ISSN 2072-2419

№ 2

Международный вестник ветеринарии

INTERNATIONAL BULLETIN OF VETERINARY MEDICINE

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ- 2015

www.gavm.spb.ru

Международный вестник ветеринарии 2.2015

Редакционный совет
А.А. Стекольников – гл. ред., член-корр. РАСХН, д.в.н., проф., СПб
В.Д. Соколов – зам. гл. ред. д.в.н. проф., СПб
А.И. Ятусевич – зам. гл. ред. д.в.н. проф., Витебск
Редакционная коллегия
А.А. Алиев, д.в.н., проф., СПб.
Н.Л. Андреева, д.б.н., проф., СПб.
Л.М. Белова, д.б.н., проф., СПб.
М.И. Гулюкин, акад. РАСХН, д.в.н., проф. Москва.
Н.В. Зеленевский, д.в.н., проф., СПб.
Л.Ю.Карпенко, д.б.н., проф., СПб.
С.П. Ковалев, д.в.н., проф., СПб.
А.А. Кудряшов, д.в.н., проф., СПб.
В.А. Кузьмин, д.в.н., проф., СПб.
М.Н. Макарова, д.м.н., проф., СПб.
К.В. Племяшов, д.в.н., проф., СПб.
Б.С. Семенов, д.в.н., проф., СПб.
А.М. Смирнов, акад. РАСХН, д.в.н., проф., Москва.
А.А. Сухинин, д.б.н., проф., СПб.
А.Н. Шиков, д.ф.н., проф., СПб.
Редакционно-технический отдел
В.Д. Соколов, д.в.н. проф., СПб.
Н.Л. Андреева, д.б.н., проф., СПб.
М.Н. Макарова, д.м.н., проф., СПб.
А.В. Рыбакова , к.в.н., СПб.
Сдано в набор 13.01.2016
Подписано к печати 13.01.2016
Формат 70×100 1/16.
Бумага глянцевая № 1. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 5,2+1,63 цв. вкл.
Усл. Кр.-отт. 18,2. Тираж 1001 экз.

Editor –in– chief
A.A. Stekolnikov professor, DVM, Corresponding Member of the Russian Academy of Agricultural Sciences
Managing Editor
V.D. Sokolov - professor, DVM, St. Petersburg
A.I. Yatusevich - professor, DVM, Vitebsk
Editorial Board
A.A. Aliyev - professor, DVM, St. Petersburg
N.L. Andreeva - professor, DBS, St. Petersburg
L.M. Belova - professor, DBS, St. Petersburg
M.I. Gulyukina - Academician of the Agricultural Russian Academy of Agricultural Sciences, DVM, professor, Moscow
N.V. Zelenevski - professor, DVM, St. Petersburg
L.Y. Karpenko - professor, DBS, St. Petersburg
S.P. Kovalev - professor, DVM, St. Petersburg

A.A. Kudryashov - professor, DVM, St. Petersburg
V.A. Kuzmin - professor, DVM, St. Petersburg
M.N. Makarova - professor, DBS, St. Petersburg .
K.V. Plemyshov - professor, DVM, St. Petersburg
B.S. Semenov - professor, DVM, St. Petersburg
A.M. Smirnov - Academician of the Agricultural Russian Academy of Agricultural Sciences, DVM, professor, Moscow
A.A. Sukhinin - professor, DVM, St. Petersburg
A.N. Shikov - professor, DFS, St. Petersburg
Technical Department
V.D. Sokolov - professor, DVM, St. Petersburg
N.L. Andreeva - professor, DBS, St. Petersburg
M.N. Makarova - professor, DBS, St. Petersburg
A.V. Rybakova - PhD, St. Petersburg
Sent to 03/14/2014
Signed for printing 14/03/2014
The format of 100 × 70 1/16 .
Glossy paper number 1. Offset printing.
Conv. Pec. liter. 5.2 1.63 fl. incl.
Conv. Cr. - ott . 18.2 . Circulation 1001 copies.

На 1 странице обложки расположено: Университет Висконсина в Мэдисоне (UWM) Школа ветеринарной медицины является селективным государственным университетом располагающимся в городе Мэдисон, штат Висконсин, США.

В школе располагается Национальный научно-исследовательский центр. В 2012 году расходы на исследования составили более чем $ 1,1 млрд..

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

Номер госрегистрации СМИ ПИ № ФС 77-28268 от 18 мая 2007 г. Подписной индекс в агентстве Роспечать 82393.

Учредитель — Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (ФГОУ ВПО «СПбГАВМ»)

Журнал основан в январе 2004 года в Санкт-Петербурге и входит в список ведущих лицензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Журнал распространяется по всем регионам России и Республике Беларусь (ВУЗЫ, НИИ, ВЕТЕРИНАРНЫЕ ОТДЕЛЫ).

Журнал выходит не менее 4 раз в год. В нем публикуются работы по всем основным вопросам ветеринарии и смежным дисциплинам.

В этот журнал Вы можете поместить рекламу Вашей фирмы. Объявления и коммерческая реклама публикуются после оплаты. Срок исполнения – в течение 3 месяцев.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных объявлений.

При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Мнение авторов и редакции по отдельным вопросам может не совпадать.

Плата с аспирантов за публикацию рукописи не взимается.

Справки и технические возможности типографии, в которой печатается журнал, оговариваются по телефону (812) 387-11-58.

Адрес редакции: 196084, СПб, ул. Черниговская дом 5, СПбГАВМ, редакция журнала «Международный вестник ветеринарии» (МВВ).

RESEARCH AND PRODUCTION JOURNAL

State registration number media PI № FS 77-28268 on May 18, 2007. Subscription Index Rospechat 82393.

Founded in January 2004 by Federal State Educational Institution of Higher Professional Education "Saint - Petersburg State Academy of Veterinary Medicine " (FSEI-HPE " SPbGAVM")

International Bulletin of Veterinary an academic international peer-reviewed journal that publishes original research articles as well as review articles in veterinary sciences and related academic disciplines. It covers all the scientific and technological aspects of veterinary sciences in general, anatomy, physiology, biochemistry, pharmacology, microbiology, pathology, public health, parasitology, infectious diseases, clinical sciences, alternative veterinary medicine and other biomedical fields.

