

# Metode identifikacije i označavanja laboratorijskih miševa i štakora



S. Menčik\*, A. Ekert Kabalin, V. Sušić, M. Ostović, Ž. Pavičić,  
M. Maurić i I. Vlahek

## Uvod

Opisivanje laboratorijskih životinja ima za cilj jasnu identifikaciju jedinke na temelju specifičnih oznaka vanjskog izgleda određene vrste, odnosno pasmine ili linije te uz označavanje omogućuje njezinu točnu identifikaciju i praćenje tijekom istraživačkog rada (Donovan i Brown, 2006.). Prema Zakonu o zaštiti životinja (Narodne novine 102/2017), pod laboratorijskim životinjama podrazumijevaju se pokusne životinje koje se uzgajaju u svrhu korištenja u pokusima, znanstvene ili obrazovne svrhe te za rad na izoliranim organima, tkivima i trupovima u tu svrhu usmrćenih životinja i za proizvodnju bioloških pripravaka, i to: miš (*Mus musculus*), štakor (*Rattus norvegicus*), zamorčić (*Cavia porcellus*), zlatni hrčak (*Mesocricetus auratus*), kineski hrčak (*Cricetulus griseus*), mongolski skakač (*Meriones unguiculatus*), kunić (*Oryctolagus cuniculus*), pas (*Canis familiaris*), mačka (*Felis catus*), sve vrste primata koji ne uključuju čovjeka, žaba *Xenopus (laevis, tropicalis)* i Rana (*temporaria, pipens*) te zebrića (*Danio rerio*).

U zemljama članicama Europske unije (EU), osim zakonodavnih odredbi, smjernice za rad s laboratorijskim životinjama propisane su i od strane Europske federacije za znanost o laboratorijskim životinjama (engl. *Federation for European Laboratory Animal Science Associations – FELASA*) osnovane 1978. godine, u čijem se društvu od 2004. godine nalazi i Hrvatsko društvo za laboratorijske životinje (engl. *CROatian Laboratory Animal Science Association – CROLASA*) osnovano 1981. godine. Na svjetskoj razini postoje i mnogobrojni propisi i vodiči za korištenje te zaštitu zdravlja i dobrobiti laboratorijskih životinja (Anonymous, 2011.a, 2016.).

Prema službenim podatcima međunarodnih istraživačkih organizacija biomedicinskog područja, od svih vrsta laboratorijskih životinja najviše se u istraživačkom radu (> 95%) (<sup>1</sup>), koriste miševi i štakori. Jasna i točna identifikacija

<sup>1</sup> <https://us.vwr.com/store/product/13484919/rapid-tags-automated-animal-identification-ear-tags-rapid-lab>

Dr. sc. Sven MENČIK\*, dr. med. vet., docent (dopisni autor, e-mail: smencik@vef.hr), dr. sc. Anamaria EKERT KABALIN, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Velimir SUŠIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Mario OSTOVIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Željko PAVIČIĆ, dr. med. vet., dipl. ing. agr., redoviti profesor, dr. sc. Maja MAURIĆ, dr. med. vet., docentica, Ivan VLAHEK, dr. med. vet., asistent, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

laboratorijskih životinja, neovisno o primijenjenoj metodi označavanja, osnovni je uvjet za postojanje relevantnih rezultata u znanstvenom istraživanju (Wang, 2005.). Gubitak oznake ili otežana identifikacija za posljedicu može imati isključivanje životinja iz daljnjeg tijeka istraživanja i tako utjecati na rezultate pokusa (Anonymous, 1998., 2003.).

U ovom radu dat je pregled osnovnih postupaka prilikom identifikacije i označavanja laboratorijskih životinja - miševa i štakora.

## Postupci prilikom identifikacije laboratorijskih miševa i štakora

Prije samog označavanja, životinju je poželjno opisati, jasno i nedvosmisleno, prema specifičnim oznakama vanjskog izgleda vrste, pri čemu je nužno poznavanje anatomske građe i razvijenosti pojedinih regija tijela. Točan opis osnovni je preduvjet za identifikaciju životinje te sljedivost podataka tijekom znanstvenog istraživanja. Nejasno, netočno ili dvosmisleno opisivanje može rezultirati otežanom identifikacijom, potrebom za dodatnim brojem životinja u laboratorijsko-pokusne svrhe te u konačnici pogrešnim tumačenjem dobivenih rezultata. Prilikom opisivanja prosuđuje se vanjski izgled životinje uzimajući u obzir spoznaje o rastu i razvoju vrste, odnosno pasmine ili specifične linije, koštanu građu, izraženost spolnih obilježja te opću procjenu njezina zdravlja (Hrapkiewicz i sur., 2013.). Prilikom opisivanja potrebno je osigurati izvor svjetlosti, životinju opisati sa svih strana tijela (prednje, lijeve i desne, stražnje strane te područje trbuha). Poznavanje standarda vrste, odnosno pasmine, tj. opis idealnog pasminskog tipa prema vrsti laboratorijske životinje temelji se na prosuđivanju izgleda 11 regija tijela: glave, vrata, trupa, leđa, sapi,

repa, prsa, trbuha, ingvinalnog područja te prednjih i stražnjih ekstremiteta (Anonymous, 2011.a, 2016.). Procjenom razvitka pojedinih dijelova tijela, tjelesnih proporcija i kondicije stvaramo sliku odgovara li životinja propisanim standardima pasmine. Po završetku opisa prosuđuje se izgled, odnosno boja kože i sluznica te dlake kako bi se zaključno ustvrdilo stanje konstitucije, zdravlja i kondicije životinje (Anonymous, 2011.b). Boja kože uglavnom je konstantna (svijetlo ružičaste boje), dok boja dlake može varirati i uglavnom predstavljaju tzv. „ogledalo“ zdravlja životinje. Koža zdravih životinja je mekana, elastična, prekrivena finom, gustom, mekom dlakom dobrog sjaja, osim u bezdlačnih vrsta, odnosno pasmina, tj. specifičnih linija. Pri opisivanju laboratorijskih životinja, navode se specifične oznake, koje mogu biti urođene (šare drugih boja, zvrk dlake) ili stečene (ožiljci nastali tijekom života ili nedostatak nekoga dijela tijela). Laboratorijske životinje najčešće su jednoboje, no neke vrste, odnosno pasmine ili specifične linije mogu biti višebojne uz prisutne specifične šare (Anonymous, 2011.a,b, 2016.).

Tjelesnoj se masi prilikom opisivanja životinje često ne pridaje dovoljno pozornosti, s obzirom na to da je ona obilježje vrste, odnosno pasmine/linije. Da bi se jedinka izvagala i izmjerile pojedine dimenzije tijela preporučeno je, po potrebi, jedinku sedirati, kako bi se ozljeđivanje životinje prilikom rukovanja svelo na najmanju moguću mjeru (Anonymous, 1998., 2003., 2011.a).

