

11. Applikationen und Probenentnahmen

11.1. Blutentnahmen bei Versuchstieren

11.1.1. Allgemeine Informationen

Zur Entnahme von Blutproben bei Versuchstieren existiert eine geeignete Empfehlung, die in Kooperation zwischen dem „Ausschuß für Tierschutzbeauftragte der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS)“ und dem Arbeitskreis 4 der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (TVT) erstellt wurde. Die Empfehlung trägt den Titel „Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren“ und kann bei der TVT angefordert werden. Die vorliegende Abhandlung lehnt sich an die Empfehlung der TVT und GV-SOLAS an, beschränkt sich jedoch auf die Spezies Maus, Ratte und Kaninchen

Vor einer Blutentnahme bei Versuchstieren sind folgende prinzipiellen Parameter abzuwägen:

-Gewünschte Qualität des Blutes

- steril - unsteril
- arteriell - venös - Mischblut
- potentielle Verunreinigungen (Dekapitation, Kappen der Schwanzspitze)
- Hämolyse
- Abstand von Futteraufnahme

-Entnahmefrequenz

- einmalig - mehrmalig
- zeitliche Abstände zwischen Blutentnahmen

-Überleben des Tieres nach der Blutentnahme oder terminale Blutentnahme?

-Gewünschte Blutmenge

In Abhängigkeit von den experimentellen Ansprüchen an die Blutentnahme, muss eine Entscheidung getroffen werden, welche maximale Blutmenge dem Versuchstier entzogen werden kann und welche Technik zum Einsatz kommen soll. Aus Tierschutzgründen und zur Erleichterung der Abnahme ist es wichtig, die Tiere durch häufigen und behutsamen Umgang (Handling) an die Durchführung von Manipulationen zu gewöhnen. Durch diese Maßnahmen kann einerseits der Grad der Beunruhigung und damit der Belastung der Tiere erheblich vermindert werden und andererseits dem Operateur die Durchführung des Eingriffs erleichtert werden. Das Tierschutzgesetz fordert die Anwendung möglichst schonender Blutentnahmetechniken.

11.1.2. Bestimmung der maximal zu entnehmenden Blutmenge

Bei der Festlegung der maximal zu entnehmenden Blutmenge ist in erster Linie die Entnahmefrequenz zu berücksichtigen. Prinzipiell muss klar sein, ob es sich um eine Entblutung (d.h. Gewinnung einer möglichst großen Blutmenge in Narkose mit anschließender Tötung des Versuchstiers), eine einmalige Blutentnahme (d.h. Blutentnahme mit anschließender mindestens 14-tägiger Erholungsphase ohne weitere Blutabnahmen) oder um mehrmalige Blutentnahmen (Serie von Blutentnahmen mit Zeitintervall(en) von unter 14 Tagen) handelt. Die nachfolgende Tabelle informiert, welche Blutmengen (in % des Gesamtblutvolumens) jeweils aus Tierschutzgründen (Blutentnahmen mit Überleben) bzw. aus biologischen Gründen (Entblutungen) maximal entzogen werden können.

	maximal zu entnehmende Blutmenge
Entblutung	50% des Gesamtblutvolumens
Einmalige Blutentnahme	10% des Gesamtblutvolumens
mehrmalige Blutentnahmen	1% des Gesamtblutvolumens pro Tag

Wird als Faustregel angenommen, dass die relative Gesamtblutmenge eines Labortieres ca. 10% des Körpergewichts ausmacht, so kann die maximal zu entziehende Blutmenge als prozentualer Anteil des Körpergewichts ausgedrückt werden.

	maximal zu entnehmende Blutmenge
Entblutung:	5% des Körpergewichts
Einmalige Blutentnahme:	1% des Körpergewichts
mehrmalige Blutentnahmen:	0,1% des Körpergewichts pro Tag

Dabei muss jedoch allen Beteiligten klar sein, dass es sich „lediglich um eine Faustregel“ handelt. Wie die nachfolgende Tabelle aufzeigt zeigt die relative Gesamtblutmenge von Tieren starke Speziesunterschiede und liegt zum Teil deutlich unter dem „Faustwert“ von 10%. Dies muss in Grenzfällen berücksichtigt werden.

