



Norecopa  
Veterinærinstituttet  
Postboks 750 Sentrum  
0106 Oslo  
[www.norecopa.no](http://www.norecopa.no)

Saksbehandler: Adrian Smith ([adrian.smith@vetinst.no](mailto:adrian.smith@vetinst.no))

15. desember 2008

## **Tåklipping av mus: en evaluering av metoden og alternativene**

1. Bakgrunn for uttalelsen .....	2
2. Innledning .....	2
3. Begrepsforklaring .....	3
4. Ulike merkemetoder .....	4
1. Tåklipping .....	4
2. Øremerking – hull i gitte mønster .....	5
3. Øremerking -metallmerke .....	5
4. Haleklipping .....	6
5. Tatovering .....	6
6. ID-chip (transponder) .....	7
7. Blodprøver .....	7
8. Applikasjon av fargestoff på huden, hårklipping o.l. ....	7
9. Spytt/epitelceller fra munnhulen .....	8
10. Rektalskrape/avføringsprøver .....	8
11. Uttak av hårfollikler .....	8
12. Øreavtrykk .....	9
5. Forskning på tåklipping og andre metoder .....	9
6. Viktige momenter ved metodevalg .....	10
7. Praksis i andre land .....	13
8. Konklusjon .....	15
9. Litteratur .....	17

## 1. Bakgrunn for uttalelsen

1. FDU oversendte 02.05.08 til Mattilsynet klager på et vedtak av 26.02.08 om å tillate tåklipping som en metode for identifikasjon og genotyping av genmodifiserte mus. FDU hadde satt som vilkår for tillatelsen at tåklipping ikke må skje på dyr som er eldre enn 10 dager, at kun én tå på hvert bakbein kan klippes og at labben må bedøves med lokalbedøvelse (gel eller dypp) før klipping. Klipping må foretas før beinvev og beinhinne er dannet. I søknaden om dyreforsøk som lå til grunn for FDU's behandling av saken, var det videre spesifisert at det ikke skulle klippes nærmere kroppen enn første tåledd. Metoden bør derfor omtales som **tåtupp-klipping**. FDU anså andre metoder som øremerking å være minst like store inngrep. FDU imøteså undersøkelsen av effekter av tåklipping fra Universitetet i Zurich og vil sammenligne disse med resultater fra undersøkelser av andre merkemetoder. Ut ifra tilgjengelig kunnskap og erfaringer kunne ikke FDU se at tåtuppsklipping under de gitte vilkår, vil være spesielt belastende sammenlignet med alternative merkemetoder.
2. I brev av 01.07.08 til Norecopa spurte Forsøksdyrutvalget (FDU) om en vurdering av ulike strategier for tåklipping hos gnagere (tidspunkt for klipping, hvor langt inn på hver tå det klippes, antall labber hvor tær klippes, antall tær som klippes pr. labb) i forhold til andre relevante metoder for merking og vevsprøvetaking når det gjelder dyrevern og anvendelighet. I svarbrev av 11.08.08 sa Norecopa seg villig til å påta seg oppdraget. Et tidlig utkast til uttalelsen ble diskutert på Norecopas styremøte den 17.09.08.
3. I sitt brev av 24.09.08 tok Mattilsynet klagen til følge og omgjorde vedtakene gjort av FDU. Mattilsynet påpeker i sin begrunnelse at det dreier seg om fjerning av en legemsdel som strir imot Dyrevernavlovens grunnprinsipper, at tvil skal komme dyrene til gode og at det foregår vitenskapelige undersøkelser av metoden. Det settes videre spørsmålsteget ved oppfatningen om at spedyr ikke føler smerte. Inntil resultatene av undersøkelsene foreligger, velger Mattilsynet å være restriktiv.

## 2. Innledning

Pålitelig og gjentagbar identifikasjon av individene med et minimum av stress til dyret er en grunnleggende og helt nødvendig faktor i kvalitetssikringen av de fleste dyreforsøk. Den økende bruken av genmodifiserte dyr i laboratorieforsøk, hvor store antall dyr avles frem i håp om å produsere individer med den ønskede genotypen, har skapt et behov for individuell merking og vevsprøvetaking fra så unge dyr som mulig, av praktiske og økonomiske årsaker. Tidlig avlaving av overskuddsdyr kan også hevdes å ha dyreetiske fordeler, fordi den eliminerer risikoen for lidelse i individer som til slutt ikke blir benyttet i forsøk allikevel.

Det er få publiserte studier av metodene som kan benyttes til vevsprøvetaking på unge genmodifiserte dyr, og enda færre adferdstudier av effektene som disse metodene har på dyrene på lengre sikt.

Det er viktig å skille mellom kvantitativ og kvalitativ genotyping. Når nye transgene muselinjer etableres, ønsker man ofte å måle kvantitativt hvordan det aktuelle genet er inkorporert i genomet (antallet kopier og plassering). Til slike undersøkelser er det vanlig å bruke metoder av typen Southern blot. I etablerte linjer er det vanligvis tilstrekkelig å

detektere genet kvalitativt (for å se om dyret er transgent eller ikke) og i disse tilfellene kan metoder som PCR, som er basert på oppformering av DNA fra små prøver, anvendes. Med andre ord avgjør formålet med vevstypingen hvor mye vev man trenger å ta fra dyret. Det er utviklet en rekke relativt ikke-invasive metoder for å ta DNA-prøver til PCR-testing, men når det gjelder kvantitativ vevstyping er man henvist til invasive metoder som i praksis begrenser seg til amputasjoner: haleklipping og tåklipping.