Za uzimanje točne mjere tjelesne mase, laboratorijske životinje se važu specijalnim laboratorijskim vagama. Nadalje, mora se mjeriti točno i mirno, na način kako je propisano prema standardiziranom protokolu, a dobivene vrijednosti upisuju se u posebno pripremljene obrasce koji su sastavni dio istraživačkog protokola. Među najvažnijim mjerama su: dužina tijela

(od vrha njuške do vrha repa), dužina repa (od korijena repa do vrha), dužina stražnjih nogu (od vrha pete do vrha najduljeg prsta), dužina uške (od korijena uške do vrha), opseg prsnog koša (mjereno iza lopatice) te dubina prsa (od grebena do prsne kosti) (Pekow, 2005.).

Uzimanje tjelesnih mjera predstavlja važno sredstvo prilikom opisivanja životinje, kako bi se dobili točni podatci o odnosu pojedinih dijelova tijela. Potrebno je navesti kojim su mjernim instrumentom mjere uzete. Laboratorijski miševi i štakori najčešće se mjere ravnalom ili običnom vrpcom. Nadalje, prikaz pojedinih odnosa uzetim apsolutnim mjerama tijela može biti od koristi, jer se u postotcima jedne temeljne mjere može pouzdano pratiti povećanje ili smanjenje drugih, odnosno varijacije između istih. Opisna sredstva uključuju i fotografiranje životinje kako bi se i slikom dokumentirali odnosi dijelova tijela na početku, tijekom i na kraju istraživačkog rada. Snimanje se provodi uvijek istim uređajem, na isti način te na istoj udaljenosti. Ukoliko se životinje korištene u laboratorijske svrhe promatraju pojedinačno, preporučljivo je fotografiju postaviti na kavez s opisom i tumačem kartica kao sastavni dio identifikacijske dokumentacije. Za očekivati je da će nedvosmislenost, točnost opisivanja kao i sam uspjeh opisivanja ponajprije ovisiti o iskustvu, znanju, izvještenosti i osposobljenosti osoblja za rad s laboratorijskim životinjama (Anonymous, 2011.b, Buković-Šošić, 2016.).

## Metode označavanja laboratorijskih miševa i štakora

Laboratorijske životinje potrebno je označiti najboljom mogućom metodom, što ovisi o vrsti i namjeni istraživanja te načinu njihova uzgoja i držanja (skupnom ili pojedinačnom) (Tonguc

Isken i sur., 2008.). Uzimajući u obzir mnogobrojne metode koje se danas koriste u laboratorijskih životinja, pet je osnovnih načela koje prilikom provođenja samog načina označavanja moramo uzeti u obzir: 1. da je način označavanja što jednostavnije provediv, 2. da je označavanje provedivo po mogućnosti što ranije od rođenja, 3. da je ekonomski prihvatljivo, 4. dugotrajno, 5. da su prisutne oznake lako uočljive i čitljive u svakom trenutku.

U dosadašnjoj literaturi opisano je više načina označavanja laboratorijskih životinja, pri čemu se postojeće metode stalno usavršavaju novim tehnologijama i materijalima. Izbor metode označavanja ovisi o vrsti laboratorijske životinje, potrebama iste u istraživačkom radu, trajnosti materijala te troškovima postupka označavanja (Chen i sur., 2016.).

Metode označavanja laboratorijskih životinja mogu se podijeliti s obzirom na trajnost i invazivnost. S obzirom na trajnost mogu biti privremene metode označavanja, u kojih oznake traju od nekoliko sati do nekoliko dana te trajne metode s trajanjem oznaka do nekoliko godina ili tijekom cijeloga životnog vijeka jedinke. Metode označavanja prema invazivnosti mogu biti neinvazivne i invazivne, kojima se najčešće ujedno uzorkuje tkivo za potrebe genotipizacije (Dahlborn i sur., 2013.). Prilikom označavanja životinja cilj je smanjiti na najmanju moguću mjeru akutne posljedice koje mogu nastati prilikom samog mehaničkog postupka provedbe označavanja, s obzirom da su u većini slučajeva životinje po prvi puta u postupku rukovanja ili obuzdavanja (Pekow, 2005., Anonymous, 2011.b).

Dahlborn (2007.) je prikazao rezultate anketnog ispitivanja o primjeni najučestalijih metoda označavanja miševa i štakora. Ispitivanje je provedeno u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i Kanadi te Europi. U SAD-u i Kanadi, u najvećem postotku bile su zastupljene

dvije metode: urezivanje oznaka na uškama (44%) i označavanje ušnom markicom (48%). U zemljama Europe znatno su se manje koristile ušne markice (21%), a najčešće primijenjena metoda bila je urezivanje posebnih znakova ili oznaka na uškama zastupljena s 52%. Uklanjanje distalnoga članka prsta i tetoviranje uške bile su najmanje korištene metode za označavanje miševa i štakora istraživanih populacija.

## Privremene neinvazivne metode označavanja

### Označavanje kože flomasterom ili tušem (engl. *skin marking*)

Flomaster ili tuš služi za privremeno označavanje onih laboratorijskih životinja u kojih još nije dovoljno razvijena dlakavost. Područje označavanja ovisi o vrsti životinje, odnosno pasmini/liniji te kasnijim postupcima tijekom istraživanja. Primijenjuju se flomasteri različitih boja i oblika, s debljim ili tanjim vrhom, ili tuševi različitih boja. Ova metoda označavanja se najčešće koristi kada je životinje potrebno označiti kroz kraće vremensko razdoblje, od nekoliko sati do nekoliko dana (Anonymous, 2011.a, 2016., Chen i sur., 2016.). Oznake se najčešće postavljaju na području grebena ili leđa, a moguće su i na šapama, repu, uški, trbuhu te u pazušnom području.

Tonguc Isken i sur. (2008.) navode rezultate istraživanja provedenog na štakorima tijekom kojeg su promatrali trajnost oznaka na različitim regijama tijela štakora koristeći četkicu s tušem za bojanje dlake. Ovisno o prisutnosti oznaka na leđima, proksimalnim ili distalnim dijelovima prednjih i stražnjih ekstremiteta, označeni dio tijela imao je identifikacijsku oznaku prema metodi dodijele bročanih vrijednosti. Rezultati istraživanja su pokazali da su identifikacijske oznake na dlaci pojedinih regija tijela

ostale prisutne, ujedno i vidljive za očitavanje i 11 tjedana po provedenom označavanju.

Označavanje flomasterom ili tušom, kao privremena metoda, najčešće se primijenjuje pri sortiranju i razvrstavanju životinja unutar skupine (po spolu ili dobi), u novorođenih miševa i štakora te bezdlačnih životinja (Dahlborn i sur., 2013.). Prednosti metode su: jednostavna primjena, označavanje je moguće odmah po rođenju životinje, ekonomski je prihvatljiva, a oznake su odmah lako čitljive.

