综述·进展

关于禽类实验动物感染实验中的安乐术的分析与思考

韩凌霞[1]，王兴童[2]，陈洪岩[1]*

（1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物与比较医学团队，哈尔滨 150001；
2. 东北农业大学动物医学院，哈尔滨 150030）

【摘要】 实验动物病原学感染实验在兽医科学和生物制品研究等方面发挥越来越大的作用。我们对从 2009 年 1 月 1 日至 2014 年 4 月正式发表在美国国家生物技术信息中心（NCBI）的以禽类进行感染试验的科研报告进行了文献汇总，重点关注动物福利，尤其是安乐死方面。通过对 247 项研究报告的调查，虽然几乎所有报告都声称通过其所在单位的动物实验和管理福利委员会的审核，但同类感染实验中采用的临终终点的判定和安乐术不尽相同，麻醉途径和剂量也缺乏标准。文章对目前国际上报道的安乐术的特点也做了比较。

【关键词】 禽类实验动物；感染实验；安乐术
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847（2015）01-0105-05
Doi：10. 3969/j. issn. 1005 - 4847. 2015. 01. 020

Analysis and consideration of euthanasia for poultry laboratory animals in infection experiments

HAN Ling-xia[1], WANG Xing-tong[1,2], CHEN Hong-yan[1]

（1. Unit of Laboratory Animal and Comparative Medicine, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China;
2. College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030）

【Abstract】 Laboratory animal experiments of pathogenic infection play more and more roles in animal medicine and biological product research. We surveyed the scientific papers involved with poultry infection experiments published in NCBI Pubmed from Jan. 1st, 2009 through April 29th, 2014, focused on the "humane endpoint" and euthanasia. Among the 247 reports, we found that the euthanasia methods adopted by the researchers were diverse, though almost all authors claimed that they complied with the Animal Experiment Care and Welfare Committees. Carbon dioxide inhalation and anesthetic injection are the most commonly used ways, while the reagents and doses are various. Moreover, the judging standards for experimental or humane end-point vary across the experiments, there are still no standard routes or doses when using anesthetics yet. The paper also compares the characteristics of reported euthanasia methods.

【Key words】 Poultry laboratory animal; Infection experiment; Euthanasia

鸡和鸭不仅是养禽业最主要的家禽，还是生命科学研究最常用的禽类实验动物。自从 1789 年法国的巴斯德用鸡人工感染霍乱开始，鸡就作为实验用动物用于科学研究。无特定病原体（SPF）鸡培育成功后，禽类实验动物由于繁殖快、卵生、体型小、试验成本低、胚胎或胚胎细胞容易获得、病原学背景干净等特点[1]，已越来越多地应用于比较医学、胚胎发育学、病毒学和兽医学等多个生命学科，并且在生物制品研发中，被广泛用于安全性和效力评价。一般来说，要想获得客观、真实、有重复性的动物实验数据，在动物实验实施过程中必须考虑包括动物饲养环境设施、实验动物的选择、试验程序、数据分析

[基金项目]国家自然科学基金（31101800）；科技部支撑项目（2013BAK11B02）。
[作者简介]韩凌霞（1971 - ），女，博士，研究方向：实验动物学。E-mail：hlx1993@126. com
[通讯作者]陈洪岩，博士，研究员。E-mail：chenhongyan@caas. cn

等诸多因素,但另一个关键因素却常受到忽略,即动物福利,尤其实验动物个体结束生命终点的判断和处死的方式。事实上,疫病感染试验是动物实验福利伦理研究中的一个重要命题,因为在所有动物应用领域,病原体感染动物实验是最残忍和最痛苦的研究类别——以动物自身健康受到直接损害为目的,而且通常不给予治疗。

目前国际上对禽类实验动物在病原体感染实验中的安乐术尚无标准。我们对 2009 年至 2014 年被美国国家生物技术信息中心(NCBI)PubMed 收录的所有涉及禽类感染病原体试验的研究性报告进行了文献调查和汇总,共计 247 篇,实验内容主要是野生型或基因工程病毒、细菌、体表寄生虫或原虫的体内感染,重点关注禽类实验过程中的福利问题,包括实验过程结束终点的判定、处死方式。同时介绍了世界动物卫生组织(WHO)、国际兽疫局(OIE)和其他国际组织在这些方面的相关规定。