Spezies	Relative Gesamtblutmenge (% des Körpergewichts)
Maus	7,0 - 8,0 %
Ratte	5,0 - 7,0 %
Kaninchen	4,5 - 7,0 %

11.1.3. Gebräuchliche Techniken der Blutentnahme bei Maus und Ratte

-Anritzen bzw. Punktion der Schwanzvene

Bei Mäusen und Ratten kann Blut durch Anritzen der Schwanzvene gewonnen werden. Da die Schwanzvenen bei der Thermoregulation der Versuchstiere eine große Rolle spielen, kann die Blutabnahme durch Hyperämisierung wesentlich erleichtert werden. Dazu werden die Tiere in der Regel einem Infrarotstrahler ausgesetzt, wobei durch sorgfältiges Beobachten des Tierverhaltens eine Überhitzung ausgeschlossen werden muss. Bei der Maus wird die Vene in der Regel nicht punktiert sondern mit einem Skalpell angeritzt. Bei der Ratte kann entweder die Ritztechnik angewandt werden oder die Vene kann alternativ punktiert werden. Ein wiederholtes Einschneiden des Schwanzes und der Schwanzvene sollte prinzipiell vermieden werden, ist in vielen Fällen aber zur Gewährleistung des Versuchszwecks unabdingbar. Die leichten Schnittverletzungen des Schwanzes verheilen rasch, hinterlassen jedoch Narben, die die Eignung des Tiers für intravenöse Applikationen beeinträchtigen können.

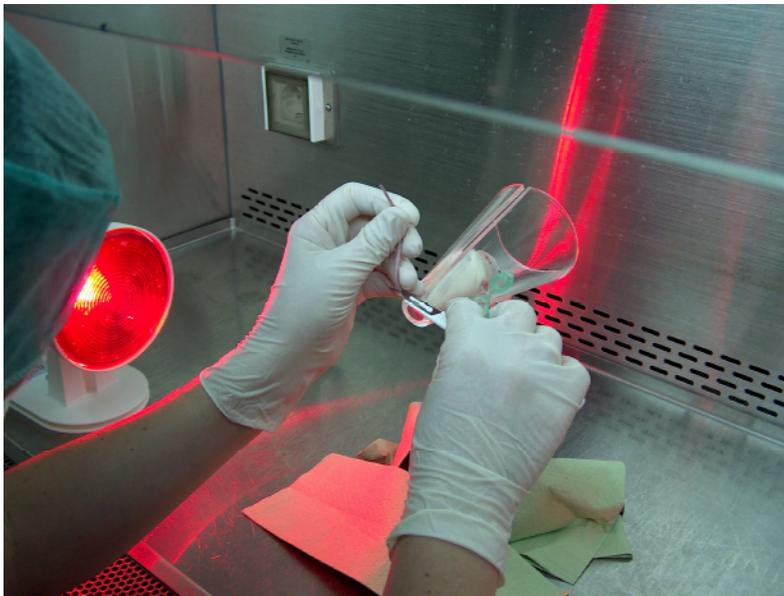


Abbildung: Anritzen der Schwanzvene bei einer Maus

-Punktion des retrobulbären Venenplexus

Die Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus wird bei Mäusen und Ratten häufig praktiziert. Es ist selbstverständlich, dass diese Technik der Blutentnahme ausschließlich in Narkose durchgeführt werden darf. Wichtig für die Punktion des retrobulbären Venenplexus ist auch die korrekte Fixierung des Tieres. Für Entblutungen, bei denen das Tier im Anschluss an den Eingriff noch in Narkose getötet wird, kann die Punktion des retrobulbären Plexus unproblematisch eingesetzt werden. Tierschutzrechtlich sehr umstritten ist die An-

wendung dieser Technik jedoch in solchen Fällen, in denen das Tier nach dem Eingriff weiterleben soll. Untersuchungen zur Auswirkung von Punktionen des retrobulbären Venenplexus bei der Ratte haben ergeben, dass bei sachgerechter Durchführung wesentliche Schädigungen des Auges oder Beeinträchtigungen des Wohlbefindens nicht auftreten (Beynen et al. 1988, van Herck et al., 1992). Bei sachgerechter Durchführung werden lediglich Bindegewebe, peribulbäres Fett und Venen punktiert. Andererseits werden jedoch auch viele mögliche Schadensfolgen beschrieben (Joint working group on refinement, 1993).