Nedostaci metode su: ograničeni broj identifikacijskih oznaka prilikom označavanja veće skupine životinja, moguća reakcija tkiva kod bezdlačnih životinja pri učestalijoj primjeni boja, moguća reakcija tkiva ili organizma prilikom unošenja boje kroz usta (učestalim lizanjem) što se u konačnici može odraziti na rezultate istraživačkog rada. Nadalje, moguća je otežana identifikacija pri skupnom držanju životinja zbog nestanka ili promjene boje (Leclercq i Rozenfeld, 2001.).

### Šišanje dlake, dlakorez (engl. *shaving/cutting the fur*)

Životinje se najčešće šišaju brijačim aparatom, a rjeđe posebnim škarama zaobljenoga vrha. Šišaju se pojedini dijelovi tijela koji su dobro obrasli dlakom, najčešće područja leđa i sapi i to u životinja starijih od dva tjedna. Dlaka se skraćuje na dužinu od svega nekoliko milimetara iznad kože u obliku specifičnih oznaka ili brojeva. Njihova vidljivost ovisi o intenzitetu rasta dlake, a u prosjeku traje od 1 do 4 tjedna. Prednost metode proizlazi iz jednostavne primjene, zatim se može primijeniti kod šarenih (višebojnih) jedinki, ekonomski je prihvatljiva, a oznaka je lako uočljiva u svakom trenutku, naročito u prvom tjednu nakon označavanja. Nedostaci su manji broj identifikacijskih oznaka te otežana identifikacija životinje s obzirom na rast dlake (Dahlborn i sur., 2013.).

## Privremene invazivne metode označavanja

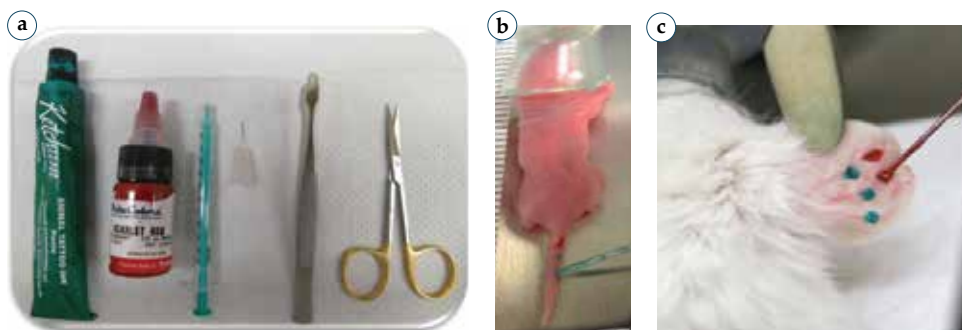
### Potkožna aplikacija tinte (engl. *subcutaneous ink application*)

Privremenom potkožnom aplikacijom tinte označavamo životinju oznakama koje su jasne, vidljive i nedvosmislene. Prije provođenja, potrebno je dezinficirati mehaničku opremu za potkožnu aplikaciju tinte i kožu (slika 1a). Uspjeh označavanja u velikoj mjeri ovisi o osposobljenosti osobe koja provodi postupak potkožne aplikacije. Oznake traju od nekoliko sati do nekoliko dana i najčešće se postavljaju u području repa (slika 1b) ili s vanjske strane uške (slika 1c), a rjeđe na članke prstiju prednje ili stražnje noge. Opisanom metodom mogu se označiti sve dobno-spolne kategorije laboratorijskih životinja (Chen i sur., 2016.). Prema navodima Castelhana-Carlos i sur. (2010.), označavanje većeg broja jedinki bijelog pokrova najčešće zahtijeva primjenu dviju različitih boja. Ukoliko su jedinke označene pojedinačnim oznakama, određena boja može označavati specifičnu brojčanu vrijednost (broja pet, deset ili slično). Oznaka može biti vidljiva i nekoliko mjeseci nakon aplikacije, ovisno o vrsti i intenzitetu rasta životinje.

Potkožna aplikacija tinte rijetko se koristi za označavanje članaka prsta novorođenih miševa ili pak štakora starijih od osam dana. U slučaju aplikacije, češće u novorođenih miševa, oznake na šapama vidljive su do mjesec dana nakon označavanja. Metoda nerijetko prouzroči upalne reakcije i otekline, što je mogući odgovor na samu aplikaciju tinte ili na njezinu količinu (Leclercq i Rozenfeld, 2001.). Lokalne reakcije tkiva na aplikaciju tinte mogu izravno utjecati na tijek i rezultate istraživanja (Kasanen i sur., 2011.). Nedostaci opisane metode su otežana primjena, veća manipulacija životinjama, moguće upalne reakcije na mjestu aplikacije, ograničeni broj oznaka prisutnih na člancima prsta ako su uzgajani u više različitih kaveza, primjena tinte različitih boja, potrebno poznavanje očitovanja oznaka na uškama, repu i člancima prsta (Castelhana-Carlos i sur., 2010.).

### Označavanje ušnom markicom (engl. *ear tag*)

Označavanje ušnom markicom jedna je od najčešće korištenih metoda označavanja laboratorijskih životinja. Ušne markice za laboratorijske životinje različitoga su oblika ovisno o vrsti životinje i namjeni istraživanja. Najčešće se koriste za označavanje miševa i štakora,



**Slika 1a.** Pribor za potkožnu aplikaciju tinte; **Slika 1b.** Potkožna aplikacija tinte u bezdlačnom području repa miša linije CD1 starosti tri dana; **Slika 1c.** Potkožna aplikacija tinte različitih boja u području uške miša linije CD1 starosti tri tjedna (Izvor: Chen i sur., 2016.).



**Slika 2a.** Metalna ušna markica s upisanim brojem za miša/štakora; **Slika 2b.** Metalna ušna markica s utisnutim brojem; **Slika 2c.** Metalna ušna markica s urezanim brojem; **Slika 2d.** Metalna ušna markica s utisnutim dvodimenzionalnim (2D) matričnim bar kodom. [Izvor: <https://www.kentscientific.com/products/eartagsmouseandrats>].

a uglavnom su izrađene od plastike (Dahlborn i sur., 2013.). Veličine su oko 5 mm s upisanim (slika 2a), utisnutim (slika 2b) ili laserski urezanim (slika 2c) brojem (identifikacijskom oznakom). Novije generacije ušnih markica, osim identifikacijskih oznaka u obliku brojeva, imaju urezan dvodimenzionalan (2D) matrični bar kod (slika 2d). Prema navodima proizvođača, u usporedbi s klasičnim, dvodimenzionalne ušne markice u bar kodu mogu pohraniti i do šest milijuna identifikacijskih oznaka, tj. zapisa. U svakodnevnom laboratorijskom radu sve je češća uporaba plastičnih ušnih markica različitih boja, oblika i veličina (<sup>2</sup>). Danas se najčešće za označavanje laboratorijskih životinja koriste plastične ušne markice različitih boja i oblika koje je moguće skinuti, što je osobito poželjno u onim istraživanjima koja uključuju primjenu suvremenih analitičkih metoda kao što je magnetska rezonancija (MR) ili kompjuterska tomografija (CT) (<sup>3,4</sup>).

