

Principii în eutanasia animalelor de laborator folosite în cercetarea medicală

Guidelines for euthanasia of laboratory animals used in biomedical research

Adina Baiaș, Romeo T. Cristina, Viorica Chiurciu

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

Cuvinte cheie: eutanasiere, dioxid de carbon, barbiturice

Keywords: euthanasia, carbon dioxide, barbiturates

Rezumat

Animalele de laborator sunt folosite în cercetarea din mai multe domenii ale științei, dar, mai ales în biologie, medicină și medicină veterinară. Majoritatea animalelor de laborator ce iau parte la cercetări sunt folosite ca modele experimentale pentru a înlocui corpul uman în cercetările privind siguranța produselor farmacologice sau biologice, în studii realizate pentru mai bună cunoaștere a proceselor oncologice, toxicologice, genetice sau chiar a tehnicilor chirurgicale. Protocoalele experimentale includ etapa în care animalele sunt eutanasiate, fie pentru a preleva organe și țesuturi, fie pentru a nu supune animalele la durere și suferință inutilă (humane endpoints), fie pentru a marca terminarea experimentului. Tehnicile de eutanasiere au ca rezultat pierderea rapidă a cunoștinței urmată de stop cardiac, stop respirator și încetarea funcției cerebrale. În prezent sunt acceptate ca tehnici de eutanasiere folosirea mijloacelor chimice (inhalarea de dioxid de carbon, de azot sau de argon, injectarea cu supradoze de anestezice) sau mijloace fizice (decapitarea, dislocarea cervicală, asomarea, împușcarea cu glonț liber sau utilizarea tijelor perforante). Indiferent de metoda folosită trebuie respectate principiile deontologice ale medicinei veterinare.

Abstract

Laboratory animals are used in several fields of science research, especially in biology, medicine and veterinary medicine. The majority of laboratory animals used in research are experimental models that replace the human body in study regarding pharmacological or biological safety products, studies conducted for a better understanding of oncologic processes, toxicology, genetic studies or even new surgical techniques. Experimental protocols include a stage in which animals are euthanized in order to remove organs and tissues, or for no unnecessary pain and suffering of animals (humane endpoints) or to mark the end of research. The result of euthanasia techniques is a rapid loss of consciousness followed by cardiac arrest, respiratory arrest and disruption of brain activity. Nowadays, the accepted euthanasia techniques can use chemicals (inhalant agents like: carbon dioxide, nitrogen or argon, overdoses of injectable anesthetics) or physical methods (decapitation, cervical spine dislocation, stunning, gunshot, pitching).

Eutanasierea este o etapă necesară și planificabilă la sfârșitul unui protocol experimental sau este o modalitate de a înceta durerea și suferința ce nu pot fi alinate cu ajutorul analgezicelor, sedativelor sau a altor procedee terapeutice.

Termenul de *eutanasiere* derivă din cuvintele grecești "eu" ce înseamnă "bine" și "thanatos" cu semnificația de "moarte".

O "moarte bună" ar fi o moarte care survine cu minimă durere și suferință [5].

Așadar, eutanasierea înseamnă folosirea unor procedee care permit suprimarea vieții urmate de moartea ușoară, lipsită de durere [2].

Tehnicile de eutanasiere trebuie să aibă ca rezultat o pierdere rapidă a cunoștinței urmată de stop cardiac sau stop respirator și în final încetarea funcției cerebrale. Suplimentar, tehnica trebuie să minimalizeze suferința și

anxietatea prin care trece animalul anterior pierderii cunoștinței.

Este cunoscut faptul că nu întotdeauna se poate ajunge la absența durerii și a suferinței [5, 6].

Alegerea celei mai potrivite metode de eutanasiere depinde de: specie, numărul animalelor, criteriile economice și aparatura disponibilă [6].

Indiferent de metoda folosită trebuie respectate principiile deontologice ale medicinei veterinare.

Caracteristicile unei tehnici eficiente și ideale de eutanasiere sunt:

- Să nu provoace anxietate, reacție de alarmă, teamă, vocalize, spasme musculare sau semne clinice evidente;
- Să nu provoace durere;
- Să acționeze rapid;
- Să fie eficientă;

- Să fie sigură;
- Să fie ușor de aplicat de către personal specializat;
- Să fie acceptabilă estetic;
- Să fie practică;
- Să fie economică;
- Să nu polueze mediul;
- Să nu cauzeze distrugerii tisulare [1].