由于鸽子、鹌鹑、山鸡和鹅等其他禽类目前国际上尚无统一的实验动物化饲养标准,缺乏可比性,所以本综述中暂未考虑。

1 实施安乐术(euthanasia)或人道终点(humane endpoint)的判定

动物安乐术,是指动物在无疼痛下死亡的手段,以人道的方法处死动物的过程[2],即使动物没有惊恐或焦虑而安静、无痛苦地死亡。

人道终点定义为某个实验动物的痛苦应该被避免、终止、最小化或者减少的时间点(OIE)[3],此时应通过给予治疗以减轻、终止痛苦,或将实验动物从研究中移除或者是被人道地处死。我国实验动物管理的条款中也称为“仁慈终点”,在科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》中,将仁慈终点解释为“动物实验过程中,选择动物表现疼痛和压抑的较早阶段为实验的终点”,并规定“在不影响实验结果判定的情况下,应选择“仁慈终点”,避免延长动物承受痛苦的时间”。

在文献调查中我们发现,几乎所有的作者都声称遵守了动物福利,但是对结束病原体感染动物生命的判定标准,即人道终点的判定不一而同,除出于研究目的在既定时间为采集组织而终止个体生命外,对患病个体采取人道终点的判定标准提及很少,在 247 份感染了致病性病原体的禽类实验研究报告中,只有 11 例(4.5%)对实施安乐死时有明确描述,包括五种类似的说法:(1)家禽饮食废绝,或者患病严重[4];(2)临床症状变得严重且明显[5];(3)嗜睡,沉郁,不能活动或呼吸困难[6];(4)共济失调或瘫痪,濒死[7];(5)出现下列一个以上症状,呼吸系统受损,抑郁,腹泻,皮肤或肉髯发绀,面部和/或头部水肿,有神经症状,濒死或死亡[8]。

从上可知,研究者们虽然都以临床症状为判定依据,但临床症状的严重程度却不同。事实上,某些症状对特定的疫病来说是一过性的,而且判定有很强的主观性。

2 安乐术的方式

只有 30/88(34.1%)的论文明确说明动物实验结束时所采用的安乐术方式,而其他只是声明按照各自批准的“实验动物管理和使用委员会”[9-11]进行实验,甚至更原则性地声称“将研究中涉及的动物进行人道的安乐死”[4,12,13]。在报告的方法中,包括以下几种:

2.1 二氧化碳(CO_2)吸入式

将禽置于一个装有混合气体的装置(70% CO_2)中使禽类窒息[14]。CO_2 容易制备和计量,使用便捷,本次文献调查中,利用 CO_2 窒息的报告占 6.80%(8/88)。接种或感染病原体日龄包括 1 周龄[15]、2 周龄接种伤寒沙门氏菌[16]、3 周龄[17]、4 周龄[18,19]、13 周龄[20]等。过量吸入 CO_2 会引起代谢性酸中毒,脑脊液和神经元的酸度增加,从而导致神志不清,长时间暴露则死亡。这既是麻醉的作用机制,也是急性 CO_2 中毒的原因。动物暴露于 CO_2 不会立即丧失意识,缺氧、CO_2 蓄积和刺激作用会引起病理改变,缺氧造成细胞无氧代谢,大量丙酮酸、乳酸等中间产物蓄积;脑膜内渗透压升高形成脑水肿;心率增快,心输出量增加,平均肺动脉压、肺血管阻力增高,心脏负荷增加,严重者甚至心室颤动或心跳骤停。也有心动过缓、心输出量减少和血压下降的报道。另外,CO_2 还可以使蛋白质、肽、氨基酸形成 N-羧基衍生物,造成神经毒性[21]。

有些鸟类,例如野鸭,能够减缓心率,较长时间屏气,因此鸭、潜鸟和雏鸡不适合使用 CO_2 吸入法处死[22]。如果实验数据来自脑组织,也不适合使用。事实上,一些国际组织认为,处死幼禽和成年鸟类的首选方法是使用过量的麻醉剂和适当的麻醉方法。例如,欧洲保护脊椎动物用于实验等科研用途公约(European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scien-

tific Purposes)认为使用麻醉剂处死动物更适当。从实际操作上来讲,高浓度的 CO_2 不仅使未丧失意识的动物感觉到窒息的痛苦,还有可能由于过度拥挤而窒息致死,另外对操作者也存在通过容器或设备泄露误吸 CO_2 的风险[22]。

