

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION			CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO			FECHA		

TABLAS ANEXOS

Analgesia y Anestesia Animales de granja

	VIA	GATO	PERRO	CERDO	OVEJA	MONO
Premedicacion						
Atropina SC IM	SC/IM	0, 05	0, 05	0, 05	0, 5	0, 05
Anestesia de corta duracion						
Propofol IV (5-10 min)	IV	5-8	4-7	2- 4	4- 6	2,5 – 5
Tiopental Na IV (20-25 min)	IV	10- 15	10-20	10- 20	25	2,5 – 5
Etomidato	IV	1,5- 3	1,5- 3	4-8	2	-
Anestesia de media duracion						
Alfadolona + Alfaxolona	IM	10 *	-	6- 8	-	10-15
Fentanilo + Fluanisona (ml/kg) \ diacepan	IM	-	0,1-0,2 *	-	-	0,3\ 0
Ketamina \ Diacepan	IM	10/0.5	10\ 0,5	15\2	4-7\0,2	10\0,3*
Ketamina \ Xilacina	IM	20\1	5\2 IV	20\2	4-7\ 0,1	15\1
Ketamina\ Medetomidina	IM	7,5\ 0,04 IV	5\0,0A IV	10\0,2 IV	5\0,02	6\0,05*
Tiletamina\ Zolacepan	IM	10-15	6-12	5-9	4	4
Pentobarbital	IV	20-30	20-30	20-40	20-30	20-30
Anestecia de larga duracion						
Alfa- cloralosa		60 IV	80 IV			
Uretano (g\ kg)		0, 75 IV	1 IV			
Anestesia de cualquier duracion						
Halotano	Pul.	Induccion 4-5 % mantenimiento: 1-2 %				
Isoflurano	Pul.	Inducción: 4 % mantenimiento: 1,5-3 %				
Sevoflufano	Pul.	Inducción 5 % mantenimiento: 2,5-3,5 %				
Analgesicos						
Buprenorfina (6- 12 h)	SC, IM	0,005- 0,01	0,005- 0,02	0,05- 0,02	0,005- 0,01 (4h)	0,005- 0,01
Butorfanol (3-4 h)	SC, IM	0,1- 0,4	0,2- 0,4	2-10	5	0,01 IV
Petidina (meperidina, 2-4h)	SC, IM	2-10	5-10	2-10	2	2-4
Fentanilo (20- 30 min)	IV	0,05- 0,01	0,01- 0,02	0,01	0,01- 0,1	0,005- 0,01
Morfina (4 h)	SC, IM	0,1	0,25- 0,5	0,2-1	0,2- 0,5	1-2
Aspirina (6-12)	PO	10 (48 h)	10-20	10	-	20
Flunixin (12- 24 h)	SC, IM	0,5-1	0,5-1	1-2	2	2-4
Carprofeno (12 h)	SC	-	5	-	-	1,5 PO
Meloxicam (24 h)	SC	0,3	0,2	0,3	-	-

Analgesia y Anestesia Animales de Laboratorio

	VIA/RATON	RATA	HAMSTER	JERBO	COBAYO	CONEJO
Premedicacion						
Atropina	SC/IM/0,05	0,05	0, 05	0, 05	0, 05	0, 05
Anestesia de corta						

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION			CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO			FECHA		