Avgjørelser om metodevalg som allerede er tatt i ulike forskningsmiljøer (både i Norge og utlandet), ser derfor for det meste ut til å ha blitt tatt uten forankring i helhetlige og komplette vitenskapelig-baserte studier, og er i stor grad basert på forskernes subjektive oppfatninger eller antagelser basert på ekstrapolering fra erfaringer hos mennesker. En gjennomgang av litteraturen viser at tåklipping er omtalt mer positivt i eldre publikasjoner og retningslinjer. Norecopa har ikke funnet histologiske eller elektrofysiologiske studier av nerveforsyningen i tærne hos gnagere, som kunne kaste lys på om det finnes et anatomisk/fysiologisk grunnlag for å vurdere dyrenes evne til å oppleve smerter ved tåtupp-klipping i den aktuelle alderen.

Det er et anerkjent konsept i moderne forsøksdyrlære at metodevalg skal basere seg på en oppveining av flere faktorer:

- metodens vitenskapelige kvalitet og reproduserbarhet
- effekten som metoden har på individet som den brukes på

Disse to faktorer bør gå foran praktiske og økonomiske hensyn.

Det er etter Norecopas oppfatning et behov for lignende evalueringer av metodene som brukes til merking og vevsprøvetaking hos vilt

(<http://www.nc3rs.org.uk/category.asp?catID=79>) og fisk i forsøk

(<http://oslovet.veths.no/gardermoen.pdf>).

### 3. Begrepsforklaring

Forskriften om forsøk med dyr §2 gir retningslinjer for hva som kan betegnes som 'enkel identitetsmerking'. Merketmetoder er ikke å regne som dyreforsøk hvis 'det ikke er grunn til anta at forsøket vil påvirke dyrets normale livsutfoldelse eller medføre annet enn helt forbigående lett smerte eller ubehag'. Denne type skille mellom regulerte og ikke-regulerte prosedyrer finnes også i en del andre land, f.eks. Storbritannia:

*'Blood or DNA sampling solely to establish the identity or provenance of an animal would not be regulated if the intervention caused no more than momentary discomfort or distress. Methods of marking or identification, such as toe clipping, which can cause suffering in excess of this threshold, are regulated when carried out for an experimental or other scientific purpose. ([www.nc3rs.org.uk](http://www.nc3rs.org.uk))*

Tåklipping har fått en del medieoppslag i Norge, bl.a.

1. Forskere vil lemleste mus  
([www.nrk.no/nyheter/distrikt/ostlandssendingen/1.5879860](http://www.nrk.no/nyheter/distrikt/ostlandssendingen/1.5879860)).
2. Innlegg i Aftenposten 10.06.08 fra Bodil Ekerhovd Damsgaard, Oslo som mener at tåklipping går ut over musens evne til å klatre og stelle seg selv.
3. Innlegg i Aftenposten 14.06.08 fra Janicke Nordgreen og Torunn Fosse, Norges veterinærhøgskole, som poengterer at det er nervesystemet som avgjør om nyfødte

dyr kan føle smerte, ikke størrelsen på prøven eller hardheten i skjelettet. Forfatterne påpeker at forskningen tyder på at kroppens smertedempende systemer antageligvis ikke er ferdig utviklet ved fødsel, slik at nyfødte kan oppleve et stimulus som mer smertefullt enn voksne. I tillegg "huskes" smerte påført i nyfødtp perioden av nervesystemet, slik at dyrene kan få økt smertefølsomhet senere i livet.

Omtalene gir imidlertid ikke alltid en presis beskrivelse av metoden som Forsøksdyrutvalget ga tillatelse til, se punkt 1.1 ovenfor.

## 4. Ulike merkemethoder

I dette avsnittet beskrives kort de fordelene og ulempene med ulike metoder for identitetsmerking og vevsprøvetaking på dyr.

### 1. Tåklipping

Fordeler:

- Den er en permanent merkemethode med liten risiko for forveksling av individer (Kumar, 1979)
- Den fremskaffer tilstrekkelig DNA for kvantitativ genotyping
- Den gir tid til å identifisere ønskede genotyper før avvenning (Nadon & Draeger, 1996)
- Det rapporteres at tuppen på en tå på forbenet vil vokse ut igjen hos mus dersom amputasjonen er distal for det ytterste tåleddet (Borgens, 1982)
- Metoden er enkel og billig. Det kreves imidlertid aktsomhet dersom kun det ytterste leddet av tåen skal fjernes
- Metoden krever minimal fengsling (dyrets bakpart løftes etter halen eller dyret løftes i nakkeskinnet, slik moren løfter sine unger)
- Lokalanestesi av foten foretas enkelt med isspray
- Avlesingen av tåklippingen på bakfoten er enkel og rask, med liten mulighet for forveksling

Ulemper:

- Det er grunn til å anta at metoden er smertefull, uansett om tåen inneholder bein eller brusk, og at dyret vil oppleve smerter etter inngrepet, selv om det benyttes smertestillende midler eller bedøvelse
- Det er noe bevis på dårligere adferd etter bruk av tåklipping (Iwaki et al., 1989)
- Det antas at dyret benytter alle tærne til normale bevegelser, herunder klatring, og at en viss grad av bevegelseshemming oppstår etter tåklipping. Mus i bur ser imidlertid ut til å bruke hovedsaklig forbeinene ved klatring. Fjerning av én tåtupp på et bakbein anses derfor å ha liten innvirkning på klatring. På den annen side, er tåstumpen mer eller mindre i kontinuerlig kontakt med underlaget etter inngrepet, i motsetning til situasjonen etter haleklipping

## **2. Øremerking – hull i gitte mønster**

Fordeler:

- Metoden likner øremerking av husdyr, som er standard praksis og dermed alment akseptert
- Metoden antas å skape mindre ubehag for dyret enn hale- eller tåklipping fordi den foregår i et område uten beindannelse
- Ørehull gir vev til kvalitativ genotyping
- Størrelsen på hullet kan reduseres til 0,5 mm og allikevel gi nok vev til PCR-metoden (Hawkins et al., 2006)

Ulemper:

- Metoden antas å være smertefull, selv om øret inneholder bruske og ikke bein. Dyret vil trolig oppleve smerter etter inngrepet, selv om det benyttes smertestillende midler under selve inngrepet
- Metoden kan ikke brukes til kvantitativ genotyping
- Problemer med avlesning av ørehull er vanlige, spesielt hvis det oppstår slåssing i buret, da en del systemer forutsetter at det benyttes flere hull i samme øre. Forveksling av dyr kan fort skje med øremerking, hvilket kan øke behovet for antallet dyr i et forsøk
- Ørehull kan være et mål for aggressiv adferd i buret og øret kan dermed bli revet i stykker
- Øremerking innebærer en kraftig fengsling av dyret, da den som utfører prosedyren vil unngå å bli bitt
- Dyret kan ikke merkes før de er 14 dager gamle, da ørene ikke er store nok til å kunne merke dyrene uten å påføre ørene store skader
- Øret blir permanent perforert, og har dermed redusert funksjon som temperaturregulerende organ ved lokalisering av lyd. Øret har betydning ved nedkjøling etter anstrengelse hos mus, da de verken kan pese gjennom åpen munn eller svette
- Lokalanestesi av øret er vanskelig på grunn av nærheten til øregangen og øyet

## **3. Øremerking -metallmerke**

Fordeler:

- Metoden tilsvarer øremerking av husdyr, og er dermed alment akseptert
- Metoden antas å skape mindre ubehag for dyret enn tåklipping som merkemetode, fordi den foregår i et område uten beindannelse
- En entydig identifikasjonsmetode

Ulemper:

- Metoden antas å være smertefull, selv om øret inneholder bruske og ikke bein. Dyret vil trolig oppleve smerter etter inngrepet, selv om det benyttes smertestillende midler under selve inngrepet
- Øremerker må settes der brusken er tykkest. Det krever lang erfaring med å plassere dem riktig på mus

- Av ovennevnte grunn faller slike merker ofte av. Skjer det på to dyr i samme bur, må begge merkes på nytt
- Øremerker kan føre til at øret hefter seg fast på inventaret i buret
- Øremerker kan være et mål for aggressiv adferd i buret og dermed bli revet ut
- Gir ikke vev til genotyping
- Dyret kan ikke merkes før de er 14 dager gamle, da ørene ikke er store nok
- Krever kraftig fengsling av dyret
- Øret blir kontinuerlig hengende ned på grunn av merkets vekt, og øret har dermed redusert funksjon som termoregulator og lydlokalisator
- Anestesi er vanskelig på grunn av nærhet til øregangen og øyet

#### **4. Haleklipping**

Fordeler:

- Metoden fremskaffer tilstrekkelig DNA for kvantitativ genotyping
- Den gir tid til å identifisere ønskede genotyper før avvenning
- Metoden er enkel og billig
- Erfaring tyder på at metoden er mindre smertefull enn øremerking dersom det ikke tas mer enn 5 mm av halen
- Metoden er rask og innebærer ikke fengsling som plager dyret

Ulemper:

- Metoden antas å være smertefull, uansett om halen inneholder bein eller brus, og dyret vil trolig oppleve smerter etter inngrepet. Det er mulig at smertene under og etter inngrepet kan reduseres ved bruk av anestesi, noe som bør utredes nærmere. Det må antas at lidelse etter inngrepet kan reduseres med smertestillende behandling
- Halen er et viktig balanse- og gripeorgan for dyret, og at en viss grad av bevegelseshemming vil oppstå etter inngrepet dersom det tas betydelige lengder, f.eks. ved serieklipping
- Fjerning av kun den ytterste tuppen av halen vil imidlertid ha minimal betydning for bevegelse
- Det er fare for blødning dersom metoden brukes på eldre dyr. Gjentatte haleprøver anbefales derfor ikke
- Metoden må kombineres med en identifikasjonsmetode

#### **5. Tatovering**

Fordeler:

- Den er en permanent merkemetode med liten risiko for forveksling av individer
- Metoden kan brukes på svært unge individer, f.eks. på poten (Honma et al., 1986)

Ulemper:

- Metoden er vanskelig å gjennomføre på dyr med pigmentert hud
- Den gir ikke vev til genotyping

- Effekten av tatovering på tærne eller fotsålene til små gnagere er ikke tilstrekkelig utredet
- Tatovering oppleves som smertefullt på mennesker og det må derfor antas at dette gjelder også for gnagere
- Metoden kan føre til en aktivering av immunsystemet ved at vevsmakrofager tar opp og lagrer fargestoffet. Dette er en uønsket tilleggsfaktor i mange dyreforsøk

## **6. ID-chip (transponder)**

Fordeler:

- Den er en permanent merkemethode uten risiko for forveksling av individer
- Det er utviklet mindre produkter de senere årene (f.eks. Nonatec, [www.nonatec.net](http://www.nonatec.net)) som antas å være minimalt belastende. Disse kan brukes på unge individer
- ID-chip'en plasseres i nakkeskinnet, der dyrene aksepterer å bli grepet av mødrene når de skal flyttes rundt i buret, og det kan derfor antas at inngrepet gir minimale fryktreaksjoner

Ulemper:

- Den gir ikke vev til genotyping
- Metoden er avhengig av en del utstyr, bl.a. en avleser (skanner) som støtter systemet benyttet i chip'en. Ulike systemer kan medføre problemer når dyr flyttes fra ett laboratorium til et annet
- De større chip'ene antas å være belastende for små individer. Nålene som brukes til å legge inn chip'en er store og det bør brukes analgesi under merkingen.
- Det er noe bevis for økt forekomst av kreft i gnagere som er blitt implantert med ID chip'er (<http://en.wikipedia.org/wiki/VeriChip>)
- Chip'ene kan slutte å fungere etter en tid
- Chip'ene kan vandre under huden, noe som kan gjøre avlesing vanskelig eller umulig

## **7. Blodprøver**

Fordeler:

- Metoden innebærer ikke fjerning av deler av dyrets ytre organer

Ulemper:

- Blodprøvetaking på små dyr er teknisk krevende og kan føre til smerte og ubehag
- Metoden må kombineres med en identifikasjonsmetode
- Metoden gir lite vev til genotyping og egner seg best til forskning hvor man ønsker å skille grupper med dyr basert på blodlegemenes fenotype
- Metoden er avhengig av en del utstyr og erfarne operatører

## **8. Applikasjon av fargestoff på huden, hårklipping o.l.**

Fordeler:

- Det er liten risiko for forveksling av individer dersom operatørene benytter et standard system
- Metodene er dyrevennlige, enkle og billige

Ulemper:

- Metodene gir ingen vevsprøver til genotyping
- Fargestoffene kan slites av og regelmessig håndtering er nødvendig for å påføre mer farge eller klippe hår
- I toksikologiske studier bør bruken av kjemikalier som kan penetrere huden unngås
- Stoffene kan påvirke andre dyr i buret, som kan slikke av fargestoffet

## **9. Spytt/epitelceller fra munnhulen**

Fordeler:

- Metoden er dyrevennlig på dyr som har oppnådd tilstrekkelig størrelse (Irwin et al., 1996).
- Metoden gir DNA til kvalitativ genotyping (Zhang et al., 2006)
- Ekstraheringen av DNA fra prøven er raskere enn ved hale-, øre- eller tåklipping (Meldgaard et al., 2004; Mitrečić et al., 2008)

Ulemper:

- Metodene egner seg kun til kvalitativ genotyping (PCR-metoden)
- Metoden må kombineres med en identifikasjonsmetode
- Det er en risiko for kontaminering av prøvene med DNA fra morsmelken eller juret
- Metoden er belastende på yngre mus
- Det er fare for krysskontaminering mellom dyr fordi dyr slikker hverandre og spiser avføringen til hverandre. Metoden er derfor ikke godt egnet når flere dyr står i samme bur

## **10. Rektalskrape/avføringsprøver**

Fordeler:

- Metodene er dyrevennlige og billige
- Ekstraheringen av DNA fra prøvene er raskere enn ved hale-, øre- eller tåklipping (Murgatroyd et al., 2006)

Ulemper:

- Metodene må kombineres med en identifikasjonsmetode
- Sannsynligheten for kontaminering av avføringsprøvene eller forveksling av dyrene er stor, hvis ikke de er samlet direkte fra individet, noe som er tidkrevende
- Prøvene inneholde DNA fra en rekke andre kilder enn dyret selv
- Rektalskraper kan ikke utføres på svært unge dyr
- Metoden er lite utprøvd, særlig på unge individer

## **11. Uttak av hårfollikler**

Fordeler:

- Metoden er relativt dyrevennlig og billig



- Napping av hår krever minimal fengsling

Ulemper:

- Metoden må kombineres med en identifikasjonsmetode
- Musehår blir lett statisk elektrisk og dette kan lett føre til krysskontaminering mellom individer, enten på grunn av røytehår fra andre dyr, eller ved utilstrekkelig rengjøring av utstyr mellom prøver. Metoden egner seg derimot til prøvetaking på noen få dyr, for eksempel ved gjentatt genotyping
- Metoden er uegnet på unge individer, som har lite pels

## 12. Øreavtrykk

Dette er en ny metode, inspirert av bruken av fingeravtrykk hos mennesker, som baserer seg på avfotografering og fortolkning av mønsteret til blodårene i øret til gnagere (Cameron et al., <http://www.nc3rs.org.uk/news.asp?id=675>).

Fordeler:

- Metoden er dyrevennlig, hurtig og ikke-invasiv

Ulemper:

- Metoden er fortsatt under utvikling og krever spesialutstyr
- Enkelte avlesninger er av for dårlig kvalitet til å kunne trekke en sikker konklusjon og dyret må fotograferes igjen
- Metoden gir ikke DNA for genotyping

## 5. Forskning på tåklipping og andre metoder

Det er gjort lite forskning på tåklipping som metode.

1. Vachon (1998) har studert de anatomiske forandringene ved amputasjoner på den distale enden av den første knokkelen ved ca. 2 ukers alder. Fullstendig tilheling av beinet og den overliggende huden ble observert, men med endringer i den normale arkitekturen av knokkene. Ossifiseringen (beindannelse) skjer ved dag 18. Det ble ikke observert problemer etter amputasjonene, men forfatteren påpeker behovet for studier av nerveforsyningen til området og faren for eventuelle betennelsesreaksjoner.
2. Cinelli *et al.* (2007) vurderte ikke tåklipping, men de sammenliknet effekten av mange biopsimetoder med telemetri av kroppstemperatur og puls, og på bevegelsesmønster. De konkluderer at fengsling var den viktigste stressfaktoren for dyrene og at hårprøver er vanskelig å håndtere på grunn av faren for krysskontaminering. Øremerking var den metoden som ga størst og mest langvarig utslag på parametrene de målte, men metoden ble allikevel vurdert som best fordi den fungerte både som biopsi- og merkemetode. Forfatterne påpekte at kinnskrap og rektalskrap ofte førte til blødning, og at de neppe kunne regnes som ikke-invasive metoder, og som heller ikke skilte seg fra de andre metodene i henhold til stressrespons.