2.2 巴比妥类药物麻醉

该方法适用于麻醉和致死所有种类的家禽,但是注射前需要正确保定动物。巴比妥类药物抑制大脑皮层、网状激活系统、脑桥以及延髓的心肺中枢,对 CO_2 升高的敏感性降低,呼吸频率和深度下降,甚至呼吸停止。还能降低脑组织的血流量、氧耗和颅内压,作用于血管引起血管扩张,血压和心输出量降低,抑制心肌收缩,作用于心脏传导系统造成心率失常,甚至心脏衰竭。但巴比妥类药物无镇痛作用[23]。高剂量注射麻醉药物和镇静药物可导致动物昏迷和死亡,通常联合使用巴比妥盐和其他药物。文献调查中戊巴比妥钠的使用比例为 27.6% (8/29)。

使用戊巴比妥类盐,有效的剂量和给药途径是保证动物快速昏迷和死亡的关键。静脉注射是最佳给药途径,皮下注射也可用于安乐术,当药物没有刺激性时,也可以腹腔或肌肉给药[24]。应随时监控,确保动物死亡。所查文献中戊巴比妥钠的使用方式有多种,分别为静脉注射 100 mg/kg[8,25,26] 或 2.5 g/0.5 mL[27],或腹膜内注射 150 mg/kg 体重再放血致死[28],或者肌肉注射 22 mg/kg 体重[29]。由于某些药物组合和给药途径可能给禽带来痛苦,所以该方法只适用于无意识的动物[26]。

2.3 颈椎脱位

通过人工或机械拉伸禽的颈部,造成禽脊髓断裂,或用机械钳压碎禽的脊椎,造成脊索严重损伤,呼吸停止,血液无法供应到大脑,因脑缺氧死亡。该方法可使禽颈部的血管瞬间同时切断和死亡,但需要操作者具备一定的技巧和力量。当需处死的动物数量小,且无其他更适合方法时可以采用这种方式,尤其适合处死体重小于 3 kg 的禽类[30]。一项利用 15 周龄野鸭感染低致病性禽流感的试验,采用先吸入 CO_2 窒息再脱颈椎的方式[27];另外,对 31 日龄雏鸡腹腔接种网状内皮组织增生症病毒(REV)[31]、3 周龄罗曼褐雏鸡[32]和 162 日龄产蛋来航鸡[33]采取了颈椎脱位的方式。一项涉及鸡棘皮刺螨(*Dermanyssus gallinae*)的研究同样采用先吸入含 70% CO_2 的混合气体几分钟后再斩首的方式处死动物[34]。

2.4 其他处死方式

调查中还报道了其他安乐死方式。例如对 10 周龄鸡胸肌注射盐酸氯胺酮(pectoral injection)[29],对 27 日龄的白来航雏鸡枕窦注射硫喷妥钠(Nesdonal)[35], 5 周龄鸡用氯胺酮/甲苯噻嗪(ketamine/xylazine)麻醉[36],但都没有介绍使用剂量。另有一例使用英特威公司生产的一种禽用麻醉剂 T61,是盐酸丁卡因(tetracaine hydrochloride)、碘环己铵(mebezonium iodide)和乙甲丁酰胺(embutramide)的混合物[37]。

对滴鼻接种 H5N1 禽流感的 5 周龄鸡使用乙醚安乐死,但没有介绍乙醚的作用时间以及操作过程[38]。这在数量可观的禽流感感染实验中很少见报道。

在国际组织公约中,还推荐有其他物理方式进行安乐术,例如利用低频率(30 ~ 60 Hz)电流维持 3 秒钟,击晕和处死倒挂在铰链上或浸没在击晕池里的禽;或者直接斩首。后者有效而不需要监测,但是喷溅的血液会污染工作区域,极大增加生物安全风险,且如果禽不是立即丧失意识,将遭受痛苦[30]。在所调查的文献中,仅有一例采用击打的方式使 3 周龄的鸡无意识后放血致死[6]。

从上述可以看到,与处死实验小鼠采用颈椎脱位的国际通用方式相比,不论国际公约还是科学研究部门,目前对病原性感染禽类的处死方式还没有达成共识。但毋庸置疑,人道终点的判定和处死的方式对来自采集组织的某些实验数据必然产生影响。譬如,若要对实验动物的心血管系统进行大体病变、组织学观察,采用 CO_2 吸入式致死的方式就不适合;若要检测血液生化指标,则化学类麻醉剂的接种途径应该慎重。

2.5 其他影响动物实验结果的因素

除了人道终点和安乐术,在本次文献调查中,还发现其他不符合实验动物福利的问题。某项疫病感染实验过程中对实验动物进行了连续照明[10],而众所周知光照强度和周期对动物的生理学及行为学有明显的影响,各国禽类饲养规程中都有明确的光照强度和昼夜交替时间规定。连续照明与该实验目的并无直接关系,显然违反实验动物福利的基本规定[39]。另外,实验过程中是定量饲喂还是自由采食[10],也是值得考虑的问题。