Mijloacele folosite în eutanasia animalelor de laborator sunt fie de natură chimică (inhalatorie sau medicamentoasă), fie de natură fizică (tabel 1).

Directiva 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice recomandă mai multe mijloace de eutanasia pentru animalele folosite în cercetări (tabel 2).

Dioxidul de carbon

Aerul atmosferic conține în proporție de 0,04% dioxid de carbon (CO₂), care este mai greu decât aerul și aproape inodor.

Inhalarea de CO₂ la o concentrație de 7,5% reduce pragul durerii și are un efect anestezic rapid.

La concentrații de 30-40% CO₂ în oxigen, anestezia este indusă în decurs de 1-2 minute, de obicei fără a provoca greață sau vomă animalului. Semnele unei anestezii puternice eficiente cu CO₂ sunt asemănătoare cu cele provocate de anestezia profundă chirurgicală, precum pierderea reflexelor palpebrale [5].

La pisici, inhalarea de CO₂ în concentrație de 60% provoacă pierderea cunoștinței în 45 de secunde și stopul cardiac se instalează în cinci minute.

Dioxidul de carbon este folosit cu succes în eutanasia grupurilor de animale mici de laborator, cum sunt șoarecii, șobolanii, cobaii, găinile sau iepurii [8].

Unele studii efectuate arată că inhalarea de concentrații mari de CO₂ determină suferință fizică animalelor, precum iritarea mucoasei nazale datorată dizolvării gazului în mediul umed.

La șobolani, expunerea la concentrații de 33% CO₂ timp de un minut nu produce stres animalelor, neobservându-se creșteri ale concentrațiilor serice de corticosteron sau glucoză. Studii realizate asupra puilor de o zi au relevat faptul că CO₂ este un agent eficient de eutanasia. Inhalarea de CO₂ a indus moarte păsărilor în timp de cinci minute, prin suprimarea activității nervoase. Respirația începe încă din timpul dezvoltării embrionare, când CO₂ are o concentrație de 14%.

De aceea, concentrațiile de CO₂ folosite pentru eutanasia animalelor nou născute și a puilor în primele zile de viață trebuie să fie mult mai mari. S-a constatat că este eficientă o concentrație de 60-70% CO₂, timp de cinci minute [5].

Dioxidul de carbon se folosește în spații special destinate pentru eutanasia animalelor de laborator.

Avantaje:

- Efectele deprimante, analgezice și anestezice ale CO₂ sunt bine stabilite.
- Dioxidul de carbon nu este scump, este neinflamabil, neexploziv și prezintă risc redus pentru personalul ce efectuează eutanasia, dacă se utilizează echipament adecvat.

Dezavantaje:

- Deoarece CO₂ este mai greu decât aerul, umplerea incompletă a unei camere de eutanasia permite animalelor să își ridice capul și la concentrații mai mari și să evite astfel expunerea la acest agent.

Recomandări:

Dioxidul de carbon este un agent inhalant folosit frecvent pentru eutanasia rozătoarelor folosite în cercetarea medicală.

Sursa recomandată de CO₂ este sub formă comprimată în cilindri, deoarece se poate controla cu precizie aportul de gaz în camera de eutanasiere. Pentru un singur animal în cameră, rata optimă trebuie să fie de cel puțin 20% din volumul camerei/minut.

Pierderea cunoștinței este indusă mai rapid fie prin expunerea animalelor la o concentrație de 70% CO₂, fie prin preumplerea camerei de eutanasiere cu CO₂.

După moartea aparentă a animalelor, gazul trebuie menținut încă un minut în spațiul respectiv [5].

Tabel 1.

Mijloace utilizate în eutanasia animalelor de laborator

Chimice	Fizice
Dioxid de carbon	Decapitare
Gaze inerte (Ar, N ₂)	Dislocare cervicală
Supradoză de anestezic (derivați barbiturici)	Asomare
	Împușcare cu glonț liber cu ajutorul unor carabine
	Tijă perforantă

Înainte de a realiza eutanasia este important să se recunoască simptomele fricii, suferinței, stresului, care sunt specifice fiecărei specii și care se manifestă prin încercarea de a evada din cușcă, agresivitate,

imobilitate posturală, urinare și defecare. Prin urmare, animalele nu trebuie să fie în aceeași încăpere cu animalele ce urmează să fie eutanasiate, mai ales dacă sunt din aceeași specie. De obicei, tehnica de eutanasiere cere o contenționare fermă a animalelor, tocmai pentru a le reduce durerea, frica, suferința și anxietatea.