duracion						
Propofol (5-10 min)	IV/12-26	10	-	-	-	10
Tiopental (20-25 min)	IV/30-40	30	-	-	-	30
Anestesia de media duracion (30-75)						
Alfadolona + Alfaxolona	IP/15 IV	10 IV	120	100	40-50	-
Fentanilo/Medetomidina	IP/-	0,3/0,3	-	-	-	-
Fentanilo + Fluanisona (ml/kg) \ Diacepan	IP/0.4/5	0,5/0	1/5	0,3/5	1/2,5	0,3IM/1-2 IM,IV
Ketamina \ Diacepan	IP/100/5	80/10	70\2	50\5	100\5	25/5
Ketamina \ Xilacina	IP/100/10	80/10	200\10	70\3	40/5	35/5 IM
Ketamina\ Medetomidina	IP/75/1	75/0,5	100\0,25	75\0,5	40/0,5	25/0,5 IM
Tiletamina\ Zolacepan	IP/80*	20-40	80	60	50	50
Pentobarbital	IP/50-70	30-40	80	60	40	45 IV
Tribromoetanol	IP/125-250	300	-	300	-	-
Anestesia de larga duracion						
Alfa- cloralosa	IP/110	130	100*	-	70	80-100 IV
Uretano (g\ kg)	IP/-	1-2	1-2	-	0,5	1-2 IP,IV
Anestesia de cualquier duracion						
Eter (referencia, ver texto)	Pul	Induccion 15-20 % mantenimiento: 5 %				
Halotano	Pul.	Inducción: 4-5 % mantenimiento: 1-2 %				
Isoflurano	Pul.	Inducción 4 % mantenimiento: 1,5-3 %				
Sevoflufano	Pul.	Induccion: 5%, Mantenimiento: 2,5				
Analgesicos (duracion media aproximada)						
Buprenorfina (6- 12 h)	SC/0,05-0,1	0,01-0,05	0,01- 0,05	0,01-0,05	0,01-0,05	0,01-0,05
Butorfanol (2-4 h)	SC/1-5	2	-	-	0,5-0,8	0,1-0,5 IV
Petidina (meperidina, 2-3h)	SC, IM/10-20	10-20	-	-	10-20	10
Fentanilo (20- 30 min)	IP/0,01-0,5	0,01-0,3	-	-	-	-
Morfina (4-6 h)	SC/2-10	2-10	-	-	2-5	2-5
Aspirina (6-8 hs)	PO/100	100	-	-	90	100
Flunixinina (12hs)	SC, IM/2,5	2,5	-	-	-	1
Ibuprofeno (6h)	PO/30	15	-	-	10 IM	10 IV
Carprofeno (12 h)	SC/-	5	-	-	-	1,5 PO
Meloxicam (24 h)	SC/0,3	1	-	-	-	0,2

Métodos de eutanasia

Metodos fisicos	Metodos farmacologicos
Aceptables en el animal consciente	
Disparo Concusion Aturdimiento electrico Dislocacion cervical Decapitacion	Agentes inhalatorios: Dioxido de carboo, Monxido de carbono, Anestescicos inhalatorios Agentes para animales acuaticos (diluidos en el agua) Benzocaina, Tricaina (MS-222),

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		

Maceracion Irradiacion con microondas	Etomidato y metomidato, Quinaldina Agentes inyectables: Barbituricos, T-61
Aceptables en el animal inconsciente	
Insercion de aguja Congelacion rapida Esanguinacion Nitrogeno\ argon	Etanol Hidrato de cloral Cloruro potasico Embolia gaseosa
Inaceptables	
Descompresion\ vacio Hipotermia Hipertermia Ahogamiento\ extracción del agua Rotura de cuello Estrangulacion	Protoxido de nitrogeno, Ciclopropano, Eter dietilico, Cloroformo, Metoxiflurano, Tricloroetileno, Gas cianhidrico, 2-fenoxietanol, Uretano, Bloqueantes neuromusculares, Ketamina, Sedantes, Sulfato magnesico

Monitorizacion durante la anestesia de la oxigenacion, ventilación y circulación. Los monitores se indican en orden de prioridad teniendo en cuenta la infraestructura de equipamiento disponible

Oxigenacion	Ventilacion	Circulacion
Objetivo		
Asegurar una concentración adecuada de oxigeno en sangre arterial del paciente	Asegurar que el flujo de sangre a los tejidos es adecuado	Asegurar que la ventilación del paciente es mantenida adecuadamente
Metodos		
Observacion del color de las membranas mucosas Pulsioximetria (estimacion no invasiva de la saturacion de hemoglobina) Analizador de oxigeno en el extremo inspiratorio del circuito anestésico Analisis de gas de sangre Hemoximetria (medida de la saturacion de hemoglobina en la sangre)	Palpacion del pulso periferico Palpacion de latido cardiaco a traves de la pared toracica Auscultacion de latido cardiaco (estetoscopio) Electrocardiograma (en pantalla) Determinacion no invasiva del flujo sanguineo o monitor de presion sanguinea (cateter arterial conectado a un transductor/osciloscopio o manometro aneroide)	Observacion del movimiento de la pared toracica Observacion del movimiento del balon del circuito anestésico Auscultacion de los sonidos respiratorios Monitor respiratorio audible Respirometria (medida de volumen corriente y volumen minuto) Capnografia (medida del CO2 en el gas espiratorio final) Analisis de gas de sangre (PaCo2)

