



I. ERANSKINA: ARRAINEKIN EGINDAKO ESPERIMENTAZIO PROIEKTUAK GAINEBEGIRATZEKO PROTOKOLOAK

SARRERA ETA KONTUAN HARTZEKO ALDERDI OROKORRAK

Ikerketa proiektuetan animaliak erabiltzen direnean, aukeratutako espeziearentzat egokia den ingurunea bermatu behar da. Bereziki, arrainen kasuan, horrek esan nahi du tankean dauden animalien tamaina eta dentsitatea, tenperatura, argia eta fotoperiodoa kontrolatu behar direla. Arrainak espezie eta garapen etapa bakoitzerako egokia den nutrizio pautan arabera elikatuko dira, proiektuaren helburuak betetzen direla ez ezik, arrainen ongizatea ere bermatuta. Gainera, ura partzialki aldatuko da astero zirkuitua itxita denean, eta, zirkuitu irekien kasuan, ura nola berritu arautuko da.

Arrainen ongizatea gainbegiratzeari dagokionez, metodo ez-inbaditzaileak erabili behar dira. Animaliak pisatzea, adibidez, kaltegarria izan daiteke, manipulazioaren ondorioz ongizate arazoak sor daitezkeelako; izan ere, arrainak anestesiatu eta uretatik atera behar baitira.

Horrela, bada, animalien ongizate mailaren adierazleak erregularoki behatu behar dira, hala nola itxura fisikoa, portaera eta osasun orokorra. Horren osagarri, ezinbestekoa da uraren kalitatea aldian behin kontrolatzea eta neurtzea, hau da, tenperatura, oxigenoaren kontzentrazioa, pH-a eta amonioaren, nitritoen eta nitratoen kontzentrazioa, espezie bakoitzaren behar espezifikoaren arabera.

Egindako behaketak dokumentatu egin behar dira eta, hartara, arrainen ongizatearen epe luzeko jarraipena egin eta arazoak garaiz detekta daitezke.

Era berean, gainbegiratzeko protokoloak berraztertu eta eguneratu ere egin behar dira, ikerketa berrien emaitzak eta jardunbide egokien ebidentziak aintzat hartuta.

Azkenik, erakundeek, Animaliekin egiten den Esperimentaziorako Etika Batzordeek eta ikerketa proiektuak arrainekin egiten dituzten pertsonak arrainen ongizatearekiko errespetua sustatu behar dute, eta jendeak ongizate hori uler dezan.

Dokumentu hau Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU) Animaliekin egiten den Esperimentaziorako Etika Batzordeak (AEEB-EHU) prestatutako **"Hirugarren R-a: Fintzea. Animaliekin eginiko esperimentazioa gainbegiratzeko protokoloak"** dokumentuari atxikitako I. eranskina da, eta bertan zehazten dira (1) arrainak gainbegiratzeko protokolo orokor bat eta amaierako puntuaren irizpideak, eta (2) zebra arraina gainbegiratzeko protokolo espezifiko bat eta amaierako puntuko irizpideak.

ARRAINAK GAINBEGIRATZEKO PROTOKOLOA ETA AMAIERAKO PUNTUKO IRIZPIDE OROKORRAK

Arrainen ongizatea bermatzeko modurik eraginkorrena da espezie bakoitzaren hazkuntzarako egokienak diren baldintzak izatea. Horretarako, **oxigeno kontzentrazioa** (6 mg/L-tik gora egon behar du) eta **konposatu nitrogenatuak** (amonioa eta nitrito 0 mg/L-tan eta nitratoa 50 mg/L-tik behera) monitorizatu behar dira. Hazkuntza sistemaren arabera (fluxu irekia edo akuikulturako birzirkulazio sistema -RAS-), parametro horiek kontrolatu egingo dira: tankeko aireztapena eta uraren fluxua handitu edo txikitzea, edo ura aldatzea eta/edo iragazki biologikoaren egoera aztertzea (arazoak jarraitzen badu eta ura aldatzea ez bada nahikoa), hurrenez hurren.

Kontuan izan proposatutako protokoloa orokorra dela eta egokitu egin beharko dela esperimentu zehatzaren arabera. Adibidez, toxikologiako esperimentuen kasuan, zenbait toxikok efektu narkotikoa dute arrainengan –esate baterako, hidrokarburo aromatiko poliziklikoek–, eta efektu hori tratamendua eman ondoren ager daiteke. Hala ere, uretako kontzentrazioa lurruntze bidez gutxitzen den heinean edo arrainek metabolizatzen dituzten heinean, animaliak indarberritu egiten dira. Kasu horretan, denbora pautu bat ezartzea komeni da, sintomen iraunkortasuna edo denborarekin okerrera egiten ote duten kontuan hartuta.