3 展望

实验动物为人类的健康研究做出了巨大的牺牲,当它们必须被感染各种烈性、致病性病原体进行科学研究实验时,研究者有义务采取尽可能适当、合理的方式,减少动物所遭受的痛苦。从我们的文献调查,国际上对禽的感染实验过程中的动物福利,特别是人道终点和安乐术尚无共识,与对小鼠、大鼠等常规实验动物采用脱颈椎安乐术的通用模式还存在差距。当然,针对不同日龄、种属的实验禽类采取何种安乐术,必须同时考虑接种病原体的生物学特性和研究目的,究竟何种方式最为恰当,还需要实验动物工作者和实验动物使用者的共同思考和努力。

参 考 文 献

[1] 周琦, 陈洪岩, 马得莹. 禽类实验动物发展的影响因素及对策(一) [J]. 畜牧兽医科技信息, 2006, 12, 21 - 23.

[2] 方喜业, 邢瑞昌, 贺争鸣. 实验动物质量控制 [M]. 北京: 中国标准出版社. 2008: 1290.

[3] http://www.oie.int/en/animal-welfare/animal-welfare-key-themes/.

[4] Iqbal M, Xiao H, Baillie G, et al. Within-host variation of avian influenza viruses [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009, 364 : 2739 - 2747.

[5] Vergara-Alert J, Busquets N, Ballester M, et al. The NS segment of H5N1 avian influenza viruses (AIV) enhances the virulence of an H7N1 AIV in chickens [J]. Vet Res, 2014, 45 : 7.

[6] Steglich C, Grund C, Ramp K, et al. Chimeric Newcastle disease virus protects chickens against avian influenza in the presence of maternally derived NDV immunity [J]. PLoS One, 2013. 8: e72530.

[7] Yao DW, Xu JR, Zhou ZL, et al. Microsatellite instability in chicken lymphoma induced by gallid herpesvirus 2 [J]. PLoS One, 2013, 8 : e68058.

[8] Vergara-Alert J, Moreno A, Zabala JG, et al. Exposure to a low pathogenic A/H7N2 virus in chickens protects against highly pathogenic A/H7N1 virus but not against subsequent infection with A/H5N [J]. PLoS One, 2013, 8 : e58692.

[9] Kwon JS, Lee HJ, Jeong SH, et al. Isolation and characterization of avian metapneumovirus from chickens in Korea [J]. J Vet Sci. 2010, 11: 59 - 66.

[10] Costa-Hurtado M, Afonso CL, Miller PJ, et al. Virus interference between H7N2 low pathogenic avian influenza virus and lentogenic Newcastle disease virus in experimental co-infections in chickens and turkeys [J]. Vet Res, 2014, 45: 1.

[11] Rémy S, Blondeau C, Le Vern Y, et al. Fluorescent tagging of VP22 in N-terminus reveals that VP22 favors Marek's disease virus (MDV) virulence in chickens and allows morphogenesis study in MD tumor cells [J]. Vet Res, 2013, 44: 125.

[12] Iqbal M, Yaqub T, Mukhtar N, et al. Infectivity and transmissibility of H9N2 avian influenza virus in chickens and wild terrestrial birds [J]. Vet Res, 2013, 44: 100.

[13] Cao Z, Han Z, Shao Y, et al. Proteomics analysis of differentially expressed proteins in chicken trachea and kidney after infection with the highly virulent and attenuated coronavirus infectious bronchitis virus in vivo [J]. Proteome Sci. 2012, 10: 24.

[14] Marangi M, Morelli V, Pati S, et al. Acaricide residues in laying hens naturally infested by red mite dermanyssus gallinae [J]. PLoS One. 2012, 7: e31795.

[15] Blondel C J, Yang H J, Castro B, et al. Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by Salmonella enterica serotypes Gallinarum and Enteritidis [J]. PLoS One. 2010, 5(7): e11724

[16] Pezoa D, Yang HJ, Blondel CJ, et al. The type VI secretion system encoded in SPI-6 plays a role in gastrointestinal colonization and systemic spread of Salmonella enterica serovar Typhimurium in the chicken [J]. PLoS One. 2013, 8 (5): e63917.

[17] Yao DW, Xu JR, Zhou ZL, et al. Microsatellite instability in chicken lymphoma induced by gallid herpesvirus 2 [J]. PLoS One. 2013, 8: e68058.

[18] Kumar S, Militino Dias F, Nayak B, et al. Experimental avian paramyxovirus serotype-3 infection in chickens and turkeys [J]. Vet Res. 2010, 41: 72.