Ušna se markica sastoji od dva odvojena dijela, pričvršćuje se za ušku životinje posebno dizajniranim klijestima. Prije označavanja potrebno je pregledati životinju, posebno područje gdje će ušna markica biti postavljena, dezinficirati kožu tkiva, ušnu markicu i instrumente

za označavanje. Osim navedenog, životinju treba pravilno obuzdati kako bismo prilikom označavanja/markiranja zahvatili donju trećinu uške (Kitagaki i Shibuya, 2004., Anonymous, 2011.a,b). Prema preporuci FELASA-e, miševe i štakore ušnom markicom najbolje je označiti nakon drugog, odnosno trećeg tjedna starosti kako bi se na najmanju moguću mjeru smanjio rizik od moguće infekcije te moguća pojava nekrotičnih, ulcerativnih i neoplastičnih promjena na tkivu uške (Dahlborn i sur., 2013.).

Markice izgledom i kvalitetom moraju biti jednostavne za primjenu, da oblikom i veličinom umanje moguću pojavu stresa i boli prilikom označavanja, da su dovoljno čvrste, elastične, lagane i otporne. Nakon markiranja potrebno je pratiti kliničko stanje životinje. Istraživanja su pokazala da je u pojedine vrste glodavaca zabilježen znatno veći gubitak metalnih (45%) u odnosu na plastične (10%) ušne markice (Kitagaki i Shibuya, 2004.). Prilikom identifikacije, očitavanja brojeva ili oznaka na ušnoj markici, životinji je potrebno prići dovoljno blizu te je otežano i rukovanje s laboratorijskim životinjama. Moguće nuspojave su upala i proliferacija tkiva te neoplazije. U pojedinih linija laboratorijskih miševa (C57BL/6) zabilježena je upala ušne hrskavice, što je moguća posljedica autoimunoga odgovora tkiva na spojeve legure ušne markice (Waalkers i sur., 1987.). Nadalje, u životinja označenih metalnim ušnim markicama, ustvrđene su više razine bakra i citokina u usporedbi s onima koje nisu bile označene (Kitagaki i Hirota, 2007.).

<sup>2</sup> <http://www.pharmaseq.com/index.php/technology/p-chips-for-tagging-authentication-applications>

<sup>3</sup> <http://www.taconic.com/prepare-your-model/preconditioning-solutions/todent-id/>

<sup>4</sup> <https://www.eickemeyer.com/Pet-Care/More/Tattoo-Equipment-Hauptner.html> [www.animalaid.com](http://www.animalaid.com)

## Trajne invazivne metode označavanja

### Tetoviranje (engl. *tattooing*)

Tetoviranje podrazumijeva trajnu aplikaciju tinte različitih boja u kožu, u obliku brojeva ili oznaka, pomoću posebno izrađenih igli. Prije tetoviranja potrebno je provesti postupak smanjenja ili isključenja osjećaja boli u životinje, dezinficirati standardnu (električnu) opremu i kožu tkiva te pregledati dijelove tijela na kojima će se postaviti identifikacijska oznaka svojstvena vrsti, odnosno pasmini/liniji (Chen i sur., 2016.). Osim tetovirnih igli, mogu se koristiti klijesta s rotirajućim glavama ili pojedinačnim igličastim umetcima<sup>(5)</sup>. U miševa i štakora uglavnom se tetovira unutarnja ili vanjska strana uške, rep (slika 3a) ili članci prsta (slika 3b). Standardnom (električnom) tetovažnom opremom (slika 3c), mogu se tetovirati odrasli miševi i štakori, s oznakama u obliku slova i/ili brojeva (Castelhano-Carlos i sur., 2010.). Ako se igličastim umetcima tetovira unutarnja strana uške na mjesto uboda potrebno je utrljati tuš ili pastu, a oznake postaju vidljive nekoliko dana nakon označavanja. Metoda je jednostavna, a njezina primjena moguća i u novorođenih miševa starih svega nekoliko dana, na način da se tetovira članak prsta (Kasanen i sur., 2011.), no najčešće se preporučuje nakon odbića (De Greeve, 2007.). Chen i sur. (2016.) navode da su prednosti opisane metode ekonomska prihvatljivost, dugotrajnost, dobra vidljivost oznaka prilikom očitavanja identifikacijske oznake te jednostavna primjena. Primjenom tinte različitih boja te uporabom mehaničkog sustava za tetoviranje, povećala se brzina označavanja tijekom samog postupka, ali i smanjila mogućnost



**Slika 3a.** Tetovirna oznaka na repu miša; **Slika 3b.** Tetovirna oznaka na člancima prsta novorođenoga miša; **Slika 3c.** Prikaz osnovne opreme za tetoviranje (Izvor: [http://www.itsbio.co.kr/main/goods\\_view.php?category2=81&no=640](http://www.itsbio.co.kr/main/goods_view.php?category2=81&no=640)).

upalnih reakcija. Nedostatci opisane metode ponekad su nejasne oznake zbog moguće vibracije mehaničke opreme, manji volumen aplicirane tinte te otežana identifikacija životinja nakon duljeg razdoblja<sup>(6)</sup>.

<sup>5</sup> <http://www.jax.org/universalearpunchmouse-numberingsystem2015030t101044.pdf>

<sup>6</sup> <https://www.kentscientific.com/products/eartagsmouseandrats>



**Slika 4a.** Tetoviranje članka prsta miša, uporaba mikrotetovirne igle i spremnika s tintom; **Slika 4b.** Mikrotetoviranje uške miša (Izvor: Dahlborn i sur., 2013.).

Postupak iziskuje spretnost, dobru tehniku rada i osposobljenost osoblja kako bi se na najmanju moguću mjeru svele moguće ozljede ili nenamjerna oštećenja tkiva (uške, repa ili šape). Ako se miševima tetovira rep (slika 3b), to treba učiniti do drugog ili trećeg tjedna starosti.