3. Arras et al. (2007) undersøkte effekten av haleklipping med eller uten anestesi på en rekke fysiologiske parametre hos voksne mus. De konkluderte at anestesi ikke reduserte effektene av haleklipping på en rekke fysiologiske parametre, og at haleklipping ga mindre og mer kortvarige utslag på disse parametrene enn anestesi alene. I en kort beskrivelse av halens histologi, rapporterer de at var liten forskjell mellom snitt tatt 2, 6 og 10 mm fra tuppen, bortsett fra en gradvis reduksjon i antallet nervefibre jo lengre snittene var fra kroppen.
4. Hankenson et al. (2008) har nylig publisert en undersøkelse av ossifiseringen, DNA-innhold og akutt adferdsrespons til haleklipping (ulike lengder) i 6 muselinjer mellom 3 og 42 dagers alder. Forfatterne konkluderte at den optimale tiden for å høste DNA var 14-17 dagers alderen.
5. Den europeiske forsøksdyrorganisasjonen FELASA ([www.felasa.eu](http://www.felasa.eu)) har nedsatt en arbeidsgruppe som utreder de ulike identifiseringsmetodene for gnagere. Den første fasen av deres arbeid er en ren litteraturstudie. Konklusjonene er ikke klare ennå.
6. FELASA har også nedsatt en arbeidsgruppe som utreder mulighetene til å raffinere metodene for genotyping av genetisk modifiserte gnagere. Fristen for rapportering er desember 2009.
7. En forskergruppe i Utrecht er i ferd med å evaluere tatovering sammenlignet med tåklipping på nyfødte gnagere.
8. Forskere i Uppsala arbeider med å sammenligne tåklipping og øremerking i ulike musestammer.

Konklusjonen må være at det foregår en del studier på emnet, men at det foreligger pr. idag få resultater av vitenskapelige forsøk som er relevante til problemstillingen.

## 6. Viktige momenter ved metodevalg

1. Norecopa mener at både vitenskapelige, juridiske og etiske betraktninger skal legges til grunn når en prosedyre på forsøksdyr vurderes. Som hjelpemiddel i denne prosessen kan man legge til grunn “de 3 R’ene” av Russell & Burch (1959) og “de 3 S’ene” av Carol Newman (sitert i Öbrink & Waller, 1996):  
 Replace, Reduce, Refine  
 Good Science, Good Sense, Good Sensibility
2. Eventuelle smerter og lidelse oppfattes av individet, uansett antallet andre dyr rundt det.
3. Totalbelastningen på et dyr i løpet av sitt liv bør vurderes. Dersom en prosedyre utført ved én fase kan eliminere behovet for flere belastende prosedyrer senere, bør den vurderes, selv om den i seg selv er belastende.
4. Fordelene av beroligende midler eller anestetika må veies opp mot stresset forårsaket av håndteringen som er nødvendig for å gi disse midlene, eller midlene selv. Dette stresset kan være større enn selve inngrepet, men optimal bruk av beroligende eller anestetika kan også bidra til å redusere belastningene for dyrene. Dette må vurderes nøye i hvert enkelt tilfelle. Forskrift om forsøk med dyr §14 slår fast at ’hvis det er grunn til å anta at smerten ved forsøket ikke overskrider smerten ved bedøvingen, kan bedøving unnlates.’

5. Den estetiske siden ved å amputere deler av organer er viktig for mange, og tradisjonsrike metoder som f.eks. øremerking har større aksept i opinionen.
6. Den norske dyrevernloven er generelt restriktiv mot amputasjoner. Loven forbyr halekupering, klipping av nebbet på høner og ørekupering på hunder. Dagens lov skal erstattes om kort tid av en ny lov om dyrevelferd. Den restriktive holdningen mot amputasjoner er videreført i utkastet til den nye loven. Selv om Forskrift om forsøk med dyr åpner for bruken av prosedyrer under visse betingelser som normalt er forbudt i samfunnets vanlige omgang med dyr, bør forskningsmiljøet etter Norecopas mening være ekstra varsom med å benytte teknikker som faller inn i denne kategorien.
7. Tåklipping faller etter Norecopas mening i kategorien av identitets- og prøvetakingsmetoder som ifølge Forskriften om forsøk med dyr §2 det er ‘ grunn til anta påvirker dyrets normale livsutfoldelse eller medføre annet enn helt forbigående lett smerte eller ubehag’. Tærne er mer eller mindre i kontakt med underlaget til enhver tid, i motsetning til andre aktuelle organer som halen og ørene.
8. En helt sentral faktor ved vurdering av tåklipping er om det eksisterer et reelt behov for større mengder vev til genotyping i alderen 1-10 dager. Dette bør vurderes i hvert enkelt tilfelle og bør synliggjøres i søknaden om dyreforsøk. Er det virkelig behov for DNA i denne alderen i det hele tatt, eller er ønsket om vevsprøvetaking utelukkende basert på praktiske/økonomiske hensyn eller antatt velferdsmessige fordeler ved å fjerne uønskede dyr fra kolonier fortest mulig?
9. Spesielt når invasive metoder benyttes til prøvetaking, bør eventuelt overskuddsvev lagres slik at genotypen kan om nødvendig karakteriseres igjen uten å måtte ta en ny prøve. Størrelsen på vevsprøver bør alltid tilpasses kravene til testmetoden som skal benyttes, for å ikke fjerne mer vev enn nødvendig.
10. Kolonier med genmodifiserte dyr er ofte store. Det vil alltid være fristende å velge metoder (kliniske undersøkelser, merkemotoder, prøvetakingsteknikker o.l.) som er billige og enkle å utføre.
11. Det finnes en del argumenter for å genotype dyrene i en genmodifisert koloni så tidlig som mulig:
  - a. Uønskede dyr kan avlives før avvenning, som reduserer antallet bur, antallet dyr, risikoen for lidelse ved utbrudd av sykdom og forekomst av slåssing/skader, samt arbeidsbyrden for de ansatte
  - b. Fjerning av noen individer i et kull vil gjøre mer melk tilgjengelig, og medføre mindre stress, for de gjenværende ungene. Slik kan man sikre at selv de svakeste overlever. Ofte er nettopp de genmodifiserte dyrene (for eksempel homozygote knockouts) de svakeste, som har det største behovet for ekstra melk i denne kritiske fasen. Mindre kull gir store og mer livskraftige avkom ved avvenning, og dette er et betydelig argument i forbedringen av avlsteknikker for genmodifiserte og mutante dyr.
  - c. Moren er ofte drektig på tidspunktet da tåklipping ønskes gjennomført, så det blir mindre press på henne dersom uønskede avkom fjernes fra buret (savnet av disse avkommene bør derimot også påregnes). Vevet i tærne og haletuppen hos mus består av brusk, ikke bein, de to første leveukene, slik at tå- og haleklipping i den alderen trolig kan sammenlignes med bruken av ørehull på eldre dyr når det gjelder smerteoppfattelse.