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		

Principales anestésicos utilizados en animales de laboratorio

Duracion	Via	Farmacos	Observaciones
Ultracorta 5-10 min	Solo IV	Propofol, Etomidato tiopental sodico	No son buenos analgésicos El Tiopental se acumula
Corta 20-30 min	IV, IM, SC, IP	Ketamina o Tiletamina Opioide +tranquilizante	Analgésia adecuada Asociados a tranquilizantes
Media 1 hora	IV, IP	Pentobarbital	Anestesia superficial y estable No son buenos analgésicos
Larga 5-10 horas	IV, IP	Hidrato de Cloral Uretano	Anestesia superficial y estable No son buenos analgésicos El uretano es carcinogenico
Variable 0 min- horas	Inhalatoria	Halotano, Isoflurano	Analgésia adecuada en cualquier situación. Potente depresor cardiorrespiratorio

Anestésicos

Anestesico	Eter	Halotano	Isoflurano	Protóxido de nitrógeno
Características	No necesita vaporizador En desuso	Necesita vaporizador calibrado	Necesita vaporizador calibrado Muy difundido	Se distribuye directamente La concentración debe ser un 50-70 %
Ventajas	Barato No necesita equipo sophisticado Manejo sencillo	Seguro Barato	Seguro sin toxicidad? Metabolismo minimo: 0,17 %	Seguro Efectos cardiorrespiratorios minimo Efectos del segundo gas
Inconvenientes	No es seguro en enfermedades respiratorias Irritante Inflamable	Metabolismo elevado: 20 % Toxicidad hepática Hipertermia maligna Abortos?	Hipertermia maligna? Interferencia minima con el experimento	Reduce el aparte de oxígeno Hipoxia por difuncion Intercambio con N Inhibe la Vitamina B12 Barato Interferencia minima con el experimento

Anexo SUPERVISION DE ANIMALES

11. SUPERVISIÓN DE LOS ANIMALES

11.1 Control del bienestar de los animales durante el procedimiento

11.1.1 Fases del procedimiento en las que el animal puede padecer dolor, estrés y/ angustia.

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		

En este apartado deben detallarse las situaciones en las que a priori se pueda esperar causar dolor, angustia, estrés y/o se comprometa el bienestar del animal. Ejemplos:

- a) En el caso de inoculaciones, la/s fase/s en la/s que el animal puede presentar las alteraciones descritas serán:
 - el momento de la inoculación si el agente en cuestión es irritante, etc...
 - el momento de aparición de los efectos del agente inoculado (drogas cancerígenas, agentes tóxicos etc...)
- b) En el caso de protocolos de irradiación:
 - fase en la que pueden presentarse diarreas etc, por efecto de la irradiación
 - fase en la que se prevea el desarrollo de tumores etc
- c) En el caso de generación de líneas de animales transgénicos cuyo genotipo predisponga a padecer alteraciones concretas:
 - edad a la que se prevea la aparición de los síntomas.

Especificar en tiempo, si se conoce, la fase en que se espera la aparición de estos síntomas (ej; dos semanas post- irradiación, 3 días post-inoculación). Si no es así, la descripción de dicha fase se hará en función de los signos clínicos previstos.

Si se desconoce el potencial del procedimiento en cuestión para comprometer el bienestar del animal, el régimen de supervisión de los animales (tanto la frecuencia como duración e inicio de la misma) deberá ser el adecuado para poder detectar la aparición de dolor, estrés y/o angustia en sus primeras manifestaciones.

11.1.2 Protocolo de supervisión del bienestar de los animales

La supervisión de los animales debe realizarse mediante la valoración de ciertos parámetros indicativos del bienestar animal. Puesto que, dependiendo del procedimiento, el bienestar del animal puede verse comprometido de muy distintas maneras, aquí únicamente se especifican aquellos parámetros "generales" comúnmente utilizados en la descripción del "estado de salud" de ratas y ratones.