#### **Mikrotetoviranje (engl. *microtattooing*)**

Postupak mikrotetoviranja sličan je tetoviranju, uz razliku što se pri mikrotetoviranju (brojeva, linija ili posebnih znakova) koriste mikrotetovirne igle specifične za određenu vrstu životinje (Kasanen i sur., 2011.). Veličina opreme za rad ovisi o vrsti i veličini životinje, a uključuje pincete, mikrotetovirnu iglu i spremnik s tintom (slika 4a) (Dahlborn i sur., 2013.). Mikrotetoviranje novorođenih miševa i štakora provodi se uz pomoć povećala, a tetovirne oznake najčešće se postavljaju na članku prsta (slika 4a) ili ušci (slika 4b). Ovom metodom mogu se označavati jedinke svih dobnih skupina,

uključujući i novorođene životinje (Chen i sur., 2016.).

#### **Elektroničko označavanje, mikročipiranje (engl. *microchipping*)**

Elektroničko se označavanje laboratorijskih životinja provodi primjenom mikročipa, tzv. elektroničkog transpondera, različitog oblika i veličina. Mikročip se aplicira u potkožje, najčešće u međulopatičnom području. Pri aplikaciji, bitno je poštivati načela asepse i antiseptice te osigurati opću (inhalacijsku) anesteziju jedinke u skladu s veterinarskom praksom. S obzirom da se radi o invazivnoj metodi, preporuča se nakon označavanja pratiti kliničko stanje životinje, a mjesto aplikacije zatvoriti mikrošavom (Albrecht, 2010.). Mikročip se sastoji od niskoenergetskog transpondera koji sadrži jedinstvenu, brojčanu identifikacijsku oznaku. Na tržištu su dostupne različite veličine mikročipova za laboratorijske životinje, dimenzija 12 mm dužine i 1 mm širine,



**Slika 5a.** Prikaz dviju veličina mikročipova, za miša (gornji) i štakora (donji); **Slika 5b.** Prikaz odnosa dviju veličina igala za mikročipiranje i veličine odrasloga miša linije C57BL (Izvor: Dahlborn i sur., 2013.).





**Slike 6a-6d.** Različiti oblici škara za urezivanje znakova na uškama miševa i štakora [Izvor: [http://www.braintreesci.com/prodinfo.asp?number=EP-A7020.](http://www.braintreesci.com/prodinfo.asp?number=EP-A7020)]

odnosno manji, dimenzija 6 mm dužine i 1 mm širine (slika 5a i 5b). Prislانjanjem elektroničkog čitača na mikročip potiče se niskofrekventni signal i prijenos identifikacijskih oznaka na uređaju između mikročipa i čitača kako bi se očitala identifikacijska oznaka u obliku slova i/ili brojeva (Mandecki i sur., 2006.). Cijena elektroničkog označavanja ponajprije ovisi o cijeni elektroničkog transpondera – mikročipa, programa za pohranu podataka te opreme za potrebe rada. Razvojem tehnologije i novih materijala na tržištu dostupni su mikročipovi s većim kapacitetom pohrane podataka, uz istodobno očitavanje osnovnih fizioloških funkcija životinja, poput otkucaja srca ili temperature tijela (Anonymous, 2011.a, 2016.). Označavanje miševa ili štakora mikročipom najbolje je provesti nakon odbića, ukoliko je iz bilo kojeg razloga to potrebno učiniti ranije ne preporuča se prije 10. dana starosti (Dahlborn i sur., 2013.).

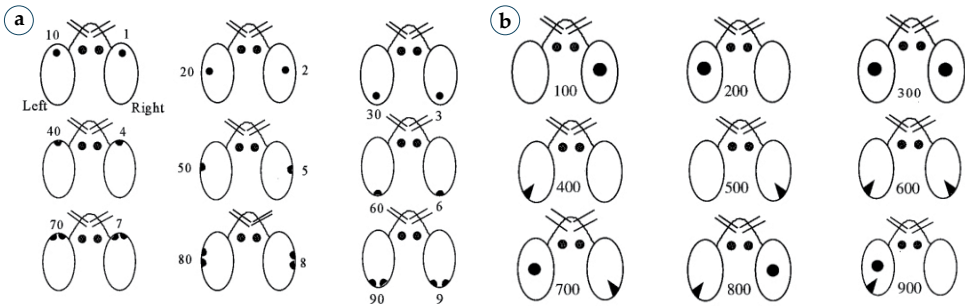
Prednosti metode proizlaze iz točne i nedvosmislene identifikacije, pohrana podataka o većem broju jedinki te bežičnoga prijenosa podataka za potrebe analize i praćenja podataka tijekom istraživačkog rada. Nedostaci mikročipiranja, prije svega, su visoka cijena opreme, otežan rad s mladim životinjama, u mladim miševa (do pet dana starosti) osim učestalijeg glasanja, mogu se javiti i nekontrolirani pokreti ekstremiteta i mokrenje (Castelhano-Carlos i sur., 2010.).

Pri dugotrajnim istraživanjima mogu se javiti tumorske i metasta-

ske tvorbe, kao posljedica reakcije organizma na strano tijelo u obliku proliferacije vezivnoga tkiva, imunološke reakcije organizma te upalni procesi na mjestu označavanja (Kitagaki i Hirota, 2007.). Albrecht (2010.) navodi da su ograničene tumorske tvorbe pri dugotrajnoj potkožnoj aplikaciji mikročipa utvrđene u 0,8 do 4,1% laboratorijskih slučajeva.

### **Urezivanje znakova na uškama (bušenje uške – rovašenje) (engl. ear punching or notching)**

To je trajna invazivna metoda označavanja kojom se posebnim škarama (slike 6a-6d) urezuju ili zarezuju znaci na ušci životinje, najčešće miševa i štakora. Znaci mogu biti različitih oblika i veličine (0,5-2 mm) (Dahlborn i sur., 2013.). Prije označavanja potrebno je dezinficirati opremu, primjereno obuzdati životinju kako bi se umanjio stres, mogućnost ozljeđivanja životinje, ali i osobe koja provodi postupak. Osim navedenog, prethodno je potrebno usaglasiti se oko načina označavanja i tumačenja pojedinih oznaka, tj. opisati jedinstveni sustav oznaka kako bi i druge osobe bile u mogućnosti identificirati životinju na temelju položaja urezaka na ušci, sustavom brojanih vrijednosti. Oznake se uobičajeno tumače pomoću standardiziranoga grafikona ili fotografije s jasnim i nedvosmislenim oznakama, kao što je prikazano na slikama 7a i 7b. Ovom se metodom može označiti velik broj životinja u skupini, kroz različite kombinacije oznaka na ušci, dok se u



**Slike 7a i 7b.** Tumačenje identifikacijskih oznaka na temelju urezaka na ušci, sustavom brojčanih vrijednosti. (Izvor: <http://www.jax.org/universalearpunchmousetnumberingsystem2015030t101044.pdf>).

manjim skupinama naročito olakšava identifikacija jedinke. <sup>(5)</sup>.

