

FEEDING AND WATERING HYGIENE OF LABORATORY ANIMALS

Gordana Gregurić Gračner, Marija Vučemilo, Ž. Pavičić, D. Gračner, M. Ostović, Kristina Matković

Stručni članak - Professional paper
Primljeno - Received: 02. travanj - April, 2014.

SAŽETAK

Mnogi čimbenici mogu ugroziti dobrobit laboratorijskih životinja, a samim time i tijek i rezultate istraživanja u kojem se te životinje koriste. Dobrobit laboratorijskih životinja izravno ovisi o čovjeku, stoga se nužno temelji na načelu osiguravanja pet sloboda, osobitih za svaku vrstu. Među ostalim slobodama (od boli, povreda i bolesti, straha i stresa, neudobnosti i izražavanja vrsno specifičnog ponašanja), nabraja se i sloboda od gladi i žeđi. Ona se postiže osiguravanjem dovoljne količine kvalitetne hrane i vode ovisno o fiziološkim potrebama životinje, osim ukoliko protokol pokusa opravdano ne zahtijeva drugačije. Međutim, hrana, većinom komercijalnih proizvođača, osim s nutritivnog, mora biti visoke kakvoće i s higijenskog stanovišta, što znači da ne smije biti kemijski, fizički, parazitaro ili mikrobiološki onečišćena jer takva izravno ugrožava zdravlje životinja. Napajanje životinja tehnološki je iznimno složeno jer voda iz vodovoda, čak i ako udovoljava propisima o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće, nije sterilna kako zahtijevaju protokoli nekih pokusa. Nužno je redovito nadzirati vrijednost pH, tvrdoću vode te prisutnost mikrobiološkog ili kemijskog onečišćenja. Primjerena higijena hranjenja i napajanja laboratorijskih životinja značajan je čimbenik u očuvanju njihove dobrobiti, te može bitno utjecati na uspješnost provođenja pokusa i vjerodostojnost dobivenih rezultata.

Ključne riječi: hranjenje, napajanje, laboratorijske životinje, higijena

UVOD

Zdravstveni status životinje korištene u pokusu, a samim time i njihova dobrobit, ovisi o čimbenicima okoliša poput hrane, vode, stelje, svjetlosnog ciklusa, buke, vlažnosti zraka, temperature, kao i o interakciji držatelja sa životinjama. Oni mogu značajno utjecati na rezultate istraživanja, stoga moraju biti strogo nadzirani (Faith i Hessler, 2006.). Hrana i voda utječu na reprodukciju, rast i bolesti životinjskog organizma prilikom eksperimentalne manipulacije i na odgovor organizma na nju (Barnard i sur., 2009.). Sloboda od gladi i žeđi, kao jedan od temeljnih čimbenika u osiguravanju dobrobiti životinje, postiže se osiguravanjem dovoljne količine hrane i vode visoke kakvoće u količini koja ovisi o fiziološkim potrebama životinje, osim ako protokol pokusa opravdano ne zahtijeva drugačije.

HIGIJENA HRANJENJA

Hrana, većinom komercijalnih proizvođača, osim s nutritivnog mora biti visoke kakvoće i s higijenskog stanovišta, što znači da ne smije biti kemijski, fizički, parazitaro ili mikrobiološki onečišćena jer takva izravno ugrožava zdravlje životinja.

Nekoliko je tipova hrane kojom se hrane laboratorijske životinje i o njemu će često ovisiti i njena potencijalna zagađenost. Na primjer, hrana od prirodnih (nepročišćenih) sastojaka (eng. *Natural-ingredient diets*) sadrži poljoprivredne kulture ili njihove nusproizvode i, iako rijetko, može biti onečišćena manjim razinama zagađivača (rezidue pesticida, teških metala, otrova, kancerogenih tvari, fitoestrogena) (Anonym., 2011., Mikulec i sur., 2014.). S druge strane, pročišćena hrana (eng. *Purified diets*)