The manuscripts submitted to this journal must be previously unpublished and not be under consideration for publication elsewhere. Manuscripts that are found to have been plagiarized from a manuscript by other authors, whether published or unpublished, will incur plagiarism sanctions.

This journal, including all individual contributions and illustrations published therein, is legally protected by copyright. Any use, exploitation or commercialisation is illegal and liable to criminal prosecution.

Requests about legal photocopy reproduction, copyright or duplication processing should be addressed to the editorial office:

196084, St. Petersburg, ul . Chernihiv house 5 SPbGAVM, Editorial Board of "International Bulletin of Veterinary Medicine" (IBVM), phone +7-812- 3871158 .

СОДЕРЖАНИЕ

Инфекционные болезни

- Роль бактериальных болезней рыб в формировании эпизоотического состояния садковых хозяйств. ***Кузнецова Е.В.*** 7
- Определение оптимальных концентраций действующих веществ для препаратов серии Флайблок в производственных условиях. ***Токарев А.Н., Енгашев С.В., Токарева О.А.*** 10

Хирургия

- Моно-и комплексная терапия ран у кроликов тромбоцитарной аутоплазмой. ***Гусева В.А.*** 14

Фармакология, токсикология, фармация

- Профилактика гнойных послеоперационных осложнений с использованием шовного материала с антибактериальным покрытием, представленным наночастицами серебра. ***Коптев В.Ю., Леонова М.А., Онищенко И.С., Шкиль Н.А., Бычков А.Л.*** 20
- Эффективность Ципрофлоксацина при экспериментальном колибактериозе цыплят. ***Заикина Е.Н., Скворцов В.Н., Балбуцкая А.А.*** 24
- Токсикологическая оценка комплексного препарата для лечения и профилактики кокцидиозов животных. ***Арисов М.В., Абрамов В.Е., Поселов Д.С.*** 28
- Клинические испытания антигельминтика широкого спектра действия-Эпримек на лисицах. ***Кузнецов Ю.Е., Смирнов А.А.*** 33
- Изучение антибактериальной и антимикотической активности препарата Аргумистин. ***Кузьмин В.А., Лунегов А.М., Крутяков Ю.А., Белкина И.В., Савенков К.С.*** 36
- Изучение переносимости и субхронической токсичности препарата Иверсан на свиньях. ***Енгашева Е.С., Новиков Д.Д.*** 39

Зоогигиена, Санитария, Кормление

- Влияние пророщенного зерна на метаболические процессы у коров. ***Батраков А.Я., Донская Т.К, Пилаева Н.В., Васильев Р. М., Васильева С.В., Трушкин В.А.*** 42
- Метаболические эффекты у крыс при введении в рацион кормовой добавки с антибактериальными компонентами. ***Белик С.Н., Горлов И.Ф., Крючкова В.В., Ранделин А.В., Мосолов А.А.*** 47
- Содержание металлов в рыбах и среде их обитания в верховье р. Волхов. ***Стекольников А.А., Иванов Д.И., Аршаница Н.М.*** 50

Биохимия, анатомия, физиология

- Применение статистики в диссертациях по ветеринарии. ***Ковалёнок Ю.К., Курдеко А.П., Карпенко Л.Ю.*** 56
- Тромбоцитарная активность у телок на доращивании. ***Завалишина С.Ю.*** 60

Экспериментальная фармакология

- Иммуногистохимические маркеры С-клеток щитовидной железы животных . ***Мужикян А.А.*** 65
- Влияние сухого экстракта бадана на течение экспериментального метаболического синдрома, вызванного высококалорийной диетой. ***Ковалева М.А., Макарова М.Н.*** 72
- Модель острого воспаления: каррагениновый воздушный мешочек. ***Кательникова А.Е. , Крышень К.Л., Мужикян А.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г.*** 78
- Экспериментальные модели боли и ноцицепции. ***Шекунова Е.В., Кашкин В.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г.*** 87
- Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. ***Рыбакова А.В., Макарова М.Н.*** 96

CONTENTS

Infection disease

- *The role of bacterial fish diseases in the formation of the epizootic status cage farms.* ***E. Kuznetsova.*** 7
- *The optimal concentration determination of the active substances for the Flayblok series preparations in a production environment.* ***A. Tokarev, S. Engashev, O. Tokareva.*** 10

Surgery

- *Mono and combined therapy of wounds in rabbits by platelets autological plasma.* ***V. Guseva.*** 16

Pharmacology, toxicology, pharmacy

- *Preventive properties of suture material with antibacterial coating based on silver nanoparticles.* ***V. Koptev, M. Leonova, I. Onishchenko, N. Shkil, A. Bychkov.*** 20
- *Ciprofloxacin efficacy in an experimental colibacteriosis of chickens.* ***E. Zaikina, V. Skvortzov, A. Balbutskaya.*** 24
- *Pharmaco-toxicological evaluation of the integrated product for the treatment and prevention of coccidioses animals.* ***M. Arisov, V. Abramov, D. Poselov.*** 28
- *The clinical trial of broad-spectrum anthelmintic – eprimek fox.* ***Y. Kuznetsov, A. Smirnov.*** 33
- *Study of antibacterial and antimycotic activity of the drug Argumistin.* ***V. Kuzmin, A. Lunegov, I. Belkina.*** 36

Zoohygiene, Sanitation, Feeding

- *Effect of sprouted grains on metabolic processes cows.* ***A. Batrakov, T. Donskaya, N. Pylayeva, R. Vasiliev, S. Vasilieva, V. Trushkin.*** 39
- *Metabolic effects in rats fed the rations with feed supplement, containing antibacterial components.* ***S. Belik, I. Gorlov, V. Kryuchkova, A. Randelin, A. Mosolov.*** 42
- *The content of metals in fishes and the environment of their dwelling in an upper course of the Volkhov River.* ***A. Stekolnikov, D. Ivanov, N. Arshanitsa.*** 47

Biochemistry, anatomy, physiology

- *Statistics in scientific works veterinary profile.* ***Y. Kavalionak, A. Kurdeko, L. Karpenko.*** 50
- *Platelet activity in heifers at growing.* ***S. Zavalishina.*** 56