Si por la naturaleza del procedimiento (ej; ensayos de generación de tumores, generación de lesiones determinadas, protocolos de inducción de linfomas, líneas transgénicas que desarrollen patologías concretas...) son esperables signos clínicos específicos (aparición de tumores, disnea, caquexia, fiebre, ulceraciones...) dichos signos deberán estar incluidos en la supervisión y ser valorados de acuerdo con la gravedad que presenten.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

11.1.3 Control, duración y frecuencia de la supervisión

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		

En función de las alteraciones esperadas y el momento en que se prevea su aparición, detallar:

- a) En que momento se iniciará la supervisión del animal. Ej;
 - caso 1: dos horas después de la inoculación de un agente tóxico cuyos efectos son esperables a partir de ese momento,
 - caso 2: 6 semanas tras un protocolo de inducción de linfomas tímicos
- b) Duración. Ej;
 - caso 1: durante 4 horas
 - caso 2: durante 16-20 semanas
- c) Frecuencia. Ej;
 - caso 1: cada 15 min.
 - caso 2: una vez por semana

11.2 Actuación en caso de manifestarse alteraciones del bienestar, dolor o angustia

a) Medidas correctoras previstas. Ejemplos:

- a. Si aparecen síntomas de dolor (Ej, dolor post-operatorio): detallar si está previsto la utilización de un agente analgésico y cual sería el apropiado. De no ser así, explicar los motivos por los que no puede aportarse un régimen analgésico.
- b. Si debido al procedimiento el animal presenta alteraciones que impiden una correcta alimentación (ej; procedimientos que afectan a la locomoción e incapacitan al animal para acceder a agua y comida): ¿Qué medidas correctoras están previstas?

b) Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal (ver apartado 11.1.2) hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Para ello, los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando unos valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

Por ejemplo, a la hora de valorar la variación de peso corporal, se considera como aceptable una disminución del 5-10%, moderada del 10-20% y substancial > al 20% siendo este último valor el que se tomaría como criterio de punto final. Los valores más difícilmente cuantificables como la postura, piloerección, comportamiento social etc, pueden valorarse según la escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado, 3 si está muy afectado, tomándose como criterio de punto final el momento en que la suma de dicha puntuación alcance un valor determinado, o la suma de varios valores alcance un valor.

Vgr: si analizamos aspecto general y movilidad, **si aparece 3** en algún valor o **si la suma de ambos es mayor de 3.**

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el investigador responsable del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar **su propio protocolo de determinación de punto final** de manera que, por una parte, cumpla la normativa vigente (Real Decreto 1201/2005) en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación, y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para más información sobre criterios de punto final:

http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/41_2/

http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/ENDPTS/APPOPEN.HTM#toc

<http://www.lal.org.uk/endpoints1.html>

<http://www.secal.es/word-pdf/eutanasia1.pdf>

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		

<http://www.secal.es/word-pdf/eutanasia2.pdf>

a) Eutanasia no programada

La eutanasia no programada se refiere al procedimiento por el cual se van a sacrificar aquellos animales que presentan alteraciones que comprometen su bienestar y a los que, según el criterio de punto final elegido, es necesario eliminar.

Este método de eutanasia puede coincidir o no con el descrito en el apartado 9.2 (Protocolo de eutanasia programada). Por ejemplo:

Caso 1: Eutanasia programada = Eutanasia no programada

En un procedimiento de inducción de tumores en el cual todos los animales son sacrificados por dióxido de carbono, tanto los animales de eutanasia programada (por ejemplo animales sacrificados a determinados tiempos para obtención de muestras) como aquellos que deben ser eliminados al aplicarse el criterio de punto final (por ulceración o crecimiento excesivo de un tumor, síntomas respiratorios etc).

Caso 2 : Eutanasia programada ≠ Eutanasia no programada

En un procedimiento de inmunosupresión por irradiación y posterior trasplante, puedo tener prevista una eutanasia programa a x días post-trasplante por dislocación cervical, y una eutanasia no programada mediante dióxido de carbono para aquellos animales que, siguiendo el criterio establecido de punto final (pérdida de peso por diarreas etc) sea necesario eliminar por estar comprometido su bienestar.