Doc. dr. sc. Gordana Gregurić Gračner, dr. med. vet., e-mail: ggracner@vef.hr; Prof. dr. sc. Marija Vučemilo, dr. med. vet., Prof. dr. sc. Željko Pavičić, dr. med. vet., Izv. prof. dr. sc. Damijan Gračner, dr. med. vet., Dr. sc. Mario Ostović, dr. med. vet., Doc. dr. sc. Kristina Matković, dr. med. vet.; Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb

sadrži definirani sastav komponenti koji se ne mijenja između pojedinih šarži hrane, a što je manje komponenti manja je mogućnost prisutnosti određenih kemijskih zagađivača (Anonym., 2011., Mikulec i sur., 2014.). Teško ju je uspješno peletirati, stoga je obično u praškastom obliku (Ševeljević-Jaran, 2014.) i za nju se koriste posebne hranilice (Vučinić i sur., 2010.). Kemijski definirana hrana (eng. *Chemically defined diets*) sadrži elementarne sastojke, kao što su pojedinačne aminokiseline ili specifični šećeri, a manje su varijacije u sastavu moguće zbog kemijskih procesa tijekom skladištenja (Anonym., 2011., Mikulec i sur., 2014.). Pri naručivanju hrane za laboratorijske životinje bitno je od koga se ona naručuje, kao i kakva je procedura skladištenja, kontrole štetočina, baratanja njome u proizvođača i dobavljača stoga što, između ostalog, i o tome ovisi njena kakvoća. Poštivanje propisanih procedura u navedenim postupcima s hranom u najvećoj mogućoj mjeri smanjuje mogućnost da hrana bude mikrobiološki i parazitaro onečišćena, da sadrži vektore određenih bolesti (kukce i druge štetočine), te kemikalije. Veću količinu hrane dobro je naručiti od istog proizvođača (Anonym., 2011.). Isto tako, naručitelj bi trebao zatražiti podatke o nutrijentima i mogućim kontaminantima od proizvođača, ili pak u vlastitoj instituciji razviti program osiguravanja kvalitete (Barnard i sur., 2009.). Institucija bi, također, trebala poticati prodavatelje hrane da joj u određenim razdobljima dostave podatke temeljene na laboratorijskim analizama kritičkih nutrijenata (Anonym., 2011.). Naime, bilo bi idealno kada bi svi sastojci pojedinačno bili testirani u tvornici hrane prije no što bi se koristili u pripravi konačne smjese. Kakvoća sastojaka, primjerice, može varirati u količini sadržane vlage, plijesni, vrsti i količini mikroba te infestaciji kukcima (Barnard i sur., 2009.).

Onečišćivači u hrani mogu značajno utjecati na biokemijske i fiziološke procese, a negativno na rezultate pokusa čak i ako su prisutni u koncentraciji suviše niskoj da bi uzrokovali kliničke znakove trovanja (Newberne, 1975., Ames i sur., 1993.).

Isto tako, naručitelj bi trebao biti upoznat s datumom proizvodnje hrane kao i s ostalim čimbenicima koji bi mogli utjecati na njenu trajnost (Anonym., 2011.). Prilikom dostave hrane trebalo bi pregledati svaku vreću kako bi se utvrdila moguća oštećenja, odnosno da li je sadržaj vreće mogao biti izložen štetočinama, prodoru tekućina ili zagađivača. Prvo

treba potrošiti već prije uskladištenu hranu, a tek potom novopristiglu (Anonym., 2011.).

Prostoriju u kojoj se hrana pohranjuje treba održavati čistom te onemogućiti ulaz štetočinama (Anonym., 2011.), a u njima, kao i u prostorijama u kojima se drže životinje i skladišti stelja i hrana ne bi se smjelo primjenjivati pesticide (Huerkamp, 2013.). Ako su ta sredstva ipak korištena u blizini životinja, hrane ili stelje, o tome istraživači moraju biti obaviješteni (Huerkamp, 2013.). Relativno inertne supstance poput silica aerogela su preporučljive i korisne su za suzbijanje pužajućih kukaca poput, primjerice, žohara (Huerkamp, 2013.).

Vreće u kojima je hrana treba skladištiti u plastičnim ili metalnim kantama (Vučinić i sur., 2010.), ne bi smjele biti položene na sam pod već se pohranjuju na palete, stalaže i kolica radi lakšeg čišćenja prostorije. Već otvorena hrana trebala bi biti držana u kontejnerima koji se mogu dobro zatvoriti kako bi se spriječilo onečišćenje patogenim mikroorganizmima te pristup štetočinama (Anonym., 2011.), a kontejneri ne bi smjeli biti smješteni pokraj otpada i kemikalija. Na njima treba pisati koja je vrsta hrane unutra i rok trajanja. Treba ih barem jednom tjedno čistiti i jednom mjesečno prati. Isto tako, ne bi smjeli biti premješteni iz prostorije u prostoriju bez prikladnog tretmana čišćenja, pranja i dezinfekcije.