Cinelli i sur. (2007.) navode da su nedostaci metode, prije svega, moguće upalne i nekrotične promjene na tkivu te otežana identifikacija u velikim skupinama životinja. Oznake na ušci mogu biti i nedovoljno jasne (npr. dvije oznake su preblizu jedna drugoj). Neovisno o njihovoj veličini tijekom nekoliko mjeseci mogu i zacijeliti, zbog čega pojedini autori ovu metodu smatraju privremenom invazivnom metodom označavanja laboratorijskih životinja (Hawkins i sur., 2006.).

Kasanen i sur. (2011.) istraživali su utjecaj različitih metoda označavanja (tetoviranje, mikrotetoviranje, urezivanje znakova) na fiziološke pokazatelje miševa i štakora. Ustvrdili su da se vrste razlikuju u frekvenciji otkucaja srca, tjelesnoj aktivnosti i temperaturi tijela s obzirom na metodu označavanja. Štakori su imali značajno više vrijednosti tlaka i frekvencije otkucaja srca prilikom označavanja urezivanjem znakova u usporedbi s tetoviranjem u odnosu na miševe. To, između ostaloga, pripisuju većem opsegu sputavanja i manipulativnim postupcima sa štakorima nego miševima. Opisana metoda označavanja jednostavna je za primjenu i omogućuje jednostavnu identifikaciju, a uklonjeni uzorak tkiva može poslužiti za potrebe genotipizacije, tj. analize genoma životinje.

### Uklanjanje distalnoga članka prsta (engl. *distal phalanx removal*)

Prema preporuci FELASA-e, uklanjanjem distalnoga članka prsta prvenstveno se označavaju mladi miševi i štakori, između 4. i 7. dana starosti. Osim toga, tako se ujedno mogu uzeti uzorci tkiva za potrebe biopsije i/ili genotipizacije (Dahlborn i sur., 2013.). Identifikacija se temelji na nedostatku pojedinog članka prsta na šapi/šapama životinje. Metoda se najčešće koristi za označavanje miševa. Mogućnost uklanjanja distalnoga članka prsta ovisi o njegovoj razvijenosti, i varira među pojedinim sojevima miševa, uz prosječnu dužinu članka od 2 do 3 mm u jedinki starih do sedam dana. Pravilno uklanjanje uključuje obuzdavanje i fiksaciju noge životinje na kojoj ćemo pomoću posebnih mikrokirurških škara ukloniti članak prsta (Schaefer i sur., 2010.).

Osifikacija članaka prstiju u miša nastupa u dobi od oko dva tjedna starosti pa je članak potrebno ukloniti prije, u prvom tjednu života, kako bi se osigurao nesmetani razvoj šape te spriječile komplikacije koje se mogu javiti pri kasnijem uklanjanju (Castelhano-Carlos i sur., 2010., Schaefer i sur., 2010., Spangenberg, 2010.). Životinju je potrebno sputati na ispravan način (Neufeld i Zhao, 1995.), spriječiti nagle pokrete ekstremiteta na kojem se provodi označavanje, osobito životinju u dobi od ne-

koliko dana, kako bi se izbjegle moguće negativne posljedice za kasnije životne funkcije, poput smanjene snage preostalih članaka prsta na ekstremitetima (Schaefer i sur., 2010.). Prednosti metode odnose se na mogućnost genotipizacije, identifikacije i odabira jedinki poželjnog genotipa. Nedostaci metode ponajprije proizlaze iz njezine invazivnosti i potrebe za edukacijom te kontinuiranim osposobljavanjem osoblja za uzorkovanje biološkog materijala.

### Identifikacija laboratorijskih životinja metodom genotipizacije (engl. *identification and genotyping in laboratory animals*)

Identifikacija laboratorijskih životinja metodom genotipizacije temelji se na analizi manjih ili većih oligonukleotidnih sljedova, tj. specifično umnoženih odsječaka gena prema vrsti, odnosno pasmini/liniji miša ili štakora. Za potrebe genotipizacije najčešće se uzima uzorak tkiva uške, repa, rjeđe krvi ili tkiva ekstremiteta (Cinelli i sur., 2007.). Prema rezultatima istraživanja Diesch i sur. (2009.), tkivo je najbolje uzorkovati što prije nakon rođenja, pri čemu je biopsiju repa u miša i štakora preporučljivo obaviti do 12. dana starosti. Tkivo se uzorkuje mikrokirurškim škarama ili skalpelom (slika 8a). Prema navodima Schneider i Wolf (2005.) za potrebe genotipizacije potrebno je uzeti uzorak tkiva najmanje dužine 5 mm, a pri uklanjanju distalnog članka prsta najmanje 2 mm (slika 8b) uz primjenu lokalne anestezije (npr. otopina etanola u trajanju od 10 sekundi, površinska aplikacija spreja na bazi etil-klorida (slika 8c). Hankenson i sur. (2008.) navode da se najbolja količina i koncentracija DNK za genotipizaciju dobije ako se tkivo uzorkuje između 10. i 21. dana starosti u miša. Isti autori navode da se uzorak za genotipizaciju može prikupiti i uzimanjem brisa sluznice usne šupljine ili rektuma, dlake s korijenom

te biopsijom repa. Količina tkiva za genotipizaciju, propisana određenim protokolom, osnova je za dovoljnu količinu i koncentraciju DNK za daljnje molekularno-genetske analize.

Uzorkovanje tkiva za potrebe genotipizacije jedan je od najčešćih načina za identifikaciju poželjnih genotipova miševa u istraživanjima pretilosti, dijabetesa te ostalih metaboličkih bolesti usko povezanih s ulogom koju pojedini hormoni imaju u regulaciji metabolizma i tjelesne mase. Upravo je postupak genotipizacije u velikoj mjeri pogodovao uzgoju poželjnih linija miševa kao modela za proučavanje metaboličkih i nasljednih bolesti (Sutter i sur., 2013.).

Poznavanjem molekularnoga slijeda nukleotidnih baza učinkovito se mogu otkriti promjene nastale na području odgovarajućih gena, posebno onih specifičnih nasljednih bolesti od interesa za buduća istraživanja različitih metaboličkih i zloćudnih bolesti (Namae i sur., 1998., Diesch i sur., 2009., Sutter i sur., 2013.). Chung i sur. (1997.), Hirasawa i sur. (1997.) i Namae i sur. (1998.) među prvima su opisali postupak genotipizacije i identifikacije pojedinih genotipova miševa na temelju specifično umnoženih



**Slika 8a.** Prikaz najčešće korištenih instrumenata za uzorkovanje tkiva za potrebe genotipizacije; **Slika 8b.** Mjerenje dužine tkiva (repa) za genotipizaciju; **Slika 8c.** Primjena lokalne anestezije na bazi etil-klorida na vrhu repa. **Slika 8d.** Uzorkovanje vrha repa za potrebe genotipizacije (Izvor: [http://www.theodora.com/rodent\\_laboratory/genotyping.html](http://www.theodora.com/rodent_laboratory/genotyping.html)).

odsječaka gena metodom lančane reakcije polimerazom.