Adesea, manipularea cu grijă și blândețe a animalelor are un efect de liniștire [3, 8].

Mijloacele chimice folosite în eutanasia animalelor de laborator folosesc tehnici inhalatorii (dioxid de carbon, azot sau argon) sau administrarea de produse medicamentoase (derivați ai acidului barbituric).

Tabel 2.

Metode recomandate de eutanasiere, în funcție de specia de animale folosite în cercetare, conform Directivei 2010/63/UE

Specia	Metoda de eutanasiere
Pești	supradoză de anestezic, asomare
Amfibieni	supradoză de anestezic, asomare
Reptile	supradoză de anestezic, tijă perforantă, împușcare*
Păsări	supradoză de anestezic, dislocare cervicală, decapitare, asomare
Rozătoare	supradoză de anestezic, dioxid de carbon, dislocare cervicală, decapitare
Iepuri	supradoză de anestezic, dislocare cervicală, decapitare
Câini, pisici, dihorni, vulpi	supradoză de anestezic, asomare, împușcare*
Mamifere mari	supradoză de anestezic, asomare, gaze inerte, împușcare*
Primate neumane	supradoză de anestezic

* Se utilizează numai în condiții de teren, de către trăgători experimentați, atunci când alte metode nu sunt disponibile

Azotul și argonul

Azotul (N₂) și argonul (Ar) sunt gaze incolore, inerte, neinflamabile și neexplozive.

Azotul reprezintă 78% din aerul atmosferic, în timp ce argonul are o pondere mult mai mică, doar 1% în atmosferă.

Eutanasia este indusă prin plasarea animalului într-o cameră de eutanasiere după ce aceasta a fost pre-umplută cu azot sau argon sau în care se introduce rapid gazul.

Raportul N₂/Ar înlocuiește oxigenul, inducând moartea prin hipoxie [5, 8].

Directiva 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice permite folosirea azotului și argonului în eutanasia suinelor.

Studiile efectuate pe porci au arătat că tolerează respirarea unui aer ce are în compoziție 90% Ar și 2% O₂.

Avantaje:

- Azotul și argonul sunt disponibile sub formă de gaze comprimate.
- Riscul expunerii personalului e minim.

Dezavantaje:

- Pierderea cunoștinței este precedată de hipoxie și stimularea ventilației, ceea ce poate provoca suferință animalului.
- Restabilirea unei concentrații scăzute de O₂ (ex. 6% sau mai mult) în camera de eutanasiere influențează negativ procedeul.

Recomandări:

Această tehnică este folosită doar în eutanasierea porcilor.

Derivații acidului barbituric

Barbitalul și fenobarbitalul au fost primele barbiturice folosite în medicină pentru anestezie. Acțiunea principală a substanțelor barbiturice se manifestă asupra sistemului nervos central pe care îl depresează.

Gradul de depresie depinde de doză, timpul necesar manifestării efectului, durata de acțiune și metoda de administrare.

Barbituricele reduc aportul de oxigen la nivelul creierului cu până la 55%, încetinind transmiterea impulsului nervos [2].

În caz de supradoză, anestezia profundă progresează până la apnee, depresia centrului respirator, urmată de stop cardiac.

Toate derivatele acidului barbituric folosite pentru anestezie sunt acceptabile în cazul eutanasiilor atunci când sunt administrate intravenos.

Debutul acțiunii lor este rapid și pierderea cunoștinței indusă de barbiturice are ca rezultat o durere minimă sau trecătoare, atunci când este asociată cu venopunctura [8].

Avantaje:

- Un prim avantaj al barbituricelor este reprezentat de viteza de acțiune. Acest efect depinde de doză, concentrație, calea de administrare și rata injectării.
- Barbituricele induc ușor eutanasia, cu un minim disconfort pentru animal.
- Barbituricele sunt mai ieftine decât alți agenți de eutanasiere.

Dezavantaje:

- Injectarea intravenoasă este necesară pentru a obține cele mai bune rezultate și aceasta necesită personal calificat.
- Fiecare animal trebuie conționat.
- Trebuie respectată legislația în vigoare referitoare la folosirea barbituricelor.
- La animalele inconștiente poate apărea un gâfâit terminal inestetic.