Količina hrane držane u prostorijama gdje su i životinje trebala bi dostajati za najviše dva dana (Vučinić i sur., 2010.).

Dodatna sterilizacija hrane u autoklavima ili pak korištenjem gama zraka smanjuje količinu pojedinih vitamina i antioksidansa u hrani i upravo je stoga najbolje nabavljati već steriliziranu hranu koja je već dodatno obogaćena sadržajem vitamina (Vučinić i sur., 2010.). Steriliziranu hranu treba držati u steriliziranim kontejnerima na kojima piše i datum sterilizacije i unatoč duljem roku trajanja trebalo bi je potrošiti u najkraćem mogućem roku (Anonym., 2011.).

Preporuča se skladištenje hrane na temperaturi oko 21°C i relativnoj vlazi oko 50% (Anonym., 2011.). Međutim, prema nekim izvorima, preporučena temperatura zraka u skladištima hrane trebala bi biti manja od 16°C (Vučinić i sur., 2010.). Izloženost hrane višim temperaturama skladištenja, previsokoj ili preniskoj relativnoj vlazi, nečistim prostorijama, kukcima i ostalim štetočinama ubrzava njeno pro-

padanje. Posebnu pozornost prilikom skladištenja treba obratiti na hranu koja sadrži kvarljive sastojke kao što su meso, voće i povrće i na neku specijalnu hranu (određenu ljekovitu hranu ili hranu s visokim udjelom masnoća) jer u tom slučaju način skladištenja izravno utječe na održavanje kakvoće (Anonym., 2011.). Ipak, zbog lake kvarljivosti uglavnom se ne preporuča hranjenje svježom biljnom hranom.

Većina hrane od prirodnih (nepročišćenih) sastojaka i pravilno uskladištena suha hrana za laboratorijske životinje ima rok trajanja šest mjeseci. Držanje hrane u hladnjaku očuvat će hranidbenu vrijednost i produžiti rok trajanja, međutim tako uskladištenu hranu ipak bi trebalo potrošiti u najkraćem mogućem roku. Pročišćena hrana i kemijski definirana hrana često je manje stabilna od hrane od prirodnih (nepročišćenih) sastojaka i ima rok trajanja manji od 6 mjeseci te bi trebala biti pohranjena na temperaturi od 4°C ili čak nižoj (Anonym., 2011.). Konzervirana hrana ima dulji rok trajanja, a rok trajanja sterilizirane hrane je do godinu dana (Vučinić i sur., 2010.).

Hranilice treba dizajnirati i postaviti tako da se omogući nesmetan pristup hrani uz minimalnu mogućnost njene kontaminacije urinom i fecesom te da ih se može lako održavati (Anonym., 2011.). Obično su učvršćene za vrata ili bočnu stranu kaveza (Vučinić i sur., 2010.). Životinje u pokusu, osim teško pokretnih životinja poput miševa bolesnih od mišićne distrofije, ne smiju biti hranjene rasipanjem hrane po podu, a rasutu hranu treba odmah pokupiti i ukloniti iz kaveza (Vučinić i sur., 2010.). Tek u iznimnim slučajevima se određenim životinjskim vrstama može rasuti izvjesna količina hrane po prostirci kako bi se zadovoljilo njeno istraživačko ponašanje ili potreba za rovanjem (Anonym., 2011.).

Ukoliko se životinje drže u skupini, a posebice kada su na restriktivnoj prehrani mora im se, osiguravanjem dovoljnog prostora uz hranilice, omogućiti neometan pristup hrani bez da se za nju natječu. Tako se ujedno i onemogućuje dominantnim životinjama da monopoliziraju hranilice (Anonym., 2011.).

Predugo ostavljena hrana u hranilicama navlači vlagu, kao i miris stelje i samim time životinje je odbijaju.

HIGIJENA NAPAJANJA

Životinje trebaju imati pristup pitkoj, zdravstveno ispravnoj vodi, prema svojim potrebama (Anonym., 2011.). Napajanje životinja tehnološki je iznimno složeno jer voda iz vodovoda, čak i ako udovoljava propisima o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće, nije sterilna kako zahtijevaju protokoli nekih pokusa. Isto tako, pitkost kao i kakvoća vode mogu ovisiti o geografskom području. U sklopu nadziranja kakvoće vode nužno je redovito provjeravati kiselost, tvrdoću te mikrobiološke i kemijske pokazatelje. To se posebno odnosi na vodu koja se koristi za napajanje životinja u istraživanjima u kojima uobičajeni sastojci vode na određenom geografskom području mogu utjecati na rezultate pokusa (Anonym., 2011.). Voda se, naravno, može kondicionirati prema zahtjevima protokola pokusa, međutim, kondicioniranje vode zakiseljavanjem, kloriranjem, reverznom osmozom, ultrafiltracijom i dezinfekcijom UV zrakama može oštetiti imunološki sustav laboratorijskih životinja, narušiti im mikrofloru, reducirati konzumaciju vode, usporiti rast životinja i tako narušiti tijek, kao i rezultate pokusa. Ovisno o vrsti životinja, za napajanje se mogu koristiti boce i automatizirani sustavi.