Técnicas de obtención e inoculación de muestras

A. Técnicas de obtención de muestras

1. A Extracción de sangre de vena mandibular
2. A Extracción de sangre de seno retro-orbital

B. Técnicas de inoculación de muestras

1. B Inoculación Subcutánea
2. B Inoculación Intraperitoneal
3. B Inoculación Intramuscular
4. B Inoculación Intradérmica
5. B Inoculación Intravenosa
6. B Inoculación en Almohadillas Plantares

Técnica nº1.A Extracción de sangre de Vena Mandibular

Anestesia: No requerida

Material: Aguja 19 – 21 G

Volumen de extracción: Consultar Tabla I

Descripción de la técnica:

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		

1. Sujetar firmemente al ratón de manera que la cabeza quede alineada con el cuerpo, es decir, que no esté inclinada hacia el tórax o hacia los lados.
2. Comprimir **ligera**mente los vasos del cuello del lado opuesto al que se va a realizar la punción.
3. Localizar la pequeña zona circular desprovista de pelo situada centralmente en la mandíbula inferior (puede no estar presente en algunas cepas).
4. Con una aguja de 19-21 G, dependiendo de la edad y/o tamaño del ratón, realizar la punción (inclinando dorsalmente la aguja 1-2 mm) en la zona anteriormente descrita. La profundidad óptima es de 2-3 mm.
5. Recoger la sangre en el recipiente adecuado teniendo en cuenta que el flujo será de aproximadamente una gota (20µl) por segundo.
6. Una vez obtenida la muestra liberar al ratón. El sangrado se detendrá automáticamente.

<http://www.univ.trieste.it/~servpoli/stabpst.m1v>

Técnica nº2.A Extracción de sangre de Seno Retro-orbital

Anestesia: Obligatoria

Material: Capilares tratados con anticoagulante (EDTA, heparina...)

Restricciones: Esta técnica debe ser llevada a cabo únicamente cuando no exista método alternativo y siempre por personal cualificado debido al elevado riesgo de dañar estructuras adyacentes al globo ocular, lo que puede originar infecciones severas, ceguera etc...

Volumen de extracción: Consultar Tabla I

Descripción de la técnica:

1. Una vez anestesiado el ratón y comprobado que se ha alcanzado el plano quirúrgico, sujetar al ratón estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración
2. Insertar el capilar en el ángulo externo del ojo (2 mm aprox) y girar suavemente hasta que la sangre fluya por el mismo.
3. Recoger la muestra y retirar el capilar.
4. Oprimir ligeramente la zona de punción con una gasa o papel para detener la hemorragia.
5. Aplicar pomada oftálmica (Lubrifiilm) al ojo.
6. Comprobar que la recuperación de la anestesia se produce adecuadamente aportando las medidas que se consideren necesarias para ello (i.e , aporte de calor)
7. Observar al animal los días posteriores al sangrado para detectar la aparición de posibles complicaciones: protrusión de tejido adyacente al ojo, infecciones, hemorragias...

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		

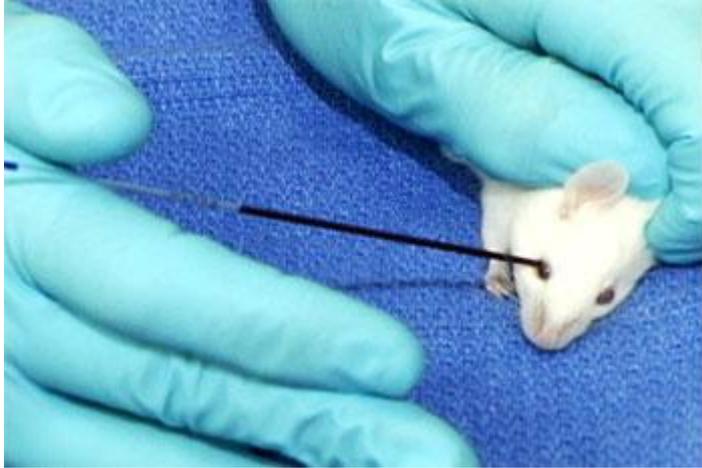


Fig. 1

Técnica nº 1. B Inoculación Subcutánea (SC o SQ)

Anestesia: No requerida

Material: Aguja 25G (ratón y rata)

Volumen máximo: 2-3 ml (ratón) 5-10 ml (rata)

Inoculaciones máximas: 2-3 inoculaciones por día

pH inoculación: Fisiológico (aprox. 7). Consultar Anexo 2.

