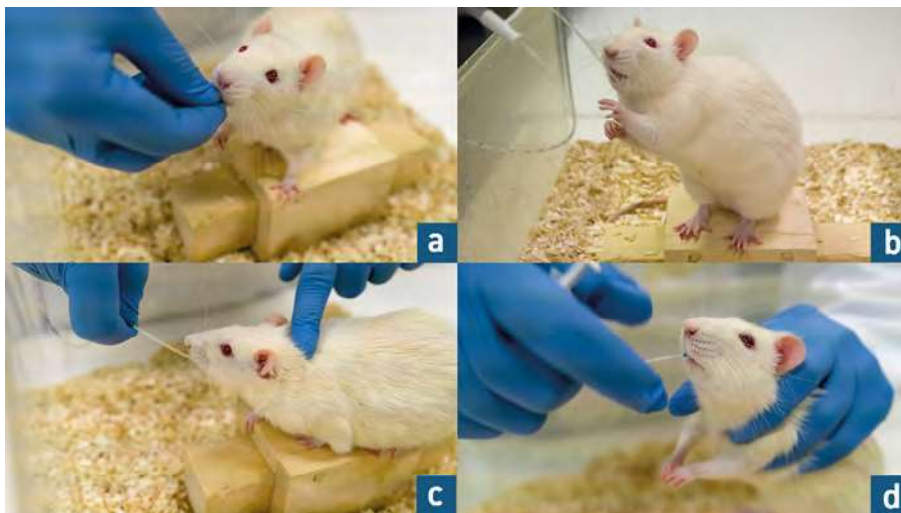
uitgevoerd heeft het uiteindelijk ongeveer tien weken geduurd voordat alle dieren volledig waren getraind. Er zaten echter best wat verschillen tussen de gebruikte trainingsprotocollen, wat ze slecht te vergelijken maakt (Tabel 1). Bij de onderwijssdieren bevatte het protocol meer stappen en doordat het trainen pas begonnen werd wanneer een dier uit eigen initiatief op een verhoging klom (Tabel 1 en Afb. 1), hadden de dieren ook meer de mogelijkheid om zelf te bepalen of ze mee wilden werken. Het voordeel is dat de dieren mogelijk meer controle over de situatie ervaren, maar het nadeel is uiteraard dat het soms ook langer duurt voordat de training kan starten. In onderzoek, waarbij meerdere dieren vaak op ongeveer dezelfde tijd behandeld moeten worden, en er minder ruimte is om de dieren zelf een handeling te laten starten, kan het praktischer zijn om deze stappen over te slaan.

Protocol a - gebruikt bij de onderwijssdieren		Protocol b - gebruikt bij de onderzoeksdieren	
Niveau	Beschrijving	Niveau	Beschrijving
1.	Het dier moet een aangeboden platform benaderen	1.	Het dier moet accepteren dat de kop en schouders licht vastgehouden worden (niet wegtrekken)
2.	Het dier moet op het aangeboden platform gaan zitten	2.	Het dier moet accepteren dat de kop en schouders licht vastgehouden worden en dat een canule voor orale toediening in de bek wordt geplaatst
3.	Het dier moet op het aangeboden platform gaan zitten en een canule voor orale toediening met de snuit aanraken	3.	Het dier moet accepteren dat de kop en schouders licht vastgehouden worden en dat een canule voor orale toediening tot voorbij de slikreflex wordt ingebracht
4.	Het dier moet op het platform gaan zitten, de canule voor orale toediening met de snuit aanraken, en een lichte aanraking net achter de kop accepteren (niet wegtrekken)		
5.	Het dier moet op het platform gaan zitten, de canule voor orale toediening met de snuit aanraken en accepteren dat de kop en schouders licht vastgehouden worden (niet wegtrekken)		
6.	Het dier moet op het platform gaan zitten, accepteren dat de kop en schouders licht vastgehouden worden en de canule voor orale toediening tot ver in de bek ingebracht wordt		
7.	Het dier moet op het platform gaan zitten, accepteren dat de kop en schouders licht vastgehouden worden en de canule voor orale toediening tot voorbij de slikreflex ingebracht wordt		

Tabel 1. Overzicht van de trainingsprotocollen gebruikt bij het trainen van ratten op orale toediening. Links (protocol a) het protocol zoals gebruikt bij de onderwijssdieren en rechts (protocol b) het protocol zoals gebruikt bij de onderzoeksdieren.

Beloningen

Op dit moment hebben we ervaring met grofweg twee verschillende typen beloning: voerbeloningen en positief hanteren als een beloning. Voor een lekkere voerbeloning zijn de meeste ratten en muizen zeer bereid te werken, mits ze de beloningen kennen. Ratten, muizen en ook de meeste andere knaagdieren kunnen erg neofob zijn – angstig voor nieuwe dingen. Ze accepteren een nieuwe voerbeloning daarom meestal niet direct. Bij ons duurde dat soms tot wel twee dagen (waarbij de beloning meerdere keren werd aangeboden). Uiteindelijk leerden de dieren echter dat nieuw eten niet gevaarlijk was en accepteerden ze een divers palet aan voerbeloningen: komkommers, 'yoghurt drops' uit de dierenwinkel, sucrosepellets, banaan,



Afbeelding 1. Foto's van een getrainde rat op enkele verschillende niveaus van training op orale gavage.