[19] Arsenault RJ, Napper S, Kogut MH. Salmonella enteric Typhimurium infection causes metabolic changes in chicken muscle involving AMPK, fatty acid and insulin/mTOR signaling [J]. Vet Res. 2013, 44(1): 35.

[20] Kwon H M, LeRoith T, Pudupakam RS, et al. Construction of an infectious cDNA clone of avian hepatitis E virus (avian HEV) recovered from a clinically healthy chicken in the United States and characterization of its pathogenicity in specific-pathogen-free chickens [J]. Vet Microbiol. 2011, 147: 310 - 319.

[21] 杜旭芹, 郝凤桐. 二氧化碳中毒研究进展 [J]. 中国工业医学杂, 2010, 23, (4): 273 - 276.

[22] European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg, 18. III. 1986

[23] 陈杖榴, 袁崇辉, 曾振灵等. 兽医药理学 [M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版社,2010: 97.

[24] 魏荣, 李卫华, 刘陆世, 等. 农场动物福利良好操作指 [M]. 第 1 版. 北京:中国农业出版社, 2011: 82 - 83.

[25] Costa TP, Brown JD, Howerth EW, et al. Homo- and heterosubtypic low pathogenic avian influenza exposure on H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in wood ducks (Aix sponsa) [J]. PLoS One. 2011. 6:e15987.

[26] Pantin-Jackwood M, Swayne DE, Smith D, et al. Effect of species, breed and route of virus inoculation on the pathogenicity of H5N1 highly pathogenic influenza (HPAI) viruses in domestic ducks[J]. Vet Res. 2013. 44:62.

[27] Cagle C, To TL, Nguyen T, et al. Pekin and Muscovy ducks respond differently to vaccination with a H5N1 highly pathogenic avian influenza (HPAI) commercial inactivated vaccine[J]. Vaccine. 2011. 29(38): 6549 - 6557.

[28] Xu Q, Chan Y, Zhao W M, et al. DNA methylation and regulation of the CD8A after duck hepatitis virus type 1 infection[J]. PLoS One. 2014. 9: e88023.

[29] Yan F, Zhao Y, Hu Y, et al. Protection of chickens against infectious bronchitis virus with a multivalent DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine[J]. J Vet Sci. 2013. 14: 53 – 60.

[30] Office International Des Epizooties. Terrestrial Animal Health Code [M]. 2014: Chapter 7. 6. er 7. 2.

[31] Xue M, Shi XM., Zhao Y, et al.. Effects of reticuloendotheliosis virus infection on cytokine production in SPF chickens [J]. PLoS One. 2013, 8: e83918.

[32] Jansen CA, de Geus ED, van Haarlem DA, et al. Differential lung NK cell responses in avian influenza virus infected chickens correlate with pathogenicity [J]. Sci Rep. 2013, 3: 2478.

[33] Johnston CE, Hartley C, Salisbury AM, et al. Immunological changes at point-of-lay increase susceptibility to Salmonella enterica Serovar enteritidis infection in vaccinated chickens [J]. PLoS One. 2012, 7 (10): e48195.

[34] Marangi M, Morelli V, Pati S, et al. Acaricide residues in laying hens naturally infested by red mite Dermanyssus gallinae [J]. PLoS One. 2012, 7(2): e31795.

[35] Porcheron G, Chanteloup N K, Trotereau A, et al. Effect of fructooligosaccharide metabolism on chicken colonization by an extra-intestinal pathogenic Escherichia coli strain [J]. PLoS One. 2012, 7 (4): e35475.

[36] Penski N, Härtle S, Rubbenstroth D, et al. Highly pathogenic avian influenza viruses do not inhibit interferon synthesis in infected chickens but can override the interferon-induced antiviral state [J]. J Virol. 2011, 85: 7730 – 7741.

[37] Volmer C, Soubies SM, Grenier B, et al. Immune response in the duck intestine following infection with low-pathogenic avian influenza viruses or stimulation with a Toll-like receptor 7 agonist administered orally [J]. J Gen Virol. 2011, 92: 534 – 43.

[38] Suzuki K, Okada H, Itoh T, et al. Association of increased pathogenicity of Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens with highly efficient viral replication accompanied by early destruction of innate immune responses [J]. J Virol. 2009, 83: 7475 – 7486.

[39] 刘艳, 王珑. 浅谈动物实验过程中实验动物福利问题 [J]. 中国公共卫生管理. 2010, 26(1): 113 – 114.

[收稿日期] 2014-09-01