Experimental pharmacology

- *Immunohystochemical markers of C-cells animal's thyroid gland.* ***A. Muzhikyan.*** 60
- *Impact on the dry extract Badal during the experimental metabolic syndrome caused by high-calorie diet.* ***M. Kovaleva, M. Makarova.*** 72
- *Model of acute inflammation: carrageenan air pouch.* ***A. Katelnikova, K. Kryshen, A. Muzhikyan, M. Makarova, V. Makarov.*** 78
- *The experimental models of pain and nociception.* ***E. Shekunova, V. Kashkin., M. Makarova, V. Makarov.*** 87

УДК: 614

МЕТОДЫ ЭВТАНАЗИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В СООТВЕТСТВИИ С ЕВРОПЕЙСКОЙ ДИРЕКТИВОЙ 2010/63

Рыбакова А.В. - к.в.н., Макарова М.Н. - д.м.н., профессор,
Санкт-Петербургский институт фармации

РЕФЕРАТ

На сегодняшний день процедура эвтаназии лабораторных животных широко распространена и применяется в научно -исследовательской практике, в том числе в доклинических исследованиях лекарственных препаратов. В статье проведен обзор основных вопросов связанных с гуманной эвтаназией лабораторных животных, освещены основные критерии подбора персонала, осуществляющего эвтаназию животных, описаны оптимальные методы и препараты, применяющиеся для эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской директивой 2010/63/EU. Согласно принципам гуманной экспериментальной практики, необходимо свести к минимуму страдания животных, в том числе такие состояния, как страх и беспокойство.

При выборе метода эвтаназии необходимо учитывать множество факторов, в том числе размеры животного, его физиологические и видовые особенности. Процедура эвтаназии неизбежно сказывается на патоморфологической картине органов и тканей животных, вызывая в них существенные артифициальные изменения. Таким образом, при проектировании дизайна исследования необходимо учитывать влияние выбранного метода эвтаназии на получаемую патоморфологическую картину изучаемых в эксперименте органов. Специалисты, выполняющие эвтаназию должны быть технически опытными и владеть гуманными методами эвтаназии, знать все клинические проявления этапов процедуры.

Ключевые слова: доклинические исследования, лабораторные животные, гуманные методы эвтаназии.

ВВЕДЕНИЕ

В большинстве случаев в доклинической практике интерес исследователей не ограничивается изучением физиологии животных, анализом показателей крови и мочи. Важным для оценки действия исследуемого препарата является изучение патологоанатомических и гистологических изменений, что предполагает проведение эвтаназии животных [1].

При проведении доклинических исследований эвтаназия лабораторных животных проводиться в двух случаях: если во время эксперимента животное испытывает хронический стресс и при завершении исследования.

В соответствии с гуманными принципами исследователь должен провести процедуру эвтаназии животного, если во время эксперимента оно испытывает страдания и стресс, возникающие под воздействием физических, физиологических, эмоциональных факторов и вызывает серьезные изменения в гомеостазе животного [2]. Эти процессы зачастую ведут к изменению нейроэндокринного состояния животного, что может привести к изменению поведенческих реакций. Ответ животного варьируется в зависимости от его вида, возраста, породы и текущего

физиологического и психологического состояния, а также социальной среды и других факторов [3, 4]. Стресс разделяется на три фазы: эустресс – когда стимулы безвредны и инициируют адаптивные реакции, которые полезны для животного, обычный стресс - возникает, в ответ на нейтральные раздражители, дистресс - состояние, когда ответ на раздражители мешает благополучию и комфорту животного [5].

В клинической ветеринарной практике эвтаназия домашних животных проводится в связи с:

- онкологическими заболеваниями;
- при терминальном состоянии в результате системных нарушений;
- травм несовместимых с жизнью;
- при социально опасных заболеваниях.

В соответствии с принципами гуманной экспериментальной практики (1959) и Европейской директивой 2010/63/EU необходимо свести к минимуму страдания животных, в том числе такие состояния как страх и беспокойство.

Персонал

Специалист, выполняющий эвтаназию должен быть технически опытным, владеть гуманными методами эвтаназии, знать все клинические проявления этапов эвтаназии. Если он недостаточно осведомлен о том, что ожидать, то может интерпретировать любое движение животного, как сознание, и отсутствие движения, как потерю сознания, что приведет к ошибочным действиям. При планировании и проведении эвтаназии, специалисту необходимо учитывать такие показатели, как: размеры животного, его видовые физиологические и поведенческие особенности. Необходимо учитывать, что на начальном этапе выполнения процедуры эвтаназии, нужно снизить развитие эмоционального стресса и боли у животного, так как это может увеличить резистентность организма животного к действию фармакологических средств, используемых в качестве премедикации [6, 7]. Следует отметить, что некоторые поведенческие реакции животных на стресс могут быть интерпретированы не опытным исполнителем неверно. В руководящих принципах для эвтаназии животных AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animald: 2013 edition описаны такие признаки проявления воздействия стресса как: вокализация во время обработки или болезненных процедур, связанная со стрессом [8, 9], вокализация связанная с избыточным давлением, возникающим при фиксации [10, 11]. Слюноотделение, мочеиспускание, дефекация, эвакуация содержимого параанальных желез, тахикардия, потливость и рефлекторные сокращения скелетных мышц вызывающих дрожь и тремор и другие мышечные спазмы могут возникать в бессознательном, а также сознательным состоянии животных. Страх может вызвать неподвижность у некоторых видов животных, таких как кролики и куры [12]. В данном случае эту неподвижность не следует интерпретировать, как потерю сознания. Вокализация, агрессивное поведение, и секреция определенных запахов испуганного животного могут вызвать беспокойство и стресс у других животных [13, 14]. В связи с этим, нежелательно присутствие других животных при выполнении эвтаназии, необходимо обеспечить шумовые и визуальные барьеры [11, 15-18].

При любых обстоятельствах, метод эвтаназии должен быть подобран и использоваться в соответствии с этическими стандартами. Решение об эвтаназии, основывается на рекомендациях ветеринарного специалиста. Методы, при которых прекращается двигательная активность животных, предпочтительнее других методов, связанных с угнетением дыхания, сердечной деятельности и пр. Постоянное участие в процедурах эвтаназии может накладывать определенный отпечаток на сотрудников, ее проводящих.

Это может проявляться неудовлетворенностью в работе, отчужденностью или небрежной и черствой работой с животными.

