



BIORESOURCES

## TOGETHER FOR THE SAME AND UNIQUE GOAL: ANIMAL HEALTH AND WELFARE.

Marshall now offers integrated and complete CRO services in Europe on veterinary studies to accelerate the discovery of new canine therapies.

**These services include:**

- ✓ Pharmacokinetics, pharmacodynamic
- ✓ Duration of Immunity
- ✓ Efficacy studies
- ✓ Safety studies, dose findings
- ✓ Food studies, palatability
- ✓ Reproduction, pediatrics
- ✓ Behaviour
- ✓ Wipe tests
- ✓ Bioproducts
- ✓ Various housing solutions
- ✓ Supply of Marshall Beagle®



**WITH YOU, FOR THE SUCCESS OF YOUR CANINE RESEARCH PROGRAM**

infoeu@marshallbio.com

## Het verfijnen van intraveneuze zelftoediening bij ratten

Een permanente canule in de *vena jugularis* wordt bij verschillende diersoorten en voor verschillende soorten onderzoek gebruikt. Na het plaatsen kan er pijnloos en zonder verder ongerief meerdere malen per dag bloed worden afgenomen of kunnen intraveneus farmaca toegediend worden. Het plaatsen van de canule wordt eenmalig onder algehele anesthesie gedaan, met een recoveryperiode van een week. Het is noodzakelijk dat een permanente canule meerdere weken en soms maanden werkzaam blijft. De beschreven procedures om verblijfcannules te plaatsen en canules open te houden werken redelijk, maar zijn niet optimaal. In de literatuur zien we bijvoorbeeld veel uitval na een aantal weken door verstoppingen van de canule [1].

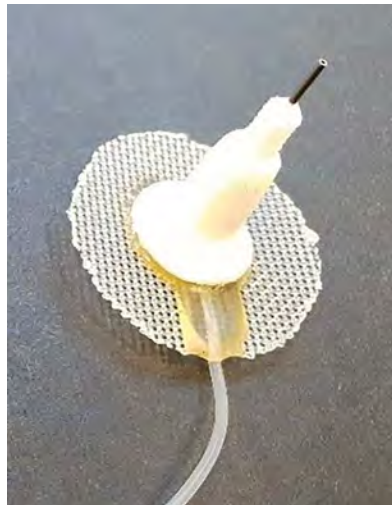
**José Lozeman, Heidi Lesscher**

Universiteit Utrecht, faculteit Diergeneeskunde, Population Health Sciences, Neurobiologie van gedrag.  
Contact: j.g.vantklooster@uu.nl

Vaak worden procedures al jaren toegepast. "Omdat we het altijd al zo doen" is een vaak gehoorde reactie. Graag wil ik jullie laten zien hoe belangrijk het is om te onderzoeken of een bestaande 'standaardprocedure' ook verbeterd kan worden met vernieuwde technieken. Dit is belangrijk voor de dieren, maar ook voor de biotechnici en onderzoekers. De welbekende V van verfijning!

### **Toepassing soorten onderzoek**

De *vena jugularis*-canule wordt onder andere bij farmacologisch of toxicologisch onderzoek gebruikt. In onze onderzoeksgroep gebruiken we de *vena jugularis*-canule voor onderzoek naar verslaving. Hiervoor implanteren we de canule met een 'backmount' (Afb. 1, 2a en 4a). De backmount is het uiteinde van de canule die op de rug van het dier wordt vastgezet. We gebruiken hiervoor mannelijke Lister Hooded-ratten van 8-9 weken oud (Charles River). Er worden Lister Hooded-ratten gebruikt omdat deze dieren actief zijn en snel te trainen. De dieren worden in operante boxen getraind voor intraveneuze zelftoediening van verslavende stoffen zoals cocaïne of heroïne. Hierbij kunnen ze een beloning (verslavende stof) verdienen door op het juiste pedaal te drukken. Met behulp van verschillende beloningschema's trainen we de dieren, waarbij we bijvoorbeeld het aantal keren dat de dieren moeten drukken variëren. Zodra de dieren het juiste aantal keren gedrukt hebben wordt een pomp geactiveerd, wat leidt tot een intraveneuze infusie van de verslavende stof. Als dit als belonend wordt ervaren dan koppelt het dier het drukken op de pedaal met de beloning, en daardoor zullen ze steeds vaker op het pedaal gaan drukken. Het trainen van de dieren neemt een aantal weken in beslag. Hierna kunnen ze getest worden op bijvoorbeeld controleverlies, een kenmerk van verslaving, in dezelfde operante boxen.