- a: niveau 2; het dier moet op het aangeboden platform gaan zitten en krijgt vervolgens een beloning.
- b: niveau 3; het dier moet op het aangeboden platform gaan zitten en een canule voor orale toediening met de snuit aanraken.
- c: niveau 4; het dier moet op het platform gaan zitten, de canule voor orale toediening met de snuit aanraken, en een lichte aanraking net achter de kop accepteren (niet wegtrekken).
- d: niveau 7; orale gavage: het dier moet op het platform gaan zitten, accepteren dat de kop en schouders licht vastgehouden worden en de canule voor orale toediening tot voorbij de slikreflex ingebracht wordt.

pindakaas en nog veel meer. Let bij het uitproberen van nieuwe beloningen wel op dat de beloningen geen gevaar voor de dieren mogen opleveren. Pindakaas bijvoorbeeld is kleverig en dik, en te veel kan ertoe leiden dat het dier stikt. Wij verdunnen de pindakaas met water en gaven steeds maar minimale hoeveelheden om dit te voorkomen.

Uiteraard moet men er ook zeker van zijn dat de dieren niet allergisch reageren op de beloningen, en afhankelijk van de hygiëne-barrières waarmee wordt gewerkt, moeten de beloningen gesteriliseerd kunnen worden.

Daarnaast is het van belang dat de uitleesparameters van een studie niet kunnen worden beïnvloed door de beloning. Wanneer dat wel het geval is, kan het nodig zijn om een andere voerbeloning te selecteren of te gaan werken met een ander type beloning. Zoals genoemd hebben wij ook ervaring met positief hanteren als een beloning. Wanneer voerbeloningen om de een of andere reden niet mogelijk zijn, kan dit een mooi alternatief zijn.

Houd er wel rekening mee dat aanrakingen door mensen door de meeste ratten en muizen initieel niet als iets positiefs gezien zullen worden. De dieren zullen tijd nodig hebben om aan deze handelingen te wennen en om er een positieve associatie mee te krijgen. Wanneer hier goed de tijd voor genomen wordt zal je merken dat de dieren het fijn vinden om gekriebeld te worden, waarbij je vaak ziet dat ze tegen je vingers aanleunen, de ogen wat sluiten en ontspannen blijven zitten. Bij zowel muizen als ratten was het duidelijk dat de wang en achter het oor de fijnste kriebelplekjes waren. Muizen hadden wel meer tijd nodig om aan deze handeling te wennen: waar ratten aan een week met elke dag een sessie van vijf minuten genoeg hadden, was er bij de muizen 1,5 week nodig (ca. drie extra sessies).

Tot slot

Met het delen van onze ervaringen op het gebied van trainen van kleinere proefdieren hopen we te laten zien wat de mogelijkheden zijn. Wij gaan dan ook zeker door met dit werk om onze trainingsprotocollen te verbeteren en onderzoek te doen naar de effecten van training op het welzijn van de dieren. Tot nu toe hebben we slechts met een beperkt aantal stammen gewerkt: Wistar-ratten (CrI:WI(WU)), C3H/HeOJ-muizen en C57BL6J-muizen. Uiteraard kan het zijn dat de ene stam makkelijker te trainen is dan de andere stam – dit is iets wat in de toekomst uitgezocht zal moeten worden. Ook zal er gekeken moeten worden naar mogelijke geslachtsverschillen – tot dusver hebben wij deze alleen bij de onderwijsratten kunnen bekijken. Mannen initieerden een training veel sneller dan vrouwen en waren uiteindelijk ook sneller getraind. Bij het trainen op invasieve handelingen zal een dier nooit volledig vrijwillig meewerken aan de handeling. Wij merkten bijvoorbeeld dat er bij het trainen voor orale gavage aan het einde toch weerstand was bij de dieren wanneer de orale canule voorbij de slikreflex ging. Dit leek niet minder te worden naarmate de handeling vaker werd herhaald. Dieren ervaren dus waarschijnlijk altijd een bepaalde mate van stress bij dit soort handelingen, zeker ook wanneer bijvoorbeeld de toegediende stof voor aversie zorgt, bijvoorbeeld doordat de dieren zich niet lekker gaan voelen. Toch leek het trainen te helpen bij het reduceren van stress bij de handelingen waarop we trainden, zeker ten opzichte van methoden waarbij de dieren volledig gefixeerd dienden te worden. Onze getrainde onderwijsratten bijvoorbeeld, vocaliseerden veel minder dan niet getrainde dieren bij de orale gavage. Ook lieten ze na afloop van de handeling minder stressgerelateerd gedrag zien (verstarren/freezing) en zochten ze vrijwel meteen weer contact met de onderzoeker die de handeling had uitgevoerd. Bij de onderwijsmuizen die waren getraind voor het ondergaan van een subcutane injectie zagen we vergelijkbare verschillen. Hierbij moet wel vermeld worden dat bij de onderwijsdieren uitsluitend fysiologisch zout toegediend werd, en er dus op de substantie zelf weinig tot geen aversieve reacties verwacht konden worden. Hoe substanties die wel aversieve reacties op kunnen wekken deze resultaten zouden kunnen beïnvloeden, dient nog onderzocht te worden. Ondanks dat trainen van invasieve handelingen, zoals injecties of orale gavage, deze nooit stressvrij kan maken, kan het de handelingen zeker verfijnen. Mits het binnen de studie past qua tijd en planning (trainen is vooral nuttig voor handelingen die vaker herhaald moeten worden), kan het daarom de moeite waard zijn om het toepassen van training binnen dierexperimenten, ook voor ratten en muizen, in ieder geval te overwegen.

Bron

1. RISE Research Institutes of Sweden (2021).
3R - Refinement in focus at RISE.