- d. Effektivitetskrav bør ikke være et hovedargument i valg av metode, særlig hvis metodene som vurderes er belastende for dyrene. Effektive prosedyrer er imidlertid ofte lite belastende for dyrene, ettersom de innebærer minimal fengsling med redusert stress. Effektiv drift av en forsøksdyravdeling handler også om å oppstalle så få dyr som mulig, for så kort tid som mulig.
12. Synspunkter om smerteoppfattelse hos nyfødte dyr (og mennesker) har farget debatten om hvorvidt de mer invasive metodene er forsvarlige eller ikke. Oppfattelse av smerte (og dermed lidelse) betinger to ting: nervesystemet må være utviklet, slik at smertestimuli når hjernebarken, og dyret må være ved bevissthet. Basert på målinger av hjernens elektriske aktivitet (EEG), deler Diesch et al. (2007) dyrearter i tre ulike grupper avhengig av hvor modent systemet er ved fødselen. Pungdyrene (som f.eks. kenguru) er ekstremt umodne ved fødselen og bevisst smerteoppfattelse er trolig ikke utviklet før dyrene er 120-180 dager gamle. Hos andre arter som f.eks. sau, kan høyere hjerneaktivitet måles ca. 30 dager før fødselen, men lammene holdes i en ubevisst søvnlignende tilstand i livmoren av en rekke substanser produsert i hjernen. Adferdsstudier viser at dyrene utvikler en full smerteresponse gradvis i løpet av den første leveuken.

Gnagere er trolig i en mellomstilling. Diesch et al. (2007) siterer studier som Ellingsen & Rose (1970) utførte på den elektriske hjerneaktiviteten hos rotteunger, og konkluderer at dyrene ikke viser nevrofysiologiske tegn på bevisst opplevelse av smerte før dag 12-18 etter fødselen. Fra sine egne studier på unge rotter utsatt for klemming av halen under anestesi, konkluderer Diesch et al. at bevisst smerteoppfattelse normalt ikke forekommer tidligere enn 10-12 dager etter fødselen, med en gradvis modningsprosess deretter som varer ca. en uke.

Man skal allikevel være varsom med å utsette dyr for smertefulle inngrep i den fasen hvor nervesystemet er tilsynelatende fortsatt under utvikling: studier på gutter utsatt for omskjæring uten bedøvelse viser overfølsomhet for smerte ved vaksineringsopptil 6 måneder senere (Fitzgerald & Anand, 1993). I tillegg er det bevis på at sentralnervesystemet er heller mer ømfintlig for smertestimuli kort tid etter fødselen enn senere i livet.

Det er usikkert hvor god smertelindring lokalbedøvelsen gir ved tåklipping og haleklipping, og om (og eventuelt hvor lenge) smertestillende midler bør gis etter inngrepet. Det er praktiske problemer med å dosere slike midler til svært unge dyr.

Studier av hjernens elektriske aktivitet hos unge rotter sår noe tvil om dyr under 10 dagers alder er i stand til å oppleve smerte bevisst. Dette utelukker imidlertid ikke muligheten for at dyrene kjenner smerter i ettertid, selv om bedøvelse er blitt brukt. Det er foretatt for få studier til å vurdere om fjerning av et ytterledd på én tå påvirker dyrenes normale livsutfoldelse (f.eks. klatreevne) eller skaper mer enn 'helt forbigående lett smerte eller ubehag', jf. Forskrift om forsøk med dyr, §.2, f.eks. i form av fantomsmerter som er beskrevet hos mennesker etter amputasjoner, selv etter postoperativ smertebehandling. Det er heller ikke mulig å konkludere om fjerning av en haletupp eller et stykke ørevev gir mindre smerter enn tåklipping. Ingen av metodene er uproblematisk. Halekutting skiller seg imidlertid fra tåklipping ved at den ikke berører et organ som er kontinuerlig kontakt med underlaget. Ørene er for små hos mus i den aktuelle alderen til å gi nok vev til kvantitativ genotyping.

## 7. Praksis i andre land

Det er få vitenskapelig-baserte rapporter fra arbeidsgrupper som har vurdert ulike metoder for identitetsmerking og vevsprøvetakning.

*Joint Working Group on Refinement (JWGR, 2003)* i Storbritannia anbefaler prinsipielt at det tas hensyn til:

- Kilden til vevet
- Størrelsen på vevsbiten som tas
- Alderen til dyrene
- Behovet for lokal eller generell anestesi

Gruppen påpeker at man bør bruke den minst invasive metoden og ta minst mulig vev. Mange av de minst invasive metodene brukes ikke fordi det er tradisjoner for å bruke de mer invasive, til tross for at det er publisert metoder for de mindre invasive. Teknikker bør evalueres regelmessig. Metodene som brukes for genotyping bør diskuteres: Southern-blot hybridiseringer trenger mer DNA enn PCR-teknikker, men kan være uungåelige dersom antallet transgene kopier må identifiseres. PCR bør alltid vurderes ved rutine genotyping av kolonier, men det er viktig å unngå krysskontaminering med annen DNA.

Der både identitetsmerking og genotyping er nødvendig, anbefaler JWGR følgende (evt. kombinert med en merkemetode):

	<2 uker	3-4 uker	>4 uker
Spytt eller feces	√	√	√
Haleklipping	√/X	√	√/X
Øremerking	X	√	√
Blod	X	√	√
Tåklipping	X*	X	X

X\*: kun i unntakstilfeller.