Afbeelding 1. Custom-made backmount SBD-06 van SAI infusie. Met een harde patch en een open systeem.

In dergelijke experimenten zitten dieren doorgaans vier tot zes maanden in proef. Daarom is het belangrijk dat de canules langdurig werken, zonder infecties of verstoppingen.

#### Verschillende vena jugularis-canules

Er zijn veel verschillende soorten canules op de markt. De keuze voor het type canule is afhankelijk van de duur en het soort onderzoek. De canules zijn in te delen in drie groepen:

- canules waarbij het afnamedeel op de schedel wordt vastgezet met schroefjes en botcement
- canules waarbij de dieren een soort jasje krijgen zodat het op de rug van het dier blijft zitten.
- canules die met behulp van een backmount onderhuids op de rug worden vastgezet.

Daarnaast zijn er open en gesloten systemen. De open systemen worden vaak zelf op het lab gemaakt en afgesloten met een stukje siliconen slang

dat aan één kant is dichtgesmolten. Maar helemaal steriel en luchtdicht is dat systeem niet. Het voordeel is dat ze zelf aan te passen zijn en dat ze doorgaans goedkoper zijn dan commerciële canules.

De gesloten systemen hebben een membraan waar je doorheen moet prikken waardoor er geen open verbinding is met de buitenlucht. Het voordeel van de gesloten systemen is dat je met dergelijke systemen minder risico hebt op infecties en verstoppingen. Hier zijn veel verschillende typen van te verkrijgen via commerciële bedrijven. Naast deze typen canules zien we ook veel verschillen in de patch (stukje kunststof, zie Afb. 1) die wordt gebruikt om de backmount onderhuids op de rug van het dier vast te zetten. Naast dat ze in grootte variëren, is ook de textuur verschillend: sommigen zijn vrij stevig met scherpe uiteinden (Afb. 1), terwijl anderen juist van zacht geperst katoen gemaakt zijn (Afb. 3b en 4). De keuze voor het type canule wordt bepaald door de studieopzet maar ook door de ervaring met de materialen op het lab.

#### Ruimte voor verbetering

Voor ons verslavingsonderzoek maakten we voorheen gebruik van een commercieel verkrijgbaar open systeem-canule, die speciaal was ontwikkeld voor operante zelftoedieningstudies. Dit was een canule met een wat hardere patch waarbij de canule op de juiste lengte geleverd kon worden. Helaas zagen wij regelmatig uitval van dieren, mede doordat de canules na een tijdje gingen lekken, een ontsteking veroorzaakten of dicht gingen zitten. De randen van deze patch waren bovendien heel scherp waardoor er irritatie aan de huid te zien was. We merkten ook dat de dieren last hadden van het aan- en vooral het afkoppelen in de operante boxen. Het leek erop dat de backmount irritatie veroorzaakte en pijn deed. Juist voor ons onderzoek is het belangrijk dat de canules een aantal maanden blijven zitten en werken zonder dat de dieren hier last van krijgen. Een ander nadeel van deze canules was dat de dieren individueel gehuisvest moesten worden om de backmount te beschermen. Om de canules toch zo lang mogelijk open te houden spoelden we de canules met 0,1 ml oplossing van 1 ml Heparine 5000 IE/ml (bloedverdunner) en 11 ml Gentamicine 50 mg/ml (antibiotica) in 100 ml fysiologisch zout door. Maar ondanks het gebruik van deze oplossing zagen we in de loop van weken toch uitval door verstoppingen in meer dan 50 % van de dieren. Navraag bij andere onderzoeksgroepen leverde niet veel op. Veelal werd dezelfde oplossing gebruikt, maar de experimenten waren vaak van kortere duur.



Afbeelding 2a. Een backmount met een membraan van SAI-infusie.



Afbeelding 2b. Laat het aan- en afkoppelsysteem voor de zelftoediening zien.

#### Verfijning

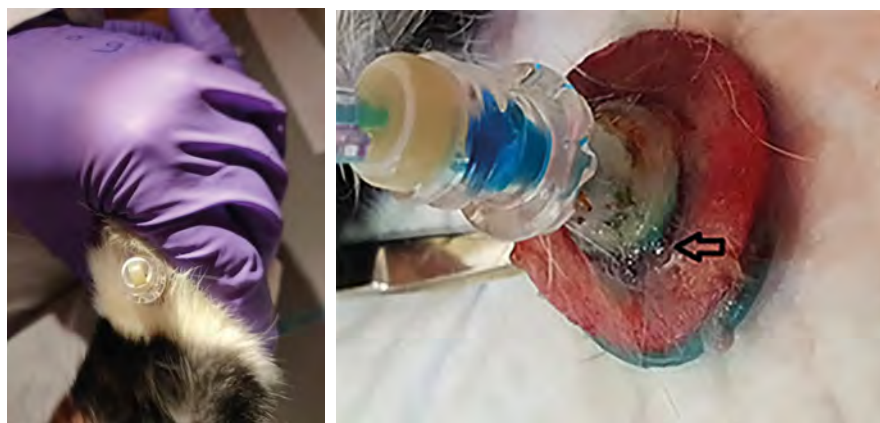
Om de bestaande methode te verbeteren stelden we een aantal eisen vast waaraan de ideale canules zouden moeten voldoen:

1. Het aan- en afkoppelen van de dieren moet makkelijk en pijnloos gaan.
2. Er mogen geen canules verstopt raken.
3. De canules mogen niet gaan lekken. (Stof komt dan wel in het lichaam maar niet direct in de vene, wat zorgt voor het acute effect van de stof.)
4. Het moet mogelijk zijn om de dieren sociaal te huisvesten.
5. Als we aan deze eisen kunnen voldoen, zal het ongerief van de dieren sterk verlaagd worden en zal de betrouwbaarheid van de resultaten omhoog gaan.

Aan de hand van deze eisen hebben we een aantal open en gesloten backmounts getest, met en zonder antibioticagebruik, en verschillende spoeloplossingen.

6. Het open systeem dat we getest hebben is een systeem van Camcath (Afb. 1). Dit systeem was al bij ons bekend en werd standaard toegepast.
7. Het gesloten systeem van SAI-infusie Technologies. Deze had een geïntegreerd kliksysteem, waardoor ze sneller aan- en afgekoppeld konden worden (Afb. 2).
8. Het gesloten systeem van Instech [3]. Dit systeem wordt afgesloten met een membraan en heeft een magneet in de backmount waardoor er een beschermkapje op geklikt kan worden. Dit verlaagt de kans op verstoppingen en infecties. Dit systeem heeft, door de magnetische werking, een snellere aan- en afkoppelmogelijkheid (Afb. 4).

De backmounts van Instech en SAI hebben allebei een zachte patch, wat beter aan de huid hecht zonder irritatie van de huid in vergelijking met het Camcath-systeem. Door zeer schoon te werken en het gesloten systeem te gebruiken konden we, mede op advies van de dierenarts, het dagelijks gebruik van antibiotica weglaten. Een bijkomend voordeel dus, dat bijdraagt aan de vermindering van antibioticagebruik.



Afbeelding 3a. Het membraan is stukgegaan na een aantal weken van infusies.  
 Afbeelding 3b. Met een inktoplossing werden de lekkages zichtbaar gemaakt (zie de pijl).

### Resultaten

1. Het open systeem van Camcath hebben we bij meerdere experimenten gebruikt. De eerste twee-drie weken liepen de canules goed door. Maar in de weken daarna vielen er steeds meer canules uit, waarbij uiteindelijk een groot deel van de canules verstopt was. Ook het aan- en afkoppelen was erg lastig en we merkten dat de dieren deze procedures niet altijd even prettig vonden. Bij de harde patch van Camcath zagen we bovendien bij meerdere dieren huidirritaties, beschadigingen en infecties optreden. Door de infecties (humane eindpunt) en de verstopte canules was de uitval bij deze experimenten erg hoog (ca. 80 %)
2. Bij de canules van SAI-infusion was het aan- en afkoppelen een duidelijke verbetering. De dieren waren hierdoor veel rustiger en ook bleef de backmount veel beter zitten met minder infectieproblemen bij de wondrand. Het stoppen met antibiotica in de spoelvoelstof zorgde toch op langere termijn voor bacteriële infecties in de bloedbaan, waardoor er in een experiment ca. 30 % van de dieren dood gingen. Ook zagen we binnen enkele weken veel lekkages en de membranen gingen hooguit twee maanden mee (Afb. 3). De uiteindelijke uitval met het SAI-systeem kwam op 90 % na twee maanden. Bovendien konden de dieren niet sociaal gehuisvest worden met dit systeem.
3. De canules van Instech werken dankzij het magnetische mechanisme erg snel bij aan- en af koppelen. Het werkt zo snel dat we de dieren niet hoeven te fixeren en ze er nauwelijks last van lijken te hebben. Een zachtere patch hecht beter aan de huid en we zien hierdoor geen huidirritatie meer bij de dieren. De wond is binnen een week gesloten en droog. Er waren geen lekkages en ook geen verstoppingen (N=12), zelfs gedurende een experiment van vier maanden.