Prednosti identifikacije laboratorijskih životinja metodom genotipizacije su mogućnost dugotrajne pohrane uzoraka, kontinuirano nadopunjavanje baze podataka novim uzorcima tkiva i DNK zapisima, analiza i usporedba starih arhiviranih i novih uzoraka/podataka za potrebe istraživanja ubrzo nakon rođenja, rana dijagnostika pojedinih nasljednih bolesti, smanjenje troškova uzgoja i broja laboratorijskih životinja za potrebe istraživanja.

Nedostatci same metode su i dalje relativno visoki troškovi genotipizacije. Unatoč navedenom, metoda sve više pronalazi uporabu u identifikaciji laboratorijskih životinja. Pri identifikaciji laboratorijskih životinja metodom genotipizacije, još uvijek se osim poznatog genotipa koristi i jedna od vizualnih metoda označavanja, najčešće ušnom markicom.

## Sažetak

Opisivanje i označavanje laboratorijskih životinja imaju za cilj jasnu identifikaciju jedinice što je jedan od glavnih preduvjeta za pouzdanost istraživanja, praćenje i sljedivost podataka tijekom istraživačkog rada, naročito u slučaju genetski izmijenjenih životinja. Od svih vrsta laboratorijskih životinja koje se prema zakonskim aktima smiju koristiti u laboratorijske svrhe, u više od 95% slučajeva zastupljeni su miševi i štakori, različitih linija, ovisno o namjeni i vrsti istraživanja. Prije označavanja potrebno je opisati laboratorijsku životinju, poznavati standarde vrste, odnosno pasmine ili linije. Opisivanje laboratorijskih životinja prema procjeni i razvitku pojedinih regija tijela, boji kože, tjelesnim izmjerama te fotografiranjem, uvelike ovisi o iskustvu, znanju i osposobljenosti osoblja. Pet je osnovnih načela koja se moraju uzeti u obzir prilikom označavanja: da je metoda označavanja jednostavna za primjenu, da se može koristiti što ranije od rođenja životinja, da je ekonomski prihvatljiva, da je dugotrajna te da su prisutne oznake lako uočljive i čitljive

u svakom trenutku identifikacije. Metode označavanja laboratorijskih životinja mogu se podijeliti s obzirom na trajnost i invazivnost. Prema trajnosti mogu biti privremene ili trajne, a prema invazivnosti invazivne ili neinvazivne. Privremene neinvazivne metode označavanja uključuju primjenu flomastera ili tuša te šišanje dlake, a privremene invazivne metode potkožnu aplikaciju tinte te označavanje laboratorijskih životinja ušnom markicom. Tetoviranje/mikrotetoviranje, elektroničko označavanje, urezivanje znakova na ušci, uklanjanje distalnoga članka prste te identifikacija laboratorijskih životinja metodom genotipizacije su trajne invazivne metode označavanja. Urezivanje znakova na ušci te označavanje ušnom markicom najzastupljenije su metode označavanja laboratorijskih miševa i štakora. Ovisno o vrsti životinje, postupcima, vremenu i tijeku rada te u skladu sa zakonskim aktima o zaštiti dobrobiti životinja primijenit će se najbolja metoda opisivanja i označavanja laboratorijskih životinja. Uspjeh označavanja laboratorijskih životinja u znatnoj mjeri ovisi o iskustvu, educiranosti i osposobljenosti osoblja te primjeni specijalne opreme za označavanje.

**Ključne riječi:** *identifikacija, označavanje, laboratorijske životinje (miš i štakor)*

## Literatura

1. ALBRECHT, K. (2010): Microchip-induced tumors in laboratory rodents and dogs: a review of the literature 1990-2006. Proceedings of the International Symposium on Technology and Society. 7<sup>th</sup> to 9<sup>th</sup> June 2010. Wollongang, Australia, pp. 337-349.
2. Anon. (1998): Guidelines on choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching, and testing. Appendix A: species specific signs of pain and/or distress. Ottawa, Canada. Canadian Council on Animal Care.
3. Anon. (2003): Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. Washington, D. C.: National Research Council, National Academies Press.
4. Anon. (2011a): Guideline for rodent identification policy. Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). The Ohio State University, pp. 1-2.
5. Anon. (2011b): Guide for the care and use of laboratory animals, 8<sup>th</sup> ed. Washington, D. C.: National Research Council, Academy Press.
6. Anon. (2016): Guideline: rodent identification. Institutional Animal Care and Use Committee