Era berean, esperimentazioa arrainekin egitearen zailtasunetako bat da, askotan, animaliak ez direla banan-banan identifikatzen eta, tanke berean asko samar egon daitezkeenez, zaila da jarraipena banan-banan egitea.

Egunero gainbegiratu behar dira animalien ongizateari dagozkion parametroak, baita hazkuntzako baldintzak kontrolatu ere, esperimentua hasten denetik amaitzen den arte, animaliei jaten ematen zaien unean. Gainbegiratzearen erregistroa egunero egin behar da.

ARRAINAK GAINBEGIRATZEKO PROTOKOLO OROKORRA

Hona hemen ebaluatu beharreko parametroak:

Parametroa	Puntuazioa
Itxura fisikoa	
Normala	0
Zauriak larruazalean edo kalteak hegatsetan	1
Elikagai kontsumoa	
Normala	0
Elikagaiei erantzunik ez egun batez	1
Elikagaiei erantzunik ez 2 egunez	2
Igeriketa	
Igeri egitea ur zutabean	0
Igeri egitea noraezean	1
Oreka partzialki edo guztiz galtzea	1
Jarduera	
Normala	0

Ohikoa ez den arnasestua ur azalean	1
Estimuluei erantzunik ez (adibidez, ikertzailearen presentziaren aurrean)	1

Balorazioa: Puntu 1 edo gehiago lortzen duen arrain oro esperimentutik apartatu egingo da.

ARRAINEN AMAIERAKO PUNTUKO IRIZPIDE OROKORRAK

Goian aipatutako animalien ongizateko parametroren bat betetzen dela ikustea aski da amaierako puntua aplikatzeko. Horrenbestez, eutanasia aplikatuko da, anestesiko baten gaindosi bat emanda (adibidez, trikaina -MS-222-). Dosia eta esposizio denbora egokitu egin beharko dira, espeziearen ezaugarriak aintzat hartuta. Animaliaaren heriotza erregistratu behar da, arnasketa (mugimendu operkularra) eta bihotz taupadak etetearen ondorioz.

ZEBRA ARRAINA GAINBEGIRATZEKO PROTOKOLOA ETA AMAIERAKO PUNTUKO IRIZPIDEAK

ZEBRA ARRAINA GAINBEGIRATZEKO PROTOKOLOA

Zebra arrainaren kasu espezifikoan, hazkuntzarako honako baldintza hauek gomendatzen dira [1] animalien ongizatea bermatzeko:

- **Fotoperiodoa:** 14/10 edo 12/12 ordu, argiztapen maila konstantea.
- **Tenperatura:** 24-29°C; tenperatura optimoa: 28°C.
- **Eroankortasuna:** 150-1700 µS/cm.
- **Uraren gogortasuna:** 40-250 mg/L CaCO₃.
- **pH-a:** 6.5-8.
- **Konposatu nitrogenatuak:** NH₃/NH₄⁺ <0.1 mg/L, NO₂⁻ <0.3 mg/L, NO₃⁻ <25 mg/L.
- **Oxigeno disolbatua:** >5 mg/L.
- **Dentsitatea:** 5 indibiduo heldu litro bakoitzeko, eta gehienez 10 indibiduo heldu litro bakoitzeko. Ez da gomendatzen 5 animalia baino gutxiago izatea tankean denbora luzez.
- **Zarata:** ahalik eta gutxien, aldaketa bortizik edo bibraziorik gabe

Gainera, alderdiren bat (soziala, bisuala edo nutrizionala) aberastea lagungarri izan daiteke animalien estresa murrizteko.

Zebra arraina jatekoa ematen zaion uneetan gainbegiratuko da, protokolo jakin bati jarraikiz; jarraian deskribatuko dugu Martins eta lankideek 2016an proposatutako protokoloa [2], egokitzapen txikiak eginda. Protokolo hori egokitu egin daiteke, esperimentazio prozedura bakoitzaren berezitasunak kontuan hartuta.