Для того, чтобы избежать таких случаев, должны проводиться:

- биоэтическая комиссия с полным разбором дизайна исследования с акцентом на гуманные точки и выбранным методом эвтаназии;
- ротация кадров, связанная с оценкой психоэмоционального состояния сотрудника;
- обучение внутри организации с разъяснением необходимости проведения эвтаназии при проведении доклинических исследований;
- обучение вне организации.

Выбор метода эвтаназии

При выборе метода эвтаназии необходимо учитывать, что данные методы должны приводить к быстрой потере сознания, и в дальнейшем сопровождаться остановкой сердца и дыхания, окончательной потерей функции мозга, а также быть надежными, легко выполнимыми и необратимыми.

Так же важно учитывать, что методы эвтаназии могут повлиять на весь организм животного или на отдельные органы, тем самым вызывают появление артефактов, наличие которых необходимо учитывать при обработке полученных результатов. Чаще всего артифициальные изменения можно обнаружить в ткани легких, причем их количество и степень выраженности зависят от вида эвтаназии и от способа его использования [1].

В оценке методов эвтаназии используются следующие критерии:

- способность вызывать потерю сознания и смерть без причинения боли, страданий, беспокойства;
- время, требуемое для потери сознания;
- надежность;
- безопасность для обслуживаемого персонала;
- необратимость;
- совместимость с дизайном исследования;
- эмоциональный эффект оказываемый на персонал;
- возможность последующей оценки, экспертизы или использования тканей;
- потенциальная возможность у человека злоупотребления препаратами для наркоза и эвтаназии;
- совместимость с видом, возрастом и состоянием здоровья;
- наличие специального оборудования.

Агенты используемые для проведения эвтаназии делятся на 3 категории. Выбор агента зависит от того, испытывает животное страдание до потери сознания или нет:

1. агенты оказывающие прямое угнетение функциональных нейронов;
2. агенты вызывающие стойкую гипоксию;
3. агенты вызывающие разрушение структур головного мозга.

Потеря сознания должна предшествовать потере двигательной активности. Агенты и методы, которые предотвращают двигательную активность через паралич мышц, но не блокируют и не нарушают проводимость коры головного мозга или эквивалентные структуры (например, сукцинилхолин, стрихнин, кураре, никотин, калий или магниевые соли), не могут применяться в качестве единственного средства для эвтаназия позвоночных, потому что они не снижают проявления боли и стресса до смерти. Например, магниевые соли являются приемлемыми в качестве единственного агента для эвтаназии для многих беспозвоночных из-за отсутствия доказательств мозговой деятельности [19, 20]. В зависимости от скорости наступления ответной реакции конкретного агента может наблюдаться торможение двигательной активности, сопровождающейся вокализацией и сокращением мышц аналогично тому, что на-

блюдается в начальной стадии наркоза. После атаксии и потери рефлексов возникает последующая двигательная активность, характеризующаяся судорогами, вокализациией и рефлексами борьбы, что можно отнести ко второй стадии анестезии, которая, по определению, длится от потери сознания до наступления апноэ [21, 22]. Гипоксия обычно достигается путем воздействия на животных высоких концентраций газов, что приводит к вытеснению кислорода. Наиболее часто используются: двуокись углерода, азот, аргон, окись углерода, блокирующее поглощение кислорода эритроцитами. Так по многим источникам умерщвление диоксидом углерода более пригодно для изучения структуры легких [2].

Обескровливание, другой способ вызывать смерть животного находящегося без сознания или в агональном состоянии. Как и в других методах эвтаназии, некоторые животные могут проявлять двигательную активность или судороги после потери сознания из-за гипоксии. Однако, эта рефлекторная деятельность сознательно не воспринимается животным. Кроме того, методы, основанные на создании гипоксии не могут быть использованы для рептилий, которые устойчивы к длительной гипоксии.

Методы эвтаназии

Методы эвтаназии разделяют на: 1 - допустимые - те, которые позволяют провести эвтаназию гуманно; 2 - условно-допустимые методы - методы, при которых из-за возможности ошибки оператора или проблем с безопасностью сложно произвести гуманную эвтаназию или - методы, плохо себя зарекомендовавшие; 3 - недопустимые методы - методы, считающиеся негуманными при любых условиях, или при которых существует большой риск для здоровья человека.

Физические методы часто используются в сочетании с забором объема циркулирующей крови для дальнейшего исследования. Эти методы являются недорогими, гуманными и безболезненными, если выполнены надлежащим образом, и исключают негативное влияние фармацевтических препаратов на структуры органов и тканей и тем самым облегчают интерпретацию результатов. Кроме того, животные испытывают меньше страха и тревоги при использовании физических методов, но это требует обязательной подготовки персонала и более прямой связи с животными, которые должны будут умерщвлены. Данный аспект может неблагоприятно влиять на персонал.

Физические методы включают в себя применение огнестрельного оружия, цервикальную дислокацию, обезглавливание, смерть от электрического тока, микроволновое облучение, компрессию грудной клетки, обескровливание, оглушение, разрушение спинного мозга. Эти методы более быстрые, менее безболезненные, более гуманные и практичные, чем другие. Обескровливание, оглушение и разрушение спинного мозга рекомендуются для эвтаназии только в комплексе с другими методами. Физические методы являются самыми гуманными и могут быть наиболее подходящими методами в определенных ситуациях. По данным многих авторов [2] применение таких методов эвтаназии, как декапитация и цервикальная дислокация подходят для изучения органов брюшной полости, без оказания влияния на структуры.