Recomandări:

- Avantajele folosirii barbituricelor în eutanasia animalelor mici sunt de departe mai importante decât dezavantajele.
- Injectarea intravenoasă a derivaților acidului barbituric constituie metoda preferabilă în eutanasia animalelor de laborator.
- Injectarea intraperitoneală poate fi folosită în situațiile în care o injecție intravenoasă nu se poate realiza.

Tabel 3.

Calea de administrare a unor agenți medicamentoși folosiți în eutanasia speciilor de animale folosite frecvent în cercetare

Specia	Șoarece	Șobolan	Hamster	Cobai	Iepure	Pisică	Câine
Supradoză de pentobarbital de sodiu	A(i.p.)	A (i.p.)	A (i.p.)	A (i.p.)	A (i.p.; i.v.)	A (i.p.; i.v.)	A (i.p.; i.v.)
Supradoză de ketamină	A (i.m.,i.p.)	A (i.m.,i.p.)	A (i.m.,i.p.)	A (i.m.,i.p.)	A (i.m.,i.p.)	A (i.m.,i.p.)	A (i.m.,i.p.)
Supradoză de cloralhidrat	NR	NR	NR	NR	A (i.v)	A (i.v)	A (i.v)
Supradoză de thiopental de sodiu	A (i.p.)	A (i.p.)	A (i.p.)	A (i.p.)	A (i.v.)	A (i.v.)	A (i.p.)

Legenda: A, metodă acceptată, NR, metodă nerecomandată, i.p., intraperitoneal, i.m., intramuscular, i.v., intravenos

Agenți de eutanasiere care conțin compuși ai pentobarbitalului

Câteva produse pentru eutanasiere sunt formulate special, conținând un derivat al acidului barbituric (de obicei, pentobarbitalul de sodiu), agenți anesteziante sau agenți care metabolizează pentobarbitalul.

Deși unii dintre acești aditivi sunt slabi cardiotoxici, efectul farmacologic este inconsecvent [5, 8].

Proprietățile farmacologice și recomandările referitoare la asociațiile folosite, precum combinarea produselor ce conțin pentobarbital de sodiu cu lidocaină sau fenitoină nu se pot schimba cu cele ale derivaților puri ai acidului barbituric.

O combinație de pentobarbital cu un agent blocant muscular nu este acceptabil ca agent de eutanasiere [8].

Pentobarbitalul de sodiu

Se găsește în soluții cu o concentrație de 60 mg/ml. În eutanasierea animalelor mici de laborator (șoareci, șobolani, cobai sau hamsteri) se recomandă aplicarea lui prin injecție intraperitoneală. În eutanasierea șoarecilor și a șobolanilor se folosește în doză de 10-15 mg/100g greutate corporală, iar pentru cobai și hamsteri în doză de 90 mg/kg.

Pentobarbitalul de sodiu administrat peritoneal în concentrație mai mare de 350-400 mg/ml produce iritarea peritoneului,

implicat și durere animalului, datorită alcalinității crescute a soluției [8].

Pentobarbitalul de sodiu la iepuri se folosește în doză de 60 mg/kg administrat intravenos sau intraperitoneal.

La **câini și pisici** doza de pentobarbital de sodiu este de 150 mg/kg în administrare intravenoasă sau intraperitoneală [8].

În eutanasierea animalelor de laborator, ketamina, thiopentalul de sodiu se folosesc în doză de cinci ori mai mare decât doza folosită pentru anestezie [8].

Cloralhidratul

Cloralhidratul deprimă încet creierul, ca atare, conținutul poate reprezenta o problemă la animalele de talie mare. Moartea este produsă prin hipoxie, ca rezultat al depresiei centrului respirator și poate fi precedată de spasme musculare și vocalizări [8].

Recomandări:

- Cloralhidratul este condiționat acceptabil pentru eutanasierea animalelor mari numai administrat intravenos și numai după sedarea animalului.

- Nu este acceptat ca agent medicamentos eutanasiant la șoarece, șobolan, hamster și cobai.

Metode fizice de eutanasiere

Metodele fizice de eutanasiere a animalelor de laborator includ: dislocarea cervicală,

decapitarea, asomarea electrică, tija perforantă și împușcarea. Unele dintre aceste metode cauzează mai puțină teamă sau anxietate, dar unele dintre ele sunt mai rapide sau nu provoacă durere decât alte forme de eutanasiere.