Descripción de la técnica:

1. Depositar al ratón sobre la rejilla permitiéndole agarrarse a ella con las patas delanteras y levantar la piel de la espalda con los dedos índice y pulgar tal y como se muestra en la figura 2. De igual manera puede hacerse en la región inter-escapular.
2. Insertar la aguja en la base de la zona de piel que estamos sujetando manteniendo la aguja paralela al cuerpo del ratón para evitar inocular en capas inferiores a la piel.
3. Aspirar ligeramente para asegurarnos de no haber penetrado en algún vaso sanguíneo.
4. Inyectar el volumen de muestra a una velocidad moderada.
5. Retirar la aguja y presionar la piel en la zona de inyección para evitar que el fluido salga por el punto de piel perforada.
6. Observar que no se produce sangrado.
7. Debido a que la muestra se deposita en la zona subcutánea, y si ésta se ha desarrollado correctamente, podremos observar la formación de un "abultamiento" en el lugar de inyección que irá desapareciendo a medida que el fluido es dispersado.

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		



Fig. 2

Técnica nº 2. B Inoculación Intraperitoneal (IP)

Anestesia: No requerida

Material: Aguja 27-25G (ratón) 25-23G (rata)

Volumen máximo: 2-3 ml (ratón) 5-10 ml (rata)

pH inoculación: Consultar Anexo 2.

Descripción de la técnica:

1. Con el ratón correctamente inmovilizado (evitando cualquier movimiento durante el procedimiento) inclinarlo caudalmente y trazar una línea imaginaria que cruce su abdomen transversalmente justo sobre sus rodillas tal y como se muestra en la figura 3 (línea negra).
2. La aguja deberá ser insertada sobre esta línea, en el lado derecho del animal y lo más cercano posible a la línea que divide longitudinalmente el abdomen (línea roja). De esta manera disminuimos el riesgo de inyectar en ciego o vejiga urinaria.
3. La aguja debe alcanzar una profundidad de aproximadamente medio centímetro (ratón) y debe insertarse con una inclinación de unos 30° con respecto a la superficie del abdomen.
4. Aspirar para asegurarse de que no se ha alcanzado ningún vaso sanguíneo, ciego o vejiga urinaria.
5. Si ningún fluido es aspirado, proceder a la inyección de la muestra.
6. Retirar la aguja y presionar ligeramente la zona de inyección.

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		



Fig. 3

Técnica nº 3. B Inoculación Intramuscular (IM)

Anestesia: No requerida.

Material: Aguja 27G (ratón) 25G (rata)

Lugar de inoculación de elección: Cuadricéps

Volumen máximo: 50 µl por sitio de inyección (ratón) 300 µl por sitio de inyección (rata)

Inoculaciones máximas: 2 inoculaciones por día

pH inoculación: Fisiológico (aprox. 7). Consultar Anexo 2.

Descripción de la técnica:

1. Pueden ser necesarias dos personas para el correcto procedimiento de esta técnica, una para sujetar al animal y otra para la inoculación.
2. Sujetar firmemente la pata trasera del animal y proceder a la inserción de la aguja en el sitio de inoculación.
3. Aspirar ligeramente para asegurarse de que no se ha perforado ningún vaso sanguíneo.
4. El contenido de la jeringuilla debe ser expelido muy lentamente y la zona de inyección masajeadá cuidadosamente una vez realizada la inoculación.



Fig. 4

Técnica nº 4. B Inyección

Intradérmica (ID)

Anestesia: No requerida, pero facilita el procedimiento.

Material: Aguja 27G (ratón y rata)



Lugar de inoculación de elección: Zona dorsal

Volumen máximo: 50-100 μ l por sitio de inyección (ratón y rata)

Inoculaciones máximas: 6 sitios de inoculación

pH inoculación: Fisiológico (aprox. 7). Consultar Anexo 2.