Цервикальная дислокация – если выполняется подготовленным персоналом, считается гуманным. Этот метод применяется для эвтаназии домашней и другой мелкой птицы, мышей, молодых крыс и кроликов. При эвтаназии мышей и крыс, большой и указательный пальцы помещаются с обеих сторон шеи у основания черепа или накладывают металлический ограничитель у основания черепа. Другой рукой делают рывок за основание хвоста или задних конечностей, производя отрыв

Таблица 1

Сводная таблица применимых методов эвтаназии для различных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63

Вид животного/ методы	Рыбы	Амфибии	Рептилии	Птицы	Грызуны	Кролики	Собаки, кошки, хорьки, лисы	Крупные живот-ные	Нечелове-кообразные обезьяны
Сверхдозы анестетиков	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Травматический стержень	-	-	2	-	-	-	-	-	-
CO_2	-	-	-	-	3	-	-	-	-
Цервикальная дислокация	-	-	-	4	5	5	-	-	-
Удар по голове	-	-	-	7	8	9	10	-	-
Декапитация	-	-	-	11	12	-	-	-	-
Электрический ток	13	13	-	13	-	13	13	13	-
Инертные газы (Ar,N_2)	-	-	-	-	-	-	-	14	—
Специализированное огнестрельное оружие	-	-	15	-	-	-	16	15	-

Примечание:
1. Следует использовать седативные средства, 2. Только для крупных рептилий, 3. Только постепенное заполнение камеры, не используется для новорожденных, 4. Только для птиц менее 1 кг, для птиц более 250 г. следует использовать седацию, 5. Только для грызунов менее 1 кг, для грызунов более 150 г. следует использовать седацию, 6. Только для кроликов менее 1 кг, для кроликов более 150 г. следует использовать седацию, 7. Только для птиц менее 5 кг, 8. Только для грызунов менее 1 кг, 9. Только для кроликов менее 5 кг, 10. Только для новорожденных, 11. Только для птиц менее 250 г., 12. Используется в крайних случаях, когда другие методы невозможны, 13. Необходимо использование специализированного оборудования, 14. Может быть использовано только для свиней, 15. Может выполняться только обученным персоналом, 16. Может выполняться только обученным персоналом, только когда другие методы невозможны.

позвоночника от черепа. При эвтаназии крольчат, голову держат в одной руке, задние конечности в другой. Для домашней птицы этот метод эвтаназии – обычный массовый метод, но он не гарантирует мгновенную потерю сознания. При данном методе достигается достаточно быстрая потеря сознания. Ткани организма химически не загрязняются. Требует технических навыков для гарантии быстрой потери сознания. Использование ограничено домашней и мелкой птицей, молодыми крысами, мышами и кроликами. Обезглавливание может использоваться для эвтаназии грызунов и мелких кроликов. Оно позволяет получить ткани и жидкости организма, а так же анатомически неповрежденные ткани мозга. Доступны гильотины для мгновенного обезглавливания взрослых грызунов и мелких кроликов. Вызывает быструю потерю сознания. Персонал должен соблюдать правила техники безопасности для предотвращения травм. Оборудование должно поддерживаться в хорошем состоянии.

Передозировка ингаляционными анестетиками (эфир, галотан, метоксифлуран, изофлуран, севофлурана, десфлюран, энфлюран) широко используются для эвтаназии в настоящее время [23]. Эвтаназия с применением ингаляционных средств может занять некоторое время, необходимое для достижения определенной концентрации препарата в легких. В большинстве случаев, при высокой концентрации препарата потеря сознания происходит быстрее, и эвтаназия является более гуманной. Оборудование для газовой эвтаназии должно быть исправно. Дефектное оборудование может приводить к медленной и мучительной смерти животного и может быть опасным как для других животных, так и персонала. Большинство препаратов для газовой эвтаназии опасны для персонала из-за возможности взрыва (эфир), наркоза (галотан), кислородной недостаточности (азот, угарный газ), привыкания или эффекта хронического накопления (закись азота). Газовая анестезия применяется по открытому, полуоткрытому, и полузакрытому контуру. Анестезия в прозрачных боксах для премедикации используется для вводной анестезии мелких млекопитающих и применима для птиц. Для животных с нарушенной вентиляцией легких (медленное повышение концентрации препарата), следует применять другие методы. Новорожденные животные более стойки к гипоксии. Для животных в возрасте менее 16 недель ингаляционные препараты рекомендуется использовать только для введения в наркоз, эвтаназию проводить с использованием других методов.

Использование инъекционных препаратов - самый быстрый, надежный и оптимальный метод эвтаназии, так как не вызывает болезненности или страха у животного. Агрессивным, напуганным животным перед введением препарата для эвтаназии необходимо вводить седативные препараты или нейролептики. Если внутривенное введение провести сложно или невозможно, допустимо внутрибрюшинное введение.

Дополнительные методы

Оглушение и разрушение спинного мозга при правильном применении вызывают потерю сознания, но не гарантируют гибель. Поэтому эти методы должны использоваться только совместно с другими процедурами (введение фармакологических препаратов, обескровливания или обезглавливания).

Обескровливание используется для гарантирования гибели животных после оглушения или находящихся без сознания и не может использоваться как монометод.

В нашей лаборатории был проведен анализ изменений, связанных с использованием наиболее распространенных способов эвтаназии. При постепенном увеличении концентрации углекислого газа

наблюдалось спадение ткани легких с максимально выраженными изменениями. Эвтаназия воздушной эмболией не подходит для изучения микроскопического строения легких вследствие возникновения выраженной эмфиземы. После применения цервикальной дислокации и использования препаратов для ингаляционного наркоза структура легких сохраняется, хотя артефактные изменения все же наблюдаются и могут затруднить анализ. Наиболее приемлемые результаты были получены при использовании углекислого газа в концентрации близкой к 100%, поскольку структура легочной ткани страдала незначительно. Полученные данные позволили предложить практические рекомендации по использованию методов эвтаназии мелких лабораторных животных с целью дальнейшего гистологического исследования тканей [2].

Подтверждение смерти

После эвтаназии смерть должна быть обязательно подтверждена и запротоколирована. Животное в глубоком наркозе после введения препарата может казаться мертвым, но, в конечном счете, может вернуться к жизни.

Смерть должна быть подтверждена до утилизации останков животного. Сочетание следующих критериев является наиболее надежным в подтверждении смерти:

- отсутствие пульса;
- дыхания;
- отсутствие роговичного рефлекса;
- невозможность услышать дыхание и сердцебиение с помощью фонендоскопа;
- синюшность слизистых оболочек.

Ни один из этих признаков в одиночку не подтверждает смерть. В сомнительных случаях, проверка смерти может быть дополнена чрезкожной сердечной пункцией после потери сознания у животного. Отсутствие движения иглы и шприца после введения в сердце (предварительно проверив правильное расположение) указывает на отсутствие сердечных сокращений и подтверждает смерть [24].