Decapitarea

Decapitarea este cea mai frecventă metodă în eutanasierea rozătoarelor și a iepurilor. Această metodă asigură recuperarea țesuturilor și a lichidelor corporale fără a fi contaminate chimic.

În cazul cercetărilor pe sistem nervos central furnizează țesutul cerebral nedistrus anatomic. Deși s-a demonstrat că activitatea cerebrală persistă timp de 13-14 secunde după decapitare, studii recente au indicat faptul că această activitate nu interferează cu capacitatea de a simți durerea ci cu pierderea rapidă a conștiinței [5, 7, 8].

Pentru a realiza decapitarea se folosesc ghilotine care realizează decapitarea uniform și rapid (fig.1).

Avantaje:

- Decapitarea este o tehnică ce asigură pierderea rapidă a conștiinței.
- Nu contaminează chimic țesuturile.
- Se realizează rapid.

Dezavantaje:

- Manipularea și contenția necesară pot provoca suferință animalelor.
- Interpretarea prezenței activității cerebrale după decapitare creează o serie de controverse.
- Personalul care execută această tehnică trebuie să cunoască riscul inerent al ghilotinei și să ia măsuri de precauție.
- Decapitarea poate fi neplăcută estetic pentru personalul ce execută tehnica.

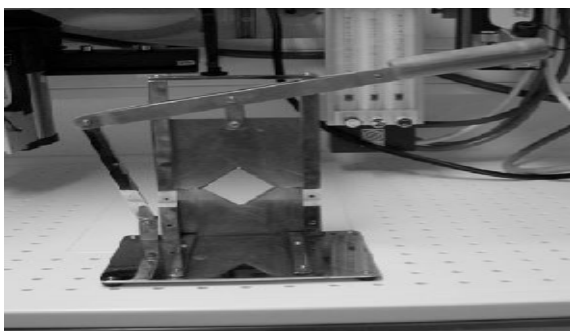


Fig.1. Decapitare (model de ghilotină)
Sursa: Aurora Brønstad, Euthanasia of laboratory animals - killing

Dislocarea cervicală

Dislocarea cervicală se folosește în eutanasierea păsărilor, a rozătoarelor și a

iepurilor tineri. Pentru șoareci și șobolani, degetul mare și arătătorul trebuie plasate pe fiecare parte a gâtului sau alternativ se poate folosi presiunea unei tije la baza craniului.

Cu cealaltă mână, baza cozii sau membrele posterioare se trag repede producând separarea vertebrelor cervicale de craniu (fig. 2).

Această tehnică nu se poate folosi rozătoarele care au o greutate mai mare de 200 g.

La **cobai și hamsteri** tehnica se realizează dificil datorită structurii anatomice diferite: gât scurt și structura osoasă acoperită de o masă de mușchi bine dezvoltată.

Pentru iepurii tineri, capul este ținut cu o mână și membrele posterioare cu cealaltă. Animalul este întins și capul este hiperextins și răsucit dorsal pentru a separa prima vertebră cervicală de craniu.

La păsări, dislocarea cervicală prin întindere reprezintă o metodă comună de eutanasiere în masă, dar pierderea cunoaștinței poate să nu fie instantanee [5, 7, 8].

Avantaje:

- Dislocarea cervicală este o tehnică ce permite pierderea rapidă a cunoaștinței.
- Nu contaminează chimic țesuturile.
- Se realizează rapid.

Dezavantaje:

- Dislocarea cervicală poate fi neplăcută estetic pentru personal.
- Persistența activității cerebrale după dislocarea cerebrală.
- Se folosește doar la păsări, rozătoare și iepuri tineri.

Recomandări:

- Dislocarea cervicală manuală reprezintă o tehnică umană de eutanasiere a puilor, păsărilor, șoarecilor, șobolanilor ce cântăresc mai puțin de 200 g și a iepurilor sub 1 kg. La animalele care au masa musculară mai bine dezvoltată în regiunea cervicală dislocarea cervicală manuală e mai dificilă [4].