Parametroa	Puntuazioa
Itxura fisikoa*	
Normala	0
Operkuluaren eta hegatsen absentsia errepikatua (portaera antagonisten adierazgarri izan daiteke); iluntzea/hantura hegatsen	1
Eskoliosi/lordosi arina, lesioak tegumentuan, mukiak, gainpisua edo azpipisua (obesitatea edo argaltasuna), kolore aldaketa bortitza, batez ere zurbiltasuna	2
Emaziazio orokorra (gorputz-buru proportzio txikia), deformazio orokorrak gorputzean, ezkatarik ez edo irtenak	3
Elikagai kontsumoa	
Normala	0
Elikagaiei erantzunik ez egun batez	1
Elikagaiei erantzunik ez 2 egunez, ezta elikagai bizi ere	2
Elikagaiei erantzunik ez 3 egunez, ezta elikagai bizi ere (artemia edo errotiferoak)**	3
Arnasketa	
Normala	0

Arnasestuak edo arnasaldi agonikoa edo tasa oso-oso txikia, ia mugimendu operkularrik gabe	3
Igeriketa**	
Igeri egitea ur zutabeen	0
Flotagarritasuna kontrolatzeko eta/edo orekari eusteko zailtasunak	2
Igeri egitea tankearen gainazalean edo hondoan sistematikoki	3
Jarduera	
Normala	0
Hiperaktibitatea (igeri egitea noraezean) edo hipoaktibitatea	2
Letargia, kanpoko estimuluei erantzunik ez	3
Portaera soziala**	
Normala, taldekatzea	0
Isolamendua, bizilekua taldekoa denean	1
Indibiduoak kideak jazartzen ditu beti, edo kideek jazartzen dute beti	2
Kideen indibiduoarenganako portaerei erantzunik ez	3

Balorazioa: 0-1: normala; 2-8: gainbegiratzeko maiztasuna handitu. Aztertu albaitaritzako tratamendua behar ote den, analgesikoak barne, eta analizatu uraren kalitatea; 9-12: sufrimendua, egin kontsulta albaitari espezializatuari, aztertu eutanasiaren aukera; 13-18: egoera larria, eutanasia, berraztertu esperimentazio prozedura.

ZEBRA ARRAINAREN AMAIERAKO PUNTUKO IRIZPIDEAK

Eutanasiaren aukera azter daiteke gainbegiratzeko protokoloaren kategoriaren batean 3 puntu ateratzen badira, portaerarekin lotutako kategorietan izan ezik (**); azken kategoria horietan 3 puntu ateratzen badira, behaketa zorrotz eta errepikatua egin behar da eutanasiari buruzko azken erabakia hartzearen. (*) Kontuan izan animalien adina [2].

Zebra arrainei eutanasia aplikatzeko gehien erabiltzen den prozedura trikaina (MS-222) gaindosi bat ematea da, >200 mg/L kontzentrazioan, eta, mugimendu operkularra eten ondoren, gutxienez beste 10 minutuz egon beharko dute arrainek murgilduta [1]. Azidoa izaki, MS-222a tanponatu egin behar da erabiltzeko [2]. Bentzokaina ere erabili ohi da >250 mg/L-ko kontzentrazioan [1]. Shock hipotermikoa ere egokitzen jotzen da zebra arrainei eutanasia aplikatzeko. Metodo horretan, gutxienez 20°C-eko tenperatura aldaketa egin behar da bat-batean: haztegiko uraren 28°C ingurutik ur izoztura (<4 °C), eta arrainek gutxienez 5 minutuz egon behar dute murgilduta, baina izotzarekin zuzenean kontakturik izan gabe, ahal dela [1]. Gainera, bi metodoak uztartzeko aukera ere badago: animalia trikaina tanponatuaren (100 mg/L) soluzio batean murgiltzea, 28°C-etan, analgesiko gisa, eta gero, segidan, trikaina tanponatuaren (>200 mg/L) soluzio batean murgiltzea, <4 °C-etan, eutanasia modura.

BIBLIOGRAFIA

[1] SCHEER (Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks), Opinion on the Revision of Annexes III and IV of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes regarding accommodation parameters and methods of killing for zebrafish, and accommodation parameters for

Passerine birds, adopted on 25 September 2023. (https://health.ec.europa.eu/publications/scheer-revision-annexes-iii-and-iv-directive-201063eu-protection-animals-used-scientific-purposes_en)

[2] Martins T, Valentim AM, Pereira N, Antunes LM (2016) Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: a question of refinement. *Lab Anim.* 50(6):476-488. doi: 10.1177/0023677216670686.