Abbildung: Punktion des retroorbitalen Plexus bei der narkotisierten Ratte

-Herzpunktion

Bei der Durchführung von Herzpunktionen besteht immer das Risiko der Entstehung einer Herzbeutelamponade (Eindringen von Blut zwischen Herzmuskel und Perikard) sowie eines Pneumothorax (Eindringen von Luft zwischen Lunge und Rippenfell) und der damit assoziierten funktionellen Beeinträchtigungen. Aus diesem Grunde sind Herzpunktionen ausschließlich für Entblutungen zulässig, d.h. diese Technik darf nur in Narkose eingesetzt werden und das Tier muss noch in Narkose getötet werden. Die Versuchstiere werden in narkotisiertem Zustand in überstreckter Rückenlage fixiert. Die Kanüle wird in der Medianlinie unmittelbar hinter dem Brustbein eingeführt und unter leichter Aspiration in Richtung zum Kopf, zur linken Körperhälfte und zum Rücken hin (Richtung: cranial, lateral, dorsal) geführt. Gelingt der Eingriff beim Ungeübten auf die beschriebene Weise nicht, sollten alle Vorkehrungen getroffen sein, um rasch den Brustkorb zu öffnen und das Herz unter Sichtkontrolle punktieren zu können. Geübte Personen sind unproblematisch in der Lage, Herzpunktionen erfolgreich an frisch getöteten Tier durchzuführen.

-Punktion großer Bauchgefäße

Zur terminalen Blutentnahme kann bei Maus und Ratte ebenfalls in Betracht gezogen werden, die Bauchaorta oder die Vena cava caudalis zu punktieren. Hierzu wird in tiefer Narkose die Bauchhöhle eröffnet und das Gefäß unter Sichtkontrolle punktiert oder eröffnet.

11.1.4. Gebräuchliche Techniken der Blutentnahme beim Kaninchen

-Punktion der Ohrvene

Beim Kaninchen lassen sich durch Punktion der Ohrvenen meist nur kleine Blutvolumina (wenige ml) gewinnen. Zur Venenpunktion wird das Gefäß am Ohransatz durch Fingerdruck aufgestaut.

-Punktion der zentralen Ohrarterie

Beim Kaninchen können auch große Blutmengen (bei schweren Tieren ca 30 ml) aus der Ohrarterie entnommen werden, ohne dass eine Narkose nötig ist und ohne dass es zu wesentlichen Belastungen für das Tier kommt. Eine leichte Hyperämie an der Ohrspitze reicht aus, um die Arterie so stark anschwellen zu lassen, dass sie mit einer Kanüle gut punktiert werden kann. Nachteil der Blutentnahme aus einer Arterie ist das hohe Risiko der Hämatombildung oder von Nachblutungen. Deshalb muss nach der Blutentnahme die punktierte Arterie an der Punktionsstelle oder proximal davon ausreichend lange (mitunter bis zu 5 Minuten) komprimiert werden, um die Blutung sicher zu stillen.

Zur Hyperämisierung des Ohres reicht oft ein leichtes Klopfen auf das Ohr mit den Fingerspitzen oder das Auszupfen von Haaren über der Einstichstelle aus. Alternativ kann der Effekt auch durch leichtes Erwärmen des Ohres, z. B. mit einer Wärmelampe, erzielt werden. Die Verwendung von Xylol und ähnlichen Stoffen, die durch eine Reizung der Haut eine Hyperämie bewirken, wird zum Teil aus Tierschutzgründen abgelehnt, da Xylol bei häufigerem Gebrauch zu Hautschäden führen kann, ist aber teilweise unvermeidbar.