Descripción de la técnica:

1. La aguja debe ser mantenida casi paralela a la superficie de la piel y avanzar cuidadosamente unos pocos milímetros dentro de ella.
2. Si se nota una pérdida de resistencia al paso de la aguja es que habremos pasado a la capa subcutánea. En este caso, retirar la aguja y proceder de nuevo a la inoculación.
3. Realizar una ligera rotación de la aguja después de la inoculación y justo antes de extraerla ayudará a minimizar la pérdida de compuesto inyectado.

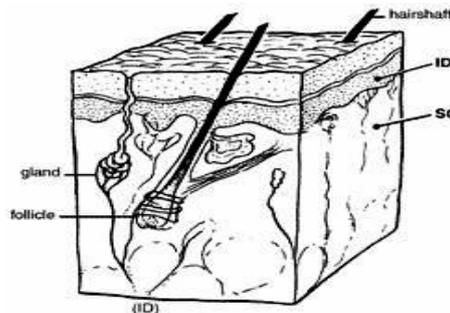


Fig. 5

Técnica nº 5. B Inoculación Intravenosa (IV)

Anestesia: No requerida

Material: Aguja 27G (ratón y rata)

Lugar de inoculación: Vena lateral de la cola

Volúmenes recomendados: 200 μ l -300 μ l (ratón) 500 μ l (rata). Consultar Tabla II.

pH inoculación: Consultar Anexo 2.

Descripción de la técnica:

1. Antes de realizar la inyección es conveniente inducir la vasodilatación de la vena para facilitar su canulación. Para ello puede recurrirse a la utilización de lámparas de infrarrojos (evitando que incida directamente sobre los ojos del animal o causarle quemaduras por exposición excesiva), inmersión de la cola en agua caliente (T^a no superior a 43°C) o utilización de agentes vasodilatadores (como Xilacina o Acepromacina).
2. Las venas laterales se localizan a ambos lados de la línea central de la cola y muy superficialmente de manera que la inyección debe hacerse prácticamente paralela a la superficie (figura 6)
3. Si aparece sangre al aspirar, la colocación de la aguja será la adecuada. De todas formas es fácil comprobar que hemos accedido a la vena ya que, si la aguja ha sido alojada en el lumen de la vena, no se apreciará resistencia al

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		

presionar el émbolo de la jeringuilla de modo que la muestra fluirá sin dificultad en el torrente sanguíneo.

- Una vez inoculada la muestra retirar la aguja y presionar la zona de inyección con un algodón para detener la hemorragia.

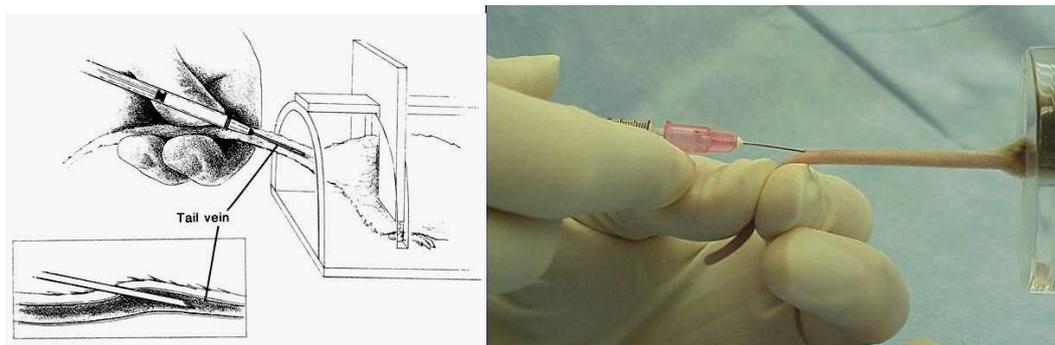


Fig. 6

Técnica nº 6. B Inoculación en Almohadillas Plantares

Anestesia: Puede ser requerida si la inoculación la realiza una única persona.