JWGR mener at tåklipping trolig medfører smerter og kan redusere dyrets evne til å gripe eller stelle seg. Gruppen mener at den ikke må brukes som rutinemetode for å identifisere mus eller som vevskilde for genotyping. I sjeldne tilfeller et det uungåelig, f.eks. hvor det er gode vitenskapelige grunner til å identifisere mus mindre enn 14 dager som må holdes i isolatorer av hensyn til smitte. I disse tilfeller kan tåklipping være den eneste praktisk gjennomførbare metoden på grunn av dyrenes størrelse og behovet for biosikkerhet.

Tåklipping bør bare brukes som siste utvei, og kun én tå bør fjernes fra ett bakben, under lokalanestesi. Vevet som er kuttet av bør brukes til genotyping og dyrene bør ikke utsettes for flere biopsiprosedyrer. Metoden må ikke brukes for dyr eldre enn 14 dager, fordi andre metoder som f.eks. øremerking er anvendbare.

JWGR oppgir flere referanser i forbindelse med deres retningslinjer om haleklipping, som Norecopa mener er relevant når tåklipping vurderes. Halevirvlene begynner å omdannes til bein i 2-3 ukers alder. Det er bevis på beinsubstans selv i den siste mm av haletuppen. Huden og beinhinnen er godt forsynt med nervevev, og JWGR konkluderer at haleklipping må antas å være svært smertefull, særlig når beinvev kuttes.

Sekretæren i Norecopa har diskutert saken med lederen for JWGR-komiteén, professor David Morton, Storbritannia. Han anbefaler haleklipping (3-5 mm vev), som normalt bør utføres på mus innen de er 2 uker gamle, og under full inhalasjonsanestesi (f.eks. isofluoran, N.B. ikke eter). Halvparten av prøvens DNA bør oppbevares i tilfelle det er behov for å kjøre testen om igjen, for å unngå å ta en ny prøve (personlig meddelse, gjengis med tillatelse).

The ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC, 1996), som benyttes bl.a. som retningslinjer av akkrediteringsorganet AAALAC International ([www.aaalac.org](http://www.aaalac.org)) fastslår at tåklipping som identifikasjonsmetode hos smågnagere bør kun brukes når ingen andre merkemetoder er praktisk anvendbare, og bør bare utføres på 'altricial neonates' (unge dyr som fortsatt er hjelpeløse).

Den kanadiske organisasjonen CCAC (Canadian Council on Animal Care, [www.ccac.ca](http://www.ccac.ca)) har produsert retningslinjer om hold av transgene dyr (1997) men gir ingen spesifikke anbefalinger om identifikasjonsteknikker eller metoder for vevsprøvetakning.

Et søk på Internett viser at en lang rekke etiske komitéer ved forsøksdyravlendinger i USA (IACUCs) omtaler tåklipping. Noen som f.eks. *Guidelines for biopsy procedures to facilitate identification and DNA-based molecular genotyping of rodents* ved Emory University (2001) åpner for tåklipping på 8-12 dager gamle dyr uten anestesi. I mange tilfeller er imidlertid tåklipping beskrevet som metode for identifikasjon alene, og i slike tilfeller er den ofte frarådet, til fordel for mindre invasive metoder som f.eks. tatovering og bruk av mikrochip. Dette inntrykk støttes av svar som Norecopa har mottatt etter å ha lagt ut en forespørsel på et internasjonalt diskusjonsforum for forsøksdyrmiljøet (CompMed) drevet av den amerikanske forsøksdyrorganisasjonen AALAS.

## 8. Konklusjon

1. Kvantitativ genotyping krever relativt store mengder DNA og dermed invasive samlemetoder. I praksis betyr dette at det må foretas amputasjoner på levende dyr. Amputasjoner bør derfor bare foretas på forsøksdyr når det trengs vev til kvantitativ genotyping for å kartlegge nyetablerte genmodifiserte linjer. Norecopas styre mener at dette prinsippet også bør gjelde for ville dyr og fisk. Amputasjoner bør ikke aksepteres som rutine metoder og det bør søkes spesielt fra Forsøksdyrutvalget om tillatelse til å bruke dem. Mindre invasive teknikker som krever mindre DNA bør derfor alltid benyttes til rutine genotyping. Det presiseres at dyrevernorganisasjoner har et prinsipielt standpunkt om at amputasjoner må forbys.
2. Det er kun to etablerte metoder som gir tilstrekkelig vev for kvantitativ genotyping av transgene linjer: haleklipping og tåtuppklipping. Selv om tåtuppklipping har den fordel at den også er en merket metode, antas det at metoden er mer belastende for dyret enn haleklipping fordi den berører bevegelsesapparatet som er mer eller mindre i kontinuerlig berøring med underlaget. Det finnes enkle, ikke-invasive merket metoder som kan kombineres med haleklipping, som f.eks. pensling av et fargestoff på huden i armhulene.
3. Norecopas styre registrerer at få institusjoner benytter tåklipping til genotyping og at det er større motstand mot tåklipping enn mot haleklipping, selv om begge er kontroversielle. De fleste har også erstattet tåklipping som merket metode med andre teknikker, også for dyr under 10 dager, i tråd med konklusjonene fra den britiske JWGR-rapporten og i den amerikanske ILAR Guide.
4. **Norecopas styre mener derfor at tåtupp-klipping, selv med raffineringene beskrevet i FDU's vedtak, ikke bør tillates. Der hvor det er tvingende nødvendig å foreta kvantitativ genotyping, bør det brukes haleklipping (3-5 mm kun én gang per dyr) under anestesi, og med smertestillende etter inngrepet der dette ikke i seg selv medfører en større belastning for dyret. Det bør foretas ytterligere studier for å identifisere den optimale anestesen og analgesien for de ulike metodene for merking og vevstyping. I tilfeller hvor det kun er nødvendig med kvalitativ genotyping, bør mindre invasive metoder anvendes som f.eks. spytt, blod-, avførings eller hårprøver, eller (i større dyr) materialet fra ørehullmerking.**

### **Mindretallet i styret har uttrykt dissens og har følgende anførsler til konklusjonen:**

Det fins i dag ikke holdepunkter for at amputasjon av tåtupp er noe verre inngrep enn amputasjon av haletipp. Dermed vil det i situasjoner der det er nødvendig med tidlig genotyping måtte kunne være mulig å gjennomføre tåtuppklipping. Tidlig genotyping er nødvendig der svake avkom vil ha langt større overlevelsesmuligheter så snart kullstørrelsen reduseres, eller der forsøk krever genotyping før 14 dagers alder, eller ved avl i isolator med infeksjonsmodeller. Dersom forsøket ikke tillater merket metoder med tusj, tatovering eller andre substanser som vil påvirke forsøket (f.eks. toksikologiske studier, immunologiske

studier eller karsinogenese-studier) vil tåklipp være en kombinert merke- og biopsi-teknikk som kombinert medfører minst belastning.