Boce za napajanje

Boce moraju odgovarati određenim kriterijima (trebaju biti prozirne, širokog grla i od materijala koji podnosi sterilizaciju). Uglavnom su izrađene od polisulfonatnih ili polikarbonatnih materijala i rutinski se peru i steriliziraju parom nakon čega se pune mikrobiološki i kemijski nekontaminiranom vodom (Ševeljević-Jaran, 2014.). Sadržaj im se ne bi smio dopunjavati, već bi se redovito trebalo postavljati novu sterilnu bocu sa svježom vodom. Ukoliko se ipak, koji slučajem, boce nadopunjavaju, treba osobitu pozornost posvetiti tome da se vrate na isti kavez s kojeg su i uzete (Anonym., 2011.). Jednom napunjene boce se hermetički zatvaraju metalnim čepom osiguranim sa silikonskim nutarnjim prstenom čime se sprječava nekontrolirano istjecanje vode. Otvori na čepovima boca mogu biti različitog oblika i duljina. Koji će biti primijenjen ovisi o zdravstvenom statusu životinje i njenoj veličini (Ševeljević-Jaran, 2014.). Boce i voda mijenjaju se najmanje dva puta tjedno čak i ukoliko nije popijena sva voda, a više od dva puta tjedno ako životinje piju češće no inače, npr. životinje koje imaju dijabetes (Baumans, 2007.).

Automatizirani sustavi za napajanje

Iako ekonomični, automatizirani sustavi teže se održavaju i mogu biti izvor mikrobiološkog onečišćenja te širenja infekcija. Nužno ih je, stoga, redovito provjeravati, servisirati, ispirati i dezinficirati, čime se posredno utječe i na kakvoću vode. Uspješnost provedene dezinfekcije, koju bi trebalo provoditi najmanje jednom tjedno, mora biti redovito provjeravana korištenjem prikladnih mikrobioloških pretraga, pretraga na određene organske tvari i slično (Huerkamp, 2013.).

Automatske pojilice, posebice prilikom držanja glodavaca, reduciraju troškove držanja, povećavaju sigurnost osoblja koje brine o životinjama, štede na radu, smanjuju uznemiravanje životinja i omogućavaju dotok vode visoke kakvoće (Huerkamp, 2013.). Međutim, životinje ponekad treba uvježbavati da koriste automatske pojilice, pri čemu ih treba nadzirati sve dok tehniku pijenja u potpunosti ne savladaju kako ne bi dehidrirale (Anonym., 2011.). Negativna strana korištenja automatskih pojilica kod glodavaca držanih u kavezima je u tome što se pri mogućim kvarovima ventila povećava rizik od pothlađivanja, utapanja i dehidracije (Baumans, 2007., Huerkamp, 2013.).

Napajanje pokusnih životinja tijekom prijevoza

Laboratorijske životinje u kavezima za prijevoz napajaju se vodom u obliku hidrogela, tj. mješavini vode i ugljikohidrata otpornoj na kontaminaciju bakterijama i plijesni (Ševeljević-Jaran, 2014.). Hranilice i sustavi napajanja trebaju biti izrađeni od čvrstog i neotrovnog materijala, otpornog na hrđu, čišćenje i postupke uobičajene u svakodnevnoj laboratorijskoj praksi koji ujedno neće ugrožavati zdravlje životinja, te tijekom i rezultate pokusa. To ujedno znači da navedena oprema ne smije imati oštre bridove ili kutove, te neke dodatke koji bi mogli ozlijediti životinju ili osobu koja njome barata. Stjenke moraju biti glatke, bez suvišnih kutova i preklapanja nekih površina kako se u tim teže dostupnim mjestima ne bi nakupljala prljavština, te kako bi čišćenje, pranje i dezinfekcija bili učinkoviti. Učestalost i intenzitet čišćenja, pranja i dezinfekcije opreme za hranjenje i napajanje ovise o tome koliko čist okoliš određena životinja i protokol pokusa zahtijevaju u smislu održavanja zdravlja i dobrobiti životinje, te nesmetanog tijeka pokusa. Navedenu bi opremu, ukoliko strogo nije navedeno drugačije, trebalo čistiti, prati i dezinficirati najmanje jednom tjedno. Nakon pranja, a prije dezinfekcije, površine bi trebalo osušiti. Dezinfekcija se potom provodi korištenjem kemikalija, vruće vode ili kombinacijom jednog i drugog. Detergente i kemikalije treba dobro isprati s tretirane površine. Učinak dezinfekcije vrućom vodom ovisit će o temperaturi vode i duljini njenog djelovanja na površine koje se dezinficiraju (Anonym., 2011.). Hranilice, hranu, sustave napajanja i vodu treba svakodnevno nadzirati te o nalazima voditi preciznu evidenciju, a moguće probleme procjenjivati prema nepovoljnom utjecaju na zdravlje životinja te ih što prije otklanjati.