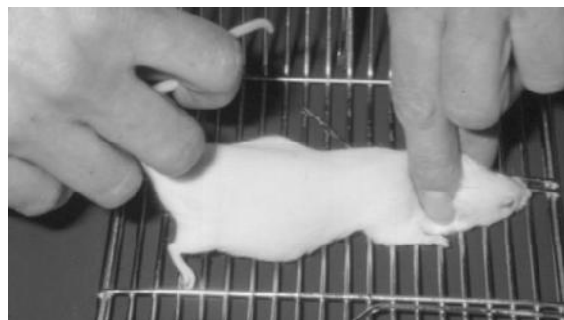


Fig.2. Dislocare cervicală
Sursa: Aurora Brønstad, Euthanasia of laboratory animals - killing

Asomarea

Ca metodă de eutanasiere, asomarea poate fi folosită pentru eutanasierea peștilor, amfibienilor, iepurilor, câinilor, pisicilor, dihorilor sau a mamiferelor mari folosite în cercetările științifice.

Asomarea se realizează fie prin lovire la nivelul capului, prin folosirea unui bolț nonpenetrant, fie prin utilizarea curentului electric. Asomarea trebuie urmată de dilatare pupilară, răspuns de clipire și pierderea coordonării mișcărilor [5].

Asomarea prin lovire la nivelul capului se folosește la animalele de laborator ce au craniul subțire.

Bolțul captiv nonpenetrant este folosit pentru a induce pierderea cunoștinței la mamiferele mari, iar asomarea electrică este utilizabilă în asomarea peștilor și amfibienilor [7].

Asomarea electrică efectuată la câini, pisici sau dihori trebuie obligatoriu urmată de metode care să inducă fibrilație cardiacă și moartea animalelor [4].

Împușcarea

Împușcarea reprezintă o metodă de eutanasiere pentru reptile, mamifere mari, câini, pisici, dihori sau vulpi, dacă nu sunt disponibile alte tehnici.

Această tehnică trebuie realizată doar în condiții de teren și numai de către persoane bine pregătite și avizate în acest scop [5].

Avantaje:

- Pierderea cunoștinței este instantanee, dacă proiectilul distruge majoritar creierul.

Dezavantaje:

- Poate fi periculoasă pentru personal.
- Neplăcută estetic.
- În condiții de teren poate fi dificil să se ochească punctele vitale.

Recomandări:

Când nu se pot folosi alte metode, un foc de armă efectuat cu acuratețe poate reprezenta o metodă acceptabilă condiționat de eutanasiere.

Tija perforantă

În general, folosirea tije perforante, care secționează măduva spinării, este o tehnică prin care se eutanasiază un animal ce a devenit inconștient prin alte tehnici.

Pentru unele animale, precum broaștele, ce au caracteristici anatomice ce facilitează

accesul ușor la sistemul nervos central, metoda poate fi folosită ca unic mijloc de eutanasiere, dar o supradoză de anestezic reprezintă o metodă mai potrivită [5].

Eutanasierea animalelor folosite în cercetarea biomedicală este o etapă dificilă din punct de vedere emoțional pentru personalul veterinar și cercetătorii, deoarece tehnica este realizată frecvent și repetitiv și, uneori, personalul se atașează de animalele ce urmează a fi eutanasiate.

Totuși, manopera trebuie să fie realizată în cele mai bune condiții și prin mijloace adecvate, pentru a nu supune animalele la stres și suferință suplimentară.

Bibliografie

1. **Aurora Brønstad**, Euthanasia of laboratory animals – killing animals <http://www.uib.no/dyreavd/handouts/euthanasi.pdf>
2. **Cristina R. T.** (2006) - *Introducere în Farmacologia și Terapia Veterinară*, Solness, Timișoara, pp. 199-209
3. **Georgiana Tauser** (2003) - Bioethical principles concerning laboratory animals' use for biomedical research, *Revista Romana de Bioetica*, Vol. 1, no. 2
4. **Directiva 2010/63/UE** a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. L 276/34 *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*
5. **Hotărârea nr.19/01.07.2011** adoptată de către Consiliul Național al Colegiului Medicilor Veterinari din România. *Buletin Informativ*, 2011, nr.11, 9-53
6. **Guide For Ethical Evaluation of Experiments using Laboratory Animals (2009)**. Edited by: The Ministry of Higher Education and Research; The Ministry of Agriculture and Fisheries, GRICOR, France.
7. **Guidelines on Pain, Analgesia, Anaesthesia and Euthanasia in Common Laboratory Animals**. Prepared for the Animal Subjects Ethics Subcommittee of The Hong Kong Polytechnic University. http://www.lasec.cuhk.edu.hk/Guidelines/guidelines_on_pain_analgesia_anaesthesia_and_euthanasia_in_common_lab_animals
8. **Report of the AVMA Panel on Euthanasia** (1993). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202:229-249.