### Conclusie

Door naar nieuwe systemen te kijken zijn we uitgekomen op een systeem dat eenvoudiger is in gebruik (sneller aan- en afkoppelen), minder irritatie en infectie geeft (zachtere patch), niet meer verstopt raakt (gesloten systeem) en sociale huisvesting mogelijk maakt (metalen kapje).

Een backmount met een snel aan- en afkoppelsysteem is erg belangrijk, zeker omdat de dieren nog wel eens geagiteerd uit de operante boxen komen (na gebruik van farmaca voor verstaringsonderzoek). Dit geeft minder onrust bij de dieren maar ook bij de biotechnici. Er is hierdoor ook minder frictie op de backmount, wat weer irritatie en infectie van de patch helpt te voorkomen. De patch is van zacht materiaal, dat zeer goed aan de huid hecht. Ook zien we dat de dieren sociaal gehuisvest kunnen worden door het beschermende metalen kapje. De dieren zijn veel beter te hanteren en vertonen ondanks de farmaca geen agressie naar de biotechnici. Lister Hooded-ratten vinden het



Afbeelding 4a. Backmount van Instech. Door het metalen kapje kan de canule afgesloten worden.  
 Afbeelding 4b. Door middel van magneten is snelle aan- en afkoppeling mogelijk.  
 Afbeelding 4c. De ratten met de backmount (en metalen kapje) kunnen sociaal gehuisvest worden.

ondanks trainen niet prettig om strak gefixeerd te worden. Dat is met dit systeem ook niet meer nodig. We merken dat ze hierdoor rustig meewerken. Bovendien zorgt het gesloten systeem ervoor, samen met de juiste spoelvoelstof (met antibiotica), dat het systeem niet verstopt raakt.

Extra tips die we mee willen geven: wat heel belangrijk is bij implantaten is steriel werken tijdens de operatie, en gedurende het experiment alles zo schoon mogelijk te houden. Als eenmaal een infectie bij de wond of onder de patch optreedt, is deze niet meer weg te krijgen. Wel is deze tijdelijk te onderdrukken met lokale antibiotica (Depomycine). Dagelijks moeten de metalen kapjes vervangen worden door schone kapjes, anders komt er wondvocht tussen wat weer opdroogt en dan zijn de kapjes erg moeilijk te verwijderen. De kapjes maken we dagelijks schoon in het ultrasoonbad. Wanneer er te veel aan de backmount wordt getrokken ontstaat er wondvocht, dat snel kan gaan ontsteken. 'Handling with care' is bij de backmount daarom zeer belangrijk. Als spoelvoelstof wordt er dagelijks 0,1 ml oplossing van 1 ml heparine/11 ml Gentamicine in 100 ml fysiologisch zout gebruikt [4]. Deze vloeistof moet om de week vers gemaakt worden. Daarnaast wordt gedurende het weekend de canule met 0,05 ml Tauro Lock afgesloten [2]. Dit voorkomt stolsels en lost eventuele ontstane stolsels op [3].

Samengevat hebben we, door het protocol aan te passen en nieuwe systemen te vergelijken, het ongerief voor de dieren verminderd. De dieren zijn voor de biotechnici beter te hanteren en hoeven niet meer gefixeerd te worden. Nog belangrijker is dat er nu geen uitval meer is door infecties of verstoppingen en de dieren sociaal gehuisvest kunnen worden. Een mooi resultaat dat ik graag met jullie wil delen.

### Bronnen

1. Luka Peternel, Spela Skrajnar, Manica Cerne, 2010. A comparative study of four permanent cannulation procedures in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological methods*, volume 61, jan-febr pages 20-26
2. P. Brandon Bookstaver, Pharm. D., BCPS (AQ-ID), AAHIVP, Kristina E. E. Rokas, Pharm. D., LeAnn B. Norris, Pharm.D., BCPS, BCOP, Julie M. Edwards, Robert J. Sherertz, M.D. Stability and compatibility of antimicrobial lock solutions. *American Journal of Health-System Pharmacy*, Volume 70, Issue 24, 15 December 2013, Pages 2185-2198, <https://doi.org/10.2146/ajhp120119> Published: 15 December 2013



[www.instechlabs.com/blog/guide-to-vascular-access-buttons](http://www.instechlabs.com/blog/guide-to-vascular-access-buttons)



[www.criver.com/sites/default/files/resources/ComparisonofCatheterLockSolutionsinRats.pdf](http://www.criver.com/sites/default/files/resources/ComparisonofCatheterLockSolutionsinRats.pdf)