Abbildung: Punktion der Ohrarterie beim Kaninchen

-Herzpunktion oder Punktion der großen Bauchblutgefäße
(siehe entsprechende Technik bei Maus und Ratte)

11.1.5. Belastungen durch Blutentnahmen

Bei Einhaltung der empfohlenen Maximalmengen und Mindestabstände zwischen Blutentnahmen ist im Regelfall von einer geringen bis mäßigen Belastung (Dauer <1 Tag) als Folge des Blutentzuges auszugehen. Auch bei der Punktion selbst entstehen bei sachgerechter Durchführung und entsprechender Gewöhnung der Tiere an die Prozedur nur kurzzeitig geringe Belastungen. Die gesamte Problematik von biologischen Effekten durch Blutverluste, bedingt durch einzelne oder wiederholte Blutentnahmen, ist ausführlich bei McGuill und Rowan (1989) beschrieben. Die Autoren diskutieren auch die Eignung unterschiedlicher Entnahmetechniken bei Ratte, Maus und Kaninchen. Techniken der Blutentnahme werden ausführlich von Grice (1964), Herbert und Kristensen (1986) sowie von Iwarsson et al. (1994) beschrieben. Jeder, der tierexperimentell arbeitet, sollte auch die Empfehlungen zur Blutentnahme der "Joint working group on refinement" (1993) lesen. Hier finden sich wertvolle Details und auch eine ausführliche Zusammenstellung der relevanten Literatur.

11.1.6. Literatur

- BEYNEN, A.C., et al. (1988), Assessment of discomfort induced by orbital puncture in rats. In: Beynen, A. C. & H. A. Sollovel (Eds.), New developments in biosciences: Their implications for laboratory animal science, S.431-436. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht
- GRICE, H.C. (1964), Methods for obtaining blood and for intravenous injections in laboratory animals, Lab.Anim.Care 14, 483-493
- HERBERT, W.J.& F. KRISTENSEN (1986), Laboratory animal techniques for immunology. In: Weir, D.M.(Ed), Handbook of experimental immunology 4.Ed., Volume 4: Applications of immunological methods in biomedical sciences, 133.1-133.36, Blackwell Scientific Publ., Oxford
- IWARSSON, K., L. LINDBERG & T. WALLER (1994), Common non-surgical techniques and procedures. In: Svendsen, P. and J. Hau (Eds.), Handbook of laboratory animal science, Vol. 1, S.229-272, CRC Press Inc., Boston
- JOINT WORKING GROUP ON REFINEMENT (1993), Removal of blood from laboratory mammals and birds, Laboratory Animals, 27, 1-22
- MCGUILL, M.W. & A.N. ROWAN (1989), Biological effects of blood loss: Implications for sampling volumes and techniques, Ilar News 31(4), 5-20
- VAN HERCK, H. et al. (1992), Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture, Lab. Anim. 27, 1-22

11.2 Gewinnung von Kot und Urin

Bei Mäusen, Ratten und Kaninchen ist es unüblich, Kot- und Urinproben durch direkte Entnahme am lebenden Tier zu gewinnen. Stattdessen wird der natürliche Absatz genutzt. Bei einmaligen Probengewinnungen ist es für den Experimentator zumutbar, auf das Absetzen von Kot oder Urin zu warten. Die Ausscheidung durch leichte Verunsicherung der Tiere beschleunigt werden. Dies kann beispielsweise durch das Einbringen der Tiere in eine neue Umgebung erreicht werden. Solche Tiere setzen häufiger Kot oder Urin ab.

Soll im Rahmen pharmakologischer oder toxikologischer Untersuchungen kontinuierlich Kot und Urin von Versuchstieren gesammelt werden, so werden hierfür besondere Sammelkäfige, sogenannte Stoffwechselkäfige, verwandt.