Средства, применяемые для эвтаназии

Ингаляционные препараты

Фторотан (Phtorothanum) - Наряду с выраженным наркотическим действием, фторотан практически не обладает анальгетическими свойствами. Введение в наркоз, осуществляется при постепенном повышении концентрации до 1-2 об.%, а затем снижении до 0,5-1,5 об.%. Введение в наркоз происходит значительно легче, стадия возбуждения практически не выражена, рвота возникает редко. Фторотан не взрывоопасен, позволяет использовать большие объемы кислорода, что положительно отражается на состоянии организма, обеспечивает хорошую релаксацию мышц, подавляет секрецию слюнных и бронхиальных желез.

Метоксифлуран (Methoxyflurane) (Metafane®, Penthrane®) - обладает выраженным анальгезирующим и релаксирующим действием. Хорошо растворяется в крови, что приводит к длительному введению в наркоз. При его применении наблюдается выраженная стадия возбуждения. Хирургическая стадия наркоза достигается через 5 - 10 мин. после начала подачи анестетика. Возможно применение в сочетании с другими анестетиками. Является условно-допустимым препаратом для эвтаназии (высокая растворимость в крови при медленной анестезии), раздражает слизистую оболочку носа и глаз, огне- и взрывоопасен. Так как метоксифлуран малолетучее вещество, лучше всего использовать его в системах с открытым контуром.

Галотан (Halothane) (Halothan®, Fluothane®) - мощный анестетик и относительно мало раздражающий газ, требующий точного испарителя для применения. При использовании галотана быстро развивается угнетение сердечного рит-

ма. При введении в наркоз используется в дозе 4 об.%. Поддержание анестезии обычно достигается концентрациями анестетика между 1-1,5%. Галотан обладает слабым миорелаксирующим действием, поэтому рекомендуется использовать совместно с курареподобными миорелаксантами. При передозировке - происходит одновременно апное и остановка сердца. Препарат может быть причиной хронических болезней печени у персонала клиники, поэтому наркозная система должна быть оснащена уловителем и местной вытяжкой.

Изофлуран (Isoflurane) (Forane®, Aerrane®, Forene®, IsoFlo®,) универсальный газовый анестетик с быстрым введением в наркоз. В зависимости от дозы изофлуран проявляет угнетающий эффект на дыхательную и сердечно-сосудистую систему. Так как порог насыщения крови изофлураном достаточно низок, газ практически не растворяется в крови, что обеспечивает высокую скорость индукции наркоза. При низком содержании кислорода в дыхательной смеси, анестезия изофлураном приводит к состоянию апное, сердечной аритмии и блокаде сердца. Процедуру эвтаназии проводят до момента прекращения дыхания. Кроме того, необходимо поступление достаточного количества воздуха или кислорода для того, чтобы предотвратить преждевременную гипоксию.

Закись азота (N_2O, Nitrogenium oxidatum) анестетик со слабыми наркотическими и выраженными анальгетическими свойствами. Используется с другими ингаляционными анестетиками для ускорения анестезии, но как монопрепарат не вызывает анестезию у животных даже в 100% концентрации, вызывая гипоксию вплоть до остановки дыхания и сердечной деятельности.

Углекислый газ. Ингаляция CO_2 при концентрации 7,5% повышает болевой порог, более высокие концентрации CO_2 приводят к быстрому анестезирующему эффекту. У крыс 80% концентрация CO_2 обеспечивает анестезию через 12 - 33 секунды, 70% концентрация CO_2 в кислороде вызывает анестезию через 40 - 50 секунд. Обладает быстрым успокаивающим, болеутоляющим и анестезирующим эффектом, легко доступен, недорогой, взрывобезопасен, не поддерживает горение, опасность для персонала минимальна. Поскольку CO_2 тяжелее воздуха, неполное заполнение объема может позволить животным, поднимаясь выше его уровня, избегать его воздействия. Некоторые виды животных (норные, водоплавающие) могут иметь повышенную устойчивость к нему. Частота дыхания у рептилий и амфибий слишком низкая для использования углекислого газа. Эвтаназия с использованием CO_2 может занимать больше времени, чем эвтаназия другими средствами. Высокие концентрации CO_2 могут вызывать мучения у животных и недопустимы к использованию. Рекомендованный источник углекислого газа – сжатый в газовых баллонах. Углекислый газ, полученный другими методами (из сухого льда, огнетушителей, химическими средствами) недопустим. Поток газа должен поддерживаться минимум в течение 1 минуты после очевидной клинической смерти. Если животное не погибло, использование CO_2 совмещают с другими методами эвтаназии.

Азот, аргон. Азот (N_2) и аргон (Ar) - бесцветные газы без запаха, инертные, огне- взрывобезопасны. Эвтаназию проводят, помещая животное в закрытый прозрачный бокс, оснащенной системой подачи газа. Они замещают кислород, вызывая смерть от гипоксии. Крысы теряют сознание при 39% объеме азота через 3 минуты, дыхание прекращается через 5 - 6 минут. Независимо от концентрации газа, до потери сознания и гибели присутствуют признаки возбуждения. Газы легко доступны в сжатом виде. Опасность

для персонала минимальна. Потере сознания предшествуют гипоксия и учащенное дыхание. Повышение концентрации кислорода до 6% и более до момента наступления смерти приводит к восстановлению жизненных функций организма. Использование азота и аргона для эвтаназии условно-допустимо, так как может быть мучительным для некоторых видов животных (крысы). Использование допустимо при быстром падении концентрации кислорода

Угарный газ, (CO) - бесцветный газ без запаха, при концентрациях, не превышающих 10% огне- и взрывобезопасен, приводит к смерти от гипоксии. У морских свинок при 8% концентрации CO потеря сознания наступает через 40 – 120 секунд, смерть наступает в течение 6 минут. У норок и шиншилл потеря сознания наступает через 1 минуту, остановка дыхания - через 2 минуты, работы сердца - 5 - 7 минут. Угарный газ – общетоксический яд, чрезвычайно опасен для персонала из-за высокой токсичности и трудности обнаружения. Вызывает безболезненную потерю сознания, гипоксия незаметна. Смерть при концентрации 4 - 6% наступает быстро. Его использование допустимо для собак, кошек и других мелких млекопитающих, при условии использования сжатого CO, высококачественного оборудования, расположенного в легко проветриваемом помещении или на улице, хорошо освещенным и имеющим люки для прямого наблюдения за животными. Расход CO должен быть минимальным и быстро достигать необходимой концентрации (не менее 6%). Если оборудование расположено в помещении, помещение должно быть оборудовано датчиками CO.