Material: Agujas 27-30G (ratón) 27G (rata)

Volúmenes máximos de inyección: 50 μ l (ratón) 100 μ l (rata)

pH de inoculación: Fisiológico (aprox. 7)

Restricciones: Solo se utilizará esta vía de administración en aquellos casos en los que el resto de rutas de inoculación se hayan comprobado no efectivas.

Consideraciones especiales:

- Inocular en dos patas interfiere con la locomoción, por ello **nunca** se inoculará en más de una pata por animal.
- Limitar el volumen y concentración del inóculo a los mínimos posibles.
- Los animales no deben ser alojados en jaulas desprovistas de viruta (tipo jaulas "metabólicas").
- La monitorización del sitio de inyección deberá ser tan frecuente como sea necesario para detectar de inmediato reacciones adversas que puedan impedir el acceso del animal a agua y comida. En caso de aparición de las mismas se procederá con el protocolo de Determinación del Punto Final previsto.

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		

Anexo VIAS DE ADMINISTRACION

Se recomienda un rango de pH de trabajo de 4,5-8 (Waynforth and Flecknell, 1992) teniendo en cuenta que el grado de tolerancia de pH para las diferentes vías de administración es:

Vía oral > Vía intravenosa > Vía intraperitoneal > Vía intramuscular > Vía subcutánea
 ≥ Vía intradérmica

El pH, por sí solo, no es un indicador suficiente del potencial irritante ya que la irritabilidad depende también de la concentración y del punto de ionización (pK) del compuesto. Estos factores, así como la solubilidad, biocompatibilidad, viscosidad y esterilidad, deberán ser valorados antes de proceder a la inoculación del compuesto en cuestión por cualquiera de las vías mencionadas.

Referencias

1. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Karl-Heinz Diehl, Robin Hull, David Morton, Rudolf Pfister, Yvon Rabemampianina, David Smith, Jean-Marc Vidal, Cor Van De Vorstenbosch . J Appl Toxicol 21 15-23, 2001.
2. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/ FRAME/ RSPCA/ UFAW joint working group on refinement. D.B. Mortom, M. Jennings, A. Beckwell, R. Ewbank, C. Godfrey, B. Holgayte, I. Inglis, R. James, C. Page, I. Sharman, R. Verschoyle, L. Westall and A.B. Wilson. Laboratory Animals 35, 1-41, 2001.
3. Working with the Laboratory Mouse. American Association for Laboratory Animal Science.
<http://www.aalas.org>
4. <http://labanimals.stanford.edu/Guidelines>

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION	CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO	FECHA		

Anexo Extracción de sangre

Tabla I. Volúmenes de extracción de sangre.

Tabla I.A. Volúmenes de extracción referidos a Vc (volumen circulante)

Extracción única		Extracciones múltiples	
% Vc extraído	Período de recuperación	% Vc extraído en 24h	Período de recuperación
7.5 %	1 semana	7.5 %	1 semana
10 %	2 semanas	10 %	2 semanas
15 %	4 semanas	15 %	3 semanas

VC: Volumen circulante

Vc ratón: 72 ml/kg

Vc rata: 68 ml/kg

Tabla I.B. Volúmenes de extracción referidos a Vt (Volumen total)

	Extracción de sangre				
	V t (ml)	7.5 % (ml)	10 % (ml)	15 % (ml)	20 % (ml)
Ratón (25g)	1.8	0.1	0.2	0.3	0.4
Rata (250g)	16	1.2	1.6	2.4	3.2

	COMITÉ INSTITUCIONAL PARA CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION			CÓDIGO: INTA Revisión: 1(o versión)		
	INSTRUCTIVO			FECHA		

Vt: Volumen total: aprox. 6% del peso (en ml)

Tabla II. Volúmenes de inoculación.

	Rutas y volúmenes de administración (ml/kg excepto *ml/sitio)					
	oral	SC	IP	IM	IV Bolus	IV Perf.
Ratón	10 (50)	10 (40)	20 (80)	0.05* (0.1)*	5	(25)
Rata	10 (40)	5 (10)	10 (20)	0.1* (0.2)*	5	(20)

() Volúmenes máximos

- No más de 2 inoculaciones IM por día
- No más de 2 ó 3 inoculaciones SC por día
- IV : no exceder 4% volumen circulante (bolus) o 4 ml/kg/h en perfusión