11.3 Injektionstechniken

Bei der Injektion von Substanzen in Versuchstiere muss der Experimentator über den Applikationsweg, über das maximal zu injizierende Volumen und die maximale Kanülenstärke entscheiden. Zu dieser Thematik existiert ebenfalls eine geeignete Empfehlung (Titel: „Empfohlene maximale Injektionsvolumina bei Versuchstieren“), die in Kooperation zwischen dem „Ausschuss für Tierschutzbeauftragte der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS)“ und dem Arbeitskreis 4 der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (TVT) erstellt wurde. In der vorliegenden Abhandlung werden Vorgaben dieser Empfehlung berücksichtigt, es werden jedoch keine maximalen Injektionsvolumina bzw. maximalen Kanülengrößen angegeben. Hierfür wird der interessierte Leser auf die Empfehlung von TVT und GV-SOLAS verwiesen.

11.3.1. Allgemeine Informationen

An Injektionslösungen sind folgende allgemeine Anforderungen zu stellen

- Isotonität
- pH-Neutralität (pH 7,0-7,3)
- Körperwärme
- Konzentration, chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften der Injektionslösung sollten so beschaffen sein, dass es nicht zu allgemeinen Schäden oder lokalen Reizungen kommt.

Hyper- und hypotone Lösungen oder Lösungen in einem unphysiologischen pH können zu erheblichen Schmerzen und Gewebeerstörung (z.B. der perivaskulärer Injektion) führen sowie zur Schädigung von Erythrozyten (Hämolyse).

Es können folgende Injektionswege unterschieden werden:

- intravenös (i.v.)
- intraperitoneal (i.p.)
- intramuskulär (i.m.)
- subcutan (s.c.)
- oral

Der Experimentator hat jedoch keine völlig freie Entscheidung über die Art der Applikation. Insbesondere muss berücksichtigt werden, dass die Verteilungsgeschwindigkeit der zu applizierenden Substanzen im Tierkörper vom Applikationsweg abhängig ist. Dabei nimmt die Verteilungsgeschwindigkeit in folgender Reihenfolge zu:

i.v. > i.p. > i.m. > s.c. > oral

Der subcutanen Injektion ist prinzipiell der Vorzug zu geben, sofern es sich nicht um lokal reizende Substanzen handelt, die streng intravenös verabreicht werden müssen. Intramuskuläre Injektionen sind grundsätzlich für die meisten Tiere schmerzhaft: das Injektionsvolumen sollte daher so klein wie möglich sein, bzw. die Injektionslösung sollte auf mehrere Stellen verteilt werden. Die intramuskuläre Injektion sollte langsam erfolgen. Bei intravenöser Applikation ist zu berücksichtigen, dass Emulsionen und partikuläre Substanzen sowie Luftbläschen nicht auf diese Weise appliziert werden dürfen (Emboliegefahr!). Werden bestimmte Substanzen wegen suboptimaler Technik neben die Vene statt in sie hinein verabreicht (sogenannte paravenöse Injektion), so kann es zu sehr schmerzhaften Venenentzündungen und zu Obliterationen der Gefäße kommen. Bei intravenösen Verabreichungen sollte daher die Kanüle möglichst weit in das Gefäß eingeführt werden und der korrekte Sitz sollte möglichst durch Aspiration geprüft werden. Bei Verwendung von Metallnadeln kann die Vene durch plötzliche Bewegung des Tieres beschädigt werden, so dass nicht-isotone Lösungen vorzugsweise über einen Katheter verabreicht werden sollten. Bei der intraperitonealen Injektion besteht die Gefahr einer versehentlichen Punktion von Bauchorganen (z.B.: Blase, Darm, Leber, Milz).

11.3.2. Orale Applikationen bei Maus, Ratte und Kaninchen:

Langfristige orale Verabreichungen von Substanzen werden üblicherweise durch Beimischung der Substanz in Trinkwasser oder Futter realisiert. In vielen Fällen (instabile Substanzen, präzise Dosierung) ist eine gezielte Verabreichung durch Schlundsondierung jedoch nicht zu umgehen.