Неингаляционные препараты

Производные барбитуровой кислоты. Барбитураты угнетают центральную нервную систему, начиная с коры головного мозга, приводя к потере сознания, и, в дальнейшем, к наркозу. При передозировке, глубокая анестезия приводит к недостатку кислорода (вследствие угнетения дыхательного центра), с последующей остановкой сердца. Все используемые для анестезии производные барбитуровой кислоты, вводимые внутривенно, подходят для эвтаназии. Барбитураты вызывают эвтаназию с минимальным дискомфортом для животного.

Пентобарбитал натрия (Этаминал натрия, Нембутал, Embutal, Isobarb, Mebubarbital, Narcoren, Nembutal sodium, Nembutal natrium, Pental, Pentobarbitalum Natricum, Pentobarbital sodium, Pentobarbital solublte, Pentone, Prodormol, Somnopentyl, Sopental). Препарат оказывает снотворное, в высоких дозах - наркотическое действие. Сон наступает относительно быстро (через 30 - 45 мин), продолжается 5 - 6 ч. Внутривенно вводят медленно в виде 5% раствора.

Кетамин (Ketaminum, Калипсол, Кетажест, Кеталар, Велонаркон, Кетанест, Kalipsol, Ketaject, Ketalar, Ketamine, Ketanest, Ketolar, Vetalar, Ketaset, Velonarcon). Является очень сильным анальгетиком, не обладает снотворным и успокаивающим действием, сохраняющий и даже повышающий во время наркоза мышечный тонус. Утрата сознания наступает через 20 - 60 с. Анальгетический эффект кетамина развивается обычно при введении в вену в течение 10 мин и продолжается примерно 2 - 3 ч. При внутривенном введении раствора кетамина возможны боль и покраснение кожи по ходу вены. Не вызывает значимого угнетения дыхания, не угнетает глоточные и гортанные рефлексы.

Пропофол (Diprivan, Pofol, Recofol), быстродействующий препарат для внутривенного наркоза, который наступает через 30-60 секунд. Пропофол вызывает глубокую депрессию дыхания: индукционная доза обычно вызывает апноэ, значительно уменьшает сократимость мио-

карда, что приводит к значительному снижению артериального давления. Пропофол снижает мозговой кровоток и внутричерепное давление, может вызывать возбуждение (во время введения в наркоз). Наркотизируюшей является доза 1,0-1,5 мг/кг. Пропофол назначается только внутривенно. Анальгетический эффект у пропофола отсутствует. Использование пропофола хорошо сочетается с различными препаратами для премедикации, мышечными релаксантами, ингаляционными анестетиками и анальгетиками.

Мидазолам (Midazolam, Dormicum, Dormonid, Flormidal, Versed). Обладает очень быстрым седативным и выраженным снотворным эффектом. Оказывает успокаивающее, противосудорожное, миорелаксантное действие, усиливает действие снотворных, наркотических, аналгезирующих средств. Вводится внутривенно, внутримышечно и ректально. Действует непродолжительно. Для введения в наркоз внутривенно вводят за 15 мин из расчета 0,3-0,35 мг/кг массы тела вместе с аналгетиками.

Рометар (Ксилазин) - антагонист альфа2-адренорецепторов. Обладает успокаивающим и болеутоляющим действием, вызывает релаксацию скелетной мускулатуры посредством центрального действия. Применяют животным внутримышечно и внутривенно с целью успокоения, обезболивания и миорелаксации при проведении хирургических манипуляций, лечебно-профилактических обработок и диагностических исследований. При внутримышечном введении препарат оказывает свое действие через 5- 30 минут, при внутривенном – через 1-5 минут, успокаивающее действие длится от 0,5 до 5 часов.

Золетил - препарат для общей анестезии, содержащий в качестве действующих веществ тилетамина гидрохлорид и золазепама гидрохлорид. Тилетамин - общий анестетик диссоциативго действия. Золазепам угнетает подкорковые области мозга, вызывая анксиолитическое и седативное действия, расслабляет поперечно - полосатую мускулатуру. Золазепам усиливает анестетическое действие тилетамина.

Дроперидол (Droperidolum, Dehydrobenzperidol, Dridol, Droleptan, Droperidol, Inapsin, Sintodril). Нейролептическое средство из группы бутирофенонов. Оказывает транквилизирующее, седативное и противорвотное действия, уменьшает двигательную активность. Вводят дроперидол под кожу, внутримышечно и внутривенно. Эффект при введении в вену проявляется через 2 - 5 мин, достигает максимума через 20 - 30 мин, действие в зависимости от дозы продолжается до 2 - 3 ч.

Таламонал - комбинированный препарат, содержащий в одном миллилитре 2,5 мг дроперидола и 0,05 мг фентанила. При вводном наркозе препарат вводят внутривенно в дозе 1-8 мг/кг, а затем, по мере необходимости, его добавляют дробно через каждые 15-20 мин. вместе с анальгетиками.

Промедол - по своему действию близок к морфину, но по анальгетической активности слабее морфина, менее токсичен, в меньшей степени угнетает дыхательный центр. Применяется для премедикации, а также во время общей анестезии для усиления анальгезирующего эффекта. Его можно сочетать с другими анальгетиками, анестетиками, ненролептиками Препарат вводят внутривенно, внутримышечно, подкожно и внутрь.

Фентанил - по силе действия в 100 раз превосходит морфин, дает быстрый, сильный, но более короткий (до 30 мин.) анальгетический эффект. Фентанил угнетает дыхание, вплоть до апноэ, вызывает брадикардию.

Бупринорфин (Temgesic) - сильный анальгетик, который успешно применяется для собак и кошек. Вводится внутри-

мышечно в дозе 4-10 мг/кг, внугривенно - в дозе 2-5 мг/кг.

Бутарфанол (Torbugesic) - обладает прекрасным анальгезирующим и седативным действием. Вводится внутримышечно в дозе 0,2-0,8 мг/кг кошкам и в дозе 0,5 мг/кг собакам, что дает эффект в течение 3-4 часов.

Тубокурарин - относится к н-холиноблокаторам скелетной мускулатуры, оказывает мощное миопаралитическое действие. Вводится внутривенно в дозе 0,4-0,5 мг/кг, через 2-4 мин. наступает релаксация мышц, которая длится от 10 до 20 мин. Последующие дозы должны быть уменьшены в 1,5-2 раза, т.к. препарат обладает кумулятивным действием.