LITERATURA

1. Ames, B. N., M. K. Shigenaga, T. M. Hagen (1993): Review: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1, 7915-7922.
2. Barnard, D. E., M. S. Lewis, B. B. Teter, J. E. Thigpen (2009): Open - and Closed-Formula Laboratory Animal Diets and Their Importance to Research. *J. Am. Assoc. Lab. Anim.* 48, 6, 709-713.
3. Baumans, V. (2007): The welfare of laboratory mice. *U: The Welfare of Laboratory Animals* (urednica: E. Kaliste). ©Springer. 119-152.
4. Faith, R., J. R. Hessler (2006): Housing and environment. *U: The laboratory rat* (urednici: Suckow, M. A., S. H. Weisbroth, C. L. Franklin). San Diego (CA): Academic Press. 303-337.
5. Huerkamp, M. (2013): Management of laboratory animals. *U: Merck Veterinary Manual*. Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J., U. S. A. Dostupno na: http://www.merckmanuals.com/vet/exotic_and_laboratory_animals/laboratory_animals/management_of_laboratory_animals.html
6. Mikulec, Ž., T. Mašek, D. Brozić (2014): Prehrana i dijetetika pokusnih životinja. *U: Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka*. Priručnik. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb. 53-68.
7. Newberne, P. M. (1975): Influence on pharmacological experiments of chemicals and other factors in diets of laboratory animals. *Fed. Proc.* 34, 2, 209-218.
8. Ševeljević-Jaran, D. (2014): Husbandry of Laboratory Mice and Rats. *U: Ivetić Tkalčević, V., B. Hrvačić, M. Dominis Kramarić, D. Ševeljević-Jaran, S. Čužić, K. Brajša: Laboratory Mice and rats in Biomedical Research. Rationale and Principles of Use.* 30-56.

9. Vučinić, M., S. Trailović, J. Nedeljković-Trailović (2010): Laboratorijske životinje. U: Eksperimentalne životinje i eksperimentalni modeli (urednici: Vučinić, M., i Z. Todorović). Univerzitet u Beogradu (Fakultet veterinarske medicine, Medicinski fakultet, Farmaceutski fakultet), str. 133-158.
10. ... (2011): Guide for the care and use of Laboratory animals. Eight edition: The National Academic Press, Washington, D. C. 65-67.

SUMMARY

Many factors can jeopardize the welfare of laboratory animals and thus the process and results of research in which these animals are used. Welfare of laboratory animals strictly depends on humans; therefore, it is necessarily based on the principles of providing five freedoms, distinctive for each type. Among other freedoms (from pain, injury and disease, fear and stress, discomfort, and finally expression of species specific behaviors), there is freedom from hunger and thirst. It is achieved by providing sufficient quantities of quality food and water depending on the physiological needs of the animal, unless justifiably required otherwise by the experimental protocol. However, the food, mostly obtained from commercial manufacturers, in addition to nutritional value must be of high quality and hygienic properties, which means that it must not be chemically, physically, parasitically or microbiologically contaminated because contaminated food can directly threaten animal health. Automated water delivery systems are extremely complicated because tap water, even if meeting the requirements of sanitary drinking water, is not sterile according to the protocols of some experiments. It is necessary to regularly monitor water pH, hardness and presence of microbial or chemical contamination. Appropriate feeding and watering hygiene of laboratory animals is an important factor in maintaining their welfare and can significantly influence the success of the experiment and validity of the results.

Key words: feeding, watering, laboratory animals, hygiene