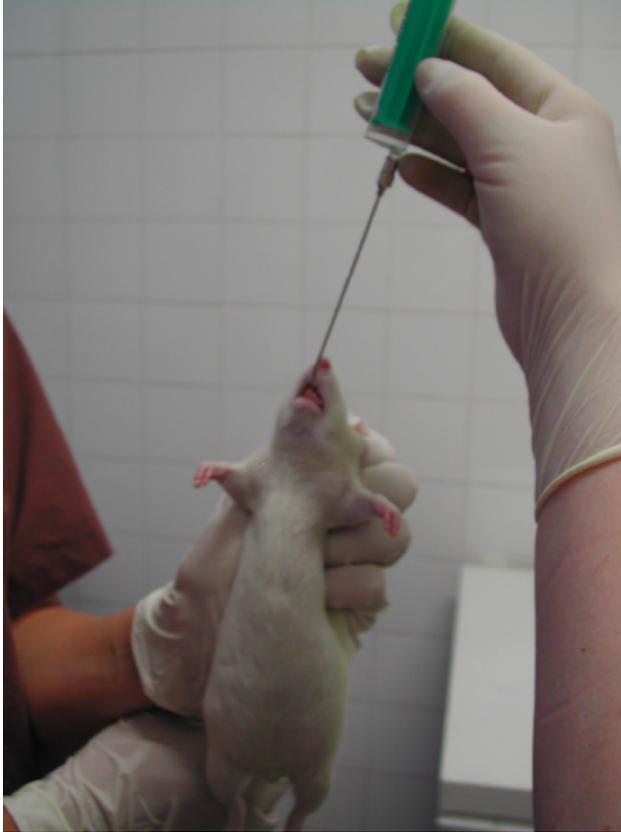


Abbildung: Schlundsondierung bei der Ratte

11.3.3. Intravenöse Applikationen bei Maus, Ratte und Kaninchen:

Intravenöse Injektionen erfolgen bei Maus und Ratte in die Schwanzvene, beim Kaninchen in die Ohrrendvene.



Abbildung: intravenöse Injektion bei der Maus in die Schwanzvene und beim Kaninchen unter Verwendung eines Butterfly's in die Ohrvene

11.3.4. Intraperitoneale Applikationen bei Maus, Ratte und Kaninchen:



Abbildung: intraperitoneale Injektion bei Maus und Kaninchen

11.3.5. Intramuskuläre Applikationen Ratte und Kaninchen:

Intramuskuläre Injektionen werden bei der Maus prinzipiell sehr selten durchgeführt. Eine gewisse Bedeutung hat die Injektion in den M tibialis narkotisierter Mäuse im Rahmen von DNA-Immunisierungen. Bei Ratte und Kaninchen erfolgt die intramuskuläre Injektion in den Oberschenkel.



Abbildung: intramuskuläre Injektion beim Kaninchen

11.3.6. Subcutane Applikationen bei Maus, Ratte und Kaninchen:

Subcutane Applikationen erfolgen bei Maus, Ratte und Kaninchen unter die Rückenhaut.

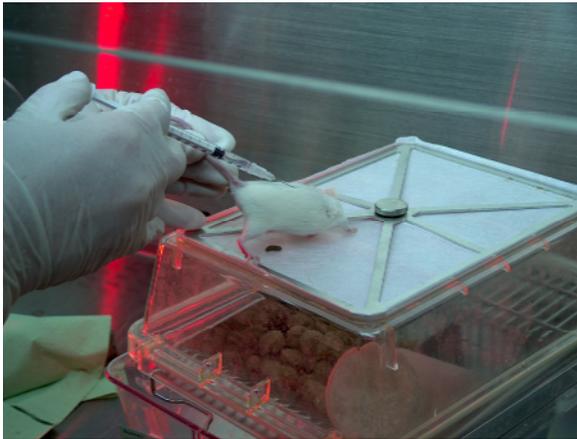


Abbildung: Subcutane Injektion bei Maus und Kaninchen