Дитилин (листенон, миорелаксин) - применяют 1-2% раствор в дозе 1-2 мг/кг. Вызывает расслабление скелетной мускулатуры в течение 5-7 минут. При использовании допускается быстрое введение насыщенного раствора внутривенно или внутрисердечно в дозе 1-2 ммоль/кг (остановка работы сердца). Требуется общий наркоз животного с потерей сознания и отсутствием сокращений мышц.

Магния сульфат (Magnesii sulfas). При парентеральном введении в зависимости от дозы может наблюдаться седативный, снотворный или наркотический (курареподобный) эффект, большие дозы препарата понижают возбудимость дыхательного центра и вызывают остановку дыхания с результирующей остановкой сердца. Препарат может использоваться только при предварительном введении животного в наркоз, или животному, находящемуся без сознания.

Сульфонат метана (MS 222, TMS) - производное бензойной кислоты. Может использоваться для эвтаназии амфибий и рыбы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Methods of euthanasia of laboratory animals, in accordance with European Directive 2010/63

A. Rybakova, M. Makarova.

ABSTRACT

Today euthanasia procedure laboratory animals is widespread and used in scientific research practice, including preclinical studies of drugs. The article provides an overview of the main issues related to the humane euthanasia of laboratory animals, highlights the main criteria for the selection of personnel involved in animal euthanasia, describes the best methods and drugs used to evtanazirovaniya laboratory animals in accordance with the European Directive 2010/63 / EU. According to the principles of humane experimental practice, it is necessary to minimize the suffering of animals, including conditions such as fear and anxiety.

When choosing a method of euthanasia is necessary to consider many factors, including the size of the animal, its physiological and specific features. The procedure for euthanasia inevitably affects the pathological picture of organs and tissues of animals, causing them significant change of the artificial. Thus, the design of the study design should take into account the effect of the chosen method of euthanasia on the resulting histopathology pattern was investigated organs. Specialists performing euthanasia must be technically proficient and possess humane methods of euthanasia to know all the clinical manifestations stages of the procedure.

Key words: pre-clinical studies, laboratory animals, humane methods of euthanasia.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мужикян А.А., Макарова Особенности патологоанатомического исследования группы экспериментальных животных / А.А. Мужикян, М.Н. Макарова, Я.А. Гущин // Международный вестник ветеринарии. - 2014. - № 2 - С. 103-109.

2.Гущин, Я.А. Влияние методов эвтаназии на гистологическую картину легких мелких лабораторных грызунов / Я. А. Гущин, А. А. Мужикян // Международный вестник ветеринарии. – 2014. - № 4. - С. 96-104.
3.Rollin BE. Animal agriculture and emerging social ethics for animals. J Anim Sci 2004;82:955–964.
4.DeGrazia D. Self-awareness in animals. In: Lurz R, ed. The philosophy of animal minds. Cambridge, England: Cambridge University Press, 2009;201–217.
5.Thompson PB. Ethics on the frontiers of livestock science. In: Swain DL, Charmley E, Steel JW, et al, eds. Redesigning animal agriculture: the challenge of the 21st century. Cambridge, Mass: CABI, 2007;30–45.
6.Thompson PB. Getting pragmatic about farm animal welfare. In: McKenna E, Light A, eds. Animal pragmatism: rethinking humannonhuman relationships. Bloomington, Ind: Indiana University Press, 2004;140–159.
7.DeGrazia D. Animal ethics around the turn of the twenty-first century. J Agric Environ Ethics 1999;11:111–129.
8.DeGrazia D. Taking animals seriously: mental life and moral status. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1996.
9.Thompson PB. Agricultural ethics: research, teaching, and public policy. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1998.
10.Varner G. In nature's interests? Interests, animal rights and environmental ethics. Oxford, England: Oxford University Press, 1998.
11.AVMA. Veterinarian's oath. Available at: www.avma.org/KB/ Policies/Pages/ veterinarians-oath.aspx. Accessed May 13, 2011.
12.Pavlovic D, Spassov A, Lehmann C. Euthanasia: in defense of a good, ancient word. J Clin Res Bioeth [serial online] 2011;2:105. doi:10.4172/2155-9627.1000105. Accessed August 13, 2012.
13.AVMA. AVMA animal welfare principles. Available at: www. avma.org/KB/ Policies/Pages/AVMA-Animal-Welfare-Principles. aspx. Accessed May 7, 2011.
14.AVMA. Euthanasia of animals that are unwanted or unfit for adoption. Available at: www.avma.org/KB/Policies/Pages/ Euthanasia-of-Animals-That-Are-Unwanted-or-Unfit-for-Adoption.aspx. Accessed May 7, 2011.
15.Haynes R. Animal welfare: competing conceptions and their ethical implications. Dort, The Netherlands: Springer, 2008.
16.Appleby MC. What should we do about animal welfare? Oxford, England: Blackwell, 1999.
17.Fraser D, Weary DM, Pajor EA, et al. A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. Anim Welf 1997;6:187–205.
18.Duncan IJH. Animal welfare defined in terms of feelings. Acta Agric Scand A Anim Sci 1996;(suppl 27):29–35.
19.Yeates J. Death is a welfare issue. J Agric Environ Ethics 2010;23:229–241.
20.Kamm FM. Morality, mortality. Vol 1. Oxford, England: Oxford University Press, 1993.
21.Morton DB. A hypothetical strategy for the objective evaluation of animal well-being and quality of life using a dog model. Anim Welf 2007;16(suppl):75–81.
22.Rollin BE. Animal euthanasia and moral stress. In: Kay WJ, Cohen SP, Fudin CE, et al, eds. Euthanasia of the companion animal. Philadelphia: Charles Press, 1988;31–41.
23.Niel L, Stewart, SA, Weary, DM. Effect of flow rate on aversion to gradual-fill carbon dioxide euthanasia in rats. Appl Anim Behav Sci 2008;109:77–84.
24.Brown M, Carbone L, Conlee KM, et al. Report of the working group on animal distress in the laboratory. Lab Anim (NY) 2006;35:26–30.
25.Fakkema D. Operational guide for animal care and control agencies: euthanasia by injection. Denver: American Humane Association, 2010