- (IACUC). University of Pennsylvania, Penn Animal Welfare, pp. 1-4.
7. BUKOVIĆ-ŠOŠIĆ, B. (2016): Zakonska regulativa istraživanja na životinjama. 16. Simpozij istraživanja na modelima laboratorijskih životinja: stanje i perspektive u Hrvatskoj i na Sveučilištu u Rijeci. Rijeka, 6. listopada 2016. str. 1.-2.
  8. CASTELHANO-CARLOS, M. J., N. SOUSA, F. OHL and V. BAUMANS (2010): Identification methods on newborn C57BL/6 mice: a development and behavioural evaluation. *Lab. Anim.* 44, 88-103.
  9. CHEN, M., L. KAN, B. T. LEDFORD and J. Q. HE (2016): Tattoo various combinations of ears tail and toes to identify mice reliably and permanently. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 55, 189-198.
  10. CHUNG, W. K., S. C. CHUA, G. H. LEE and R. L. LEIBEL (1997): Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) and electrophoretic assays for the mouse obese (Lepob) mutation. *Obes. Res.* 5, 183-185.
  11. CINELLI, P., A. RETTICH, B. SEIFERT, K. BÜRKI and M. ARRAS (2007): Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Lab. Anim.* 41, 174-184.
  12. DAHLBORN, K. (2007): Animal identification for rodents. Book of Abstract of the 37<sup>th</sup> Scand-LAS Symposium. Tromsø, 10<sup>th</sup> to 13<sup>th</sup> May 2007. p. 84.
  13. DAHLBORN, K., P. BUGNON, T. NEVALAINEN, M. RASPA, P. VERBOST and E. SPANGERBERG (2013): Reports of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Lab. Anim.* 47, 2-11.
  14. DE GREEVE, P. (2007): Code of practice for monitoring the welfare of laboratory animals. University of Groningen, Groningen, Netherlands. pp. 1-35.
  15. DIESCH, T., D. MELLOR, C. JOHNSON and R. LENTLE (2009): Electroencephalographic responses to tail clamping in anesthetized rat pups. *Lab. Anim.* 43, 224-231.
  16. DONOVAN, J. and P. BROWN (2006): Animal identification. *Current Protocols in Immunology*, Chapter 1: Unit 1.5. doi: 10.1002/0471142735.im0105s73
  17. HANKENSON, F. C., L. M. GARZEL, D. D. FISCHER, B. NOLAN and K. D. HANKENSON (2008): Evaluation of tail biopsy collection in laboratory mice (*Mus musculus*): vertebral ossification, DNA quantity, and acute behavioral responses. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 47, 10-18.
  18. HAWKINS, P., M. L. FELTON, P. VAN LOO, M. MACONOCHE, D. J. WELLS, N. DENNISON, R. HUBRECHT and M. JENNINGS (2006): Report of the 2005 RSPCA/UFOW Rodent Welfare Group meeting. *Lab. Anim.* 35, 29-38.
  19. HIRASAWA, T., T. OHARA and S. MAKINO (1997): Genetic typing of the mouse *ob* mutation by PCR and restriction enzyme analysis. *Exp. Anim.* 46, 75-78.
  20. HRAPKIEWICZ, K., L. COLBY and P. DENISON (2013): *Clinical laboratory animal medicine: an introduction*. Iowa: John Wiley & Sons.
  21. KASANEN, I. H., H. M. VOIPIO, H. LESKINEN, M. LUODONPAA and T. O. NEVALAINEN (2011): Comparison of ear tattoo, ear notching, and microtattoo in rats undergoing cardiovascular telemetry. *Lab. Anim.* 45, 154-159.
  22. KITAGAKI, M. and K. SHIBUYA (2004): Nylon ear tags for individual identification of guinea pigs. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 43, 16-20.
  23. KITAGAKI, M. and M. HIROTA (2007): Auricular chondritis caused by metal ear tagging in C57BL/6 mice. *Vet. Pathol.* 44, 458-466.
  24. LECLERCQ, G. C. and F. M. ROZENFELD (2001): A permanent marking method to identify individual small rodents from birth to sexual maturity. *J. Zool.* 254, 203-206.
  25. MANDECKI, W., B. ARDELT, T. CORADETTI, H. DAVIDOWITZ, J. FLINT, Z. HUANG, W. KOPACKA, X. LIN, Z. WANG and Z. DARZYNKIEWICZ (2006): Microtransponders, the miniature RFID electronic chips, as platforms for cell growth in cytotoxicity assays. *Cytometry* 69, 1097-1105.
  26. NAMAIE, M., Y. MORI, K. YASUDA, T. KADOWAKI, Y. KANAZAWA and K. KOMEDA (1998): New method for genotyping the mouse *Lep (ob)* mutation, using a polymerase chain reaction assay. *Lab. Anim. Sci.* 48, 103-104.
  27. NEUFELD, D. A. and W. ZHAO (1995): Bone regrowth after digit tip amputation in mice is equivalent in adults and neonates. *Wound Repair Regen.* 3, 461-466.
  28. PEKOW, C. (2005): Defining measuring and interpreting stress in laboratory animals. *Contemporary Topics* 44, 41-45.
  29. Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Narodne novine 102/2017).
  30. SCHAEFER, D., I. N. ASNER, B. SEIFERT, K. BURKI and P. CINELLI (2010): Analysis of physiological and behavioural parameters in mice after toe clipping as newborns. *Lab. Anim.* 44, 7-13.
  31. SCHNEIDER, M. R. and E. WOLF (2005): Genotyping of transgenic mice: old principles and recent developments. *Anal. Biochem.* 1, 1-7.
  32. SPANGENBERG, E. (2010): Evaluation of identification methods for mice. *Proceedings of the 44<sup>th</sup> Congress of the International Society for Applied Ethology (ISAE)*. 7<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> August 2010. Uppsala, Sweden. SLU, Sweden.
  33. SUTTER, A. G., A. P. PALANISAMY, N. KURTZ, D. D. SPYROPOULOS and K. D. CHAVIN (2013): Efficient method of genotyping *Ob/Ob* mice using high resolution melting analysis. *PLoS* 8(11):e78844. doi:10.1371/journal.pone.0078840
  34. TONGUC ISKEN, M., C. SEN, H. EGE OZGENTAŞ and D. ISCEN (2008): An alternative animal marking method: use of hair dye. *Gazi Med. J.* 19, 71-72.

35. WAALKES, M. P., S. REHM, K. S. KASPRZAK and H. J. ISSAQ (1987): Inflammatory, proliferative, and neoplastic lesions at the site of metallic identification ear tags in Wistar [CrI:(WI)BR] rats. *Cancer Res.* 47, 2445-2450.
36. WANG, L. (2005): A primer on rodent identification methods. *Product Focus. Lab. Anim.* 34, 64-67.
37. Zakon o zaštiti životinja (Narodne novine 102/2017).

## Methods of identification and marking of laboratory mice and rats

Sven MENČIK, DVM, PhD, Assistant Professor, Anamaria EKERT KABALIN, DVM, PhD, Full Professor, Velimir SUŠIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Mario OSTOVIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Željko PAVIČIĆ, DVM, B. Agr. Sc., PhD, Full Professor, Maja MAURIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Ivan VLAHEK, DVM, Assistant, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

The aim of laboratory animal description and marking is the clear identification of each individual animal, as one of the preconditions for research reliability, follow up and traceability of data recorded during research, especially in the case of genetically modified animals. Mice and rats of various lines account for more than 95% of all laboratory animal species that can be used legally in laboratory research, depending on the purpose and type of studies. Prior to marking, the laboratory animal should be described, based on the due knowledge of the standard species, breeds and lines. Describing laboratory animals according to assessment and development of particular parts of the body, skin colour, body measures and photographs greatly depends on the experience, knowledge and competence of personnel. There are five basic principles that should be considered in animal marking, as follows: the marking method should be simple to use, applicable as early as possible after birth, economically acceptable, long-life, and the marks should be readily observable and legible at any time of identification. The methods of laboratory animal marking can

be divided according to their durability and invasiveness. In terms of durability, they can be temporary or permanent, while in terms of invasiveness they can be invasive or non-invasive. Temporary non-invasive marking methods include the use felt-tip pen (skin marking) and shaving/cutting the fur, whereas temporary invasive methods include subcutaneous ink application and ear marking (ear tag). Tattooing/micro-tattooing, electronic marking (microchipping), ear notching, removal of the finger distal phalanx, and genotyping are permanent invasive methods of laboratory animal marking. Ear notching and ear marking are the most widely used methods of marking laboratory mice and rats. The best method of laboratory animal marking depends on the animal species and must be in accordance with the legislation on animal welfare, procedures, timing and course of laboratory experiments. Success of laboratory animal marking greatly depends on personnel experience, training and competence, and on the use of specialized marking equipment.

**Key words:** *identification, marking, laboratory animals (mouse and rat)*