## 9. Litteratur

1. Arras M, Rettich A, Seifert B, Käsermann HP & Rüllicke T (2007): Should laboratory mice be anaesthetized for tail biopsy? *Laboratory Animals*, 41: 30-45.
2. Borgens RB (1982): Mice regrow the tips of their foretoes. *Science*. 217(4561): 747-50.
3. Cameron J, Jacobson C, Nilsson K & Rögnvaldsson T. Identifying laboratory rodents using earprints. <http://www.nc3rs.org.uk/news.asp?id=675>
4. CCAC Guidelines on transgenic animals (1997). [www.ccac.ca](http://www.ccac.ca)
5. Cinelli P, Rettich A, Seifert B, Bürki K, and Arras M (2007): Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Lab Anim* 41(2): 174-184;
6. Diesch TJ, Mellor DJ, Johnson CB & Lentle RG (2007) Responsiveness to painful stimuli in anaesthetised newborn and young animals of varying neurological maturity (wallaby joeys, rat pups and lambs) AATEX 14, Special Issue, 549-552. Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August 21-25, 2007, Tokyo, Japan
7. Ellingsen RJ & Rose GH (1970): Ontogenesis of the electroencephalogram. I *Developmental Neurobiology*, s. 441-474. Red. WA Himwich. Illinois: Charles C Thomas Publisher
8. Emory University Guidelines for Biopsy Procedures to Facilitate Identification and DNA-Based Molecular Genotyping of Rodents. <http://www.emory.edu/IACUC/pdfs/BiopsyPolicy.pdf>
9. FELASA working group on Rodent Identification. [www.felasa.eu](http://www.felasa.eu)
10. Fitzgerald M & Anand KJS (1993): Developmental neuroanatomy and neurophysiology of pain. I Schechter NL, Berde CB & Yatser M (red.): *Pain in infants, children and adolescents*, sider 11-32. Baltimore: William and Wilkins.
11. Hankenson FC, Garzel LM, Fischer DD, Nolan B & Hankenson KD (2008): Evaluation of tail biopsy collection in laboratory mice (*Mus musculus*): vertebral ossification, DNA quantity, and acute behavioral responses. *J. Amer. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 47:10-18.
12. Hawkins P, Felton LM, van Loo P, Maconochie M, Wells DJ, Dennison N, Hubrecht R & Jennings M (2006): Report of the 2005 RSPCA/UFAW Rodent Welfare Group meeting. *Lab Animal* 35(9): 29-38.
13. Honma M, Iwaki S, Kast A, Kreuzer H. (1986): Experiences with the identification of small rodents. *Jikken Dobutsu*. 35(3): 347-52.
14. Irwin MH, Moffatt RJ, Pinkert CA. (1996): Identification of transgenic mice by PCR analysis of saliva. *Nat Biotechnol.* 1996, 1094.
15. Iwaki S, Matsuo A, Kast A. (1989): Identification of newborn rats by tattooing. *Lab Anim.* 361-4.
16. BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement (2003): Refinement and reduction in production of genetically modified mice. *Lab. Anim.* 37 (Supplement 1), S1-51. <http://www.lal.org.uk/pdffiles/Transgenic.pdf>.
17. Kumar RK (1979): *Lab Anim Sci.* 679-80.
18. Meldgaard M, Bollen PJ, Finsen B. (2004): Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR. *Lab Anim.* 38(4), 413-7.

19. Mitrečić D, Mavrić S, Branica BV & Gajović S. (2008): Mice genotyping using buccal swab samples: an improved method. *Biochem Genet.* 2008 Apr;46(3-4):105-12. Epub 2008 Jan 23.
20. Murgatroyd C., Bilko D. & Spengler D. (2006): Isolation of high-quality DNA for genotyping from feces of rodents. *Analytical Biochemistry*, 348, 160-162.
21. Nadon NL, Draeger K. (1996): Genomic DNA analysis from mouse toe lysates. *Transgenic Res.* 5(3):209-11.
22. National Centre for the 3Rs, Storbritannia. Wildlife research. <http://www.nc3rs.org.uk/category.asp?catID=79>
23. National Research Council (1996): *ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, side 46. Washington DC: National Academy Press.
24. Nonatec microtransponder ([www.nonatec.net](http://www.nonatec.net))
25. Russell WMS & Burch RL (1959): *The Principles of Humane Experimental Technique*. UFAW, Wheathampstead, 238 sider. [http://altweb.jhsph.edu/publications/humane\\_exp/het-toc.htm](http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm)
26. Vachon P (1998): Anatomical and histological observations of fore- and hind limb toes in adult mice after amputations performed at the age of two weeks. *Can J Vet Res.* 62(4):311-3.
27. VeriChip (<http://en.wikipedia.org/wiki/VeriChip>)
28. Zhang Y-H, Huang B-L, Eastman K, McCabe LL, MacLennan NK & McCabe ERB (2006): Mouth collection device for newborn mice. *Molecular Genetics and Metabolism* 89: 164-167.
29. Öbrink KJ & Waller M (1996): *Försöksdjurs-kunskap: Refinement, Reduction, Replacement*. Studentlitteratur AB, Lund, 393 sider.