

实验用鱼安乐死操作规范

Operational specification for the euthanasia of laboratory fishes

2020 - 09 - 25 发布

2020 - 10 - 25 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由山东省海洋局提出并组织实施。

本标准由山东省海洋标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：青岛华大基因研究院、青岛市标准化研究院。

本标准主要起草人：黎瀚博、刘姗姗、王晨、王萌萌、郭扬、苏小珊、丁晓燕、周丽、翟越、许静、赵丹。

实验用鱼安乐死操作规范

1 范围

本标准规定了实验用鱼安乐死的基本要求、操作流程、档案管理及废弃物处理。
本标准适用于实验环境下可养殖的实验用海水和淡水鱼类的常规生命终止操作。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验用鱼 laboratory fish

用于科学研究、教学、检定、育种以及其他科学实验的鱼类。

3.2

安乐死 euthanasia

通过化学或物理手段人为干预，人道的终止动物生命的方法，最大限度的减少动物的惊恐或痛苦，使动物安静且平稳的死亡。

3.3

动物福利 laboratory animal welfare

人类保障动物健康和快乐生存权利的理念及其提供的相应外部条件的总和。

3.4

鱼类颅腔 fish cranial cavity

由头部的皮肤、肌肉和脑颅骨围成的腔。

4 基本要求

4.1 安乐死基本原则

实验用鱼安乐死应按照动物保护及动物福利的相关国际及国家规范中的相关要求和原则执行。旨在针对有终止生命必要性的实验用鱼，减少其不必要的应激、痛苦和伤害，采取痛苦最少的处置方法。

4.2 人员要求

实验人员应了解实验用鱼的生理结构，熟悉鱼类生理相关实验，主要操作人员应经过专业的鱼类生理学培训。

4.3 防护措施

实验人员需佩戴一次性乳胶手套、口罩、头套，穿着实验服进行操作。

5 操作流程

5.1 准备工作

5.1.1 操作环境

实验用鱼安乐死操作环境应满足如下条件：

- a) 实验场所应远离自然疫源地，易于清洁，相对封闭，可满足处理及暂存动物尸体、废水及其废弃物的需求；
- b) 实验环境温度范围应保持在在 16℃~26℃，以保证水温不会急剧变化；
- c) 实验环境应保持洁净卫生，空气洁净级别在 Class 6 以上；
- d) 湿度应保持在 40%~70%；
- e) 保证光照不低于 200 lx。

5.1.2 实验用具准备

实验用鱼安乐死操作应准备以下耗材：

- a) 灭菌手术器具（包括眼科剪、解剖针、解剖镊）；
- b) 解剖盘；
- c) 麻醉盒；
- d) 手套、口罩、头套及实验服。

5.1.3 试剂准备

5.1.3.1 实验用鱼安乐死操作应准备以下试剂：

- a) 间氨基苯甲酸乙酯（以下简称为 MS-222）粉末：MS-222 粉末避光保存，使用前检查是否有结块、变色现象，不可使用结块或变色的 MS-222；
- b) 实验用水：清洁的实验用鱼的养殖用水，包括清洁淡水或合适盐度的清洁海水。

5.1.3.2 麻醉剂配制：

- a) 母液配制：取 2 g MS-222 粉末，溶于 1 L 实验用水中，配制过程中，适当搅拌溶解，得到 2 000 mg/L 的麻醉剂母液。母液应于 4℃ 条件避光贮存，一般情况下，有效期为 2 周；
- b) 麻醉剂配制：按照麻醉液的终浓度，取适量母液加入适量实验用水搅拌均匀，保证麻醉剂的最终体积是待麻醉用鱼体积的 3 倍以上。

示例：配制 4 L 浓度为 50 mg/L 的麻醉液时，取 100 mL 母液加入 3.9 L 实验用水；配制 4 L 浓度为 100 mg/L 的麻醉液时，取 200 mL 母液加入 3.8 L 实验用水；配制 4 L 浓度为 350 mg/L 的麻醉液时，取 700 mL 母液加入 3.3 L 实验用水。

5.2 麻醉致死

5.2.1 麻醉剂浓度选择

麻醉时根据实验用鱼的体重，选择麻醉剂浓度，详见表1。针对初次麻醉浓度无效的部分耐受性较强个体，直接使用350 mg/L麻醉浓度进行麻醉。

表1 不同体重鱼类麻醉浓度参考表

麻醉液浓度 mg/L	鱼类体重 kg	麻醉时长 min
50	≤0.1	10~25
100	0.1~0.5	10~25
200	≥0.5	10~25
350	耐受性较强个体	20~30

5.2.2 麻醉流程

5.2.2.1 将实验用鱼完全浸入配制好的3倍体积的麻醉溶液中，麻醉20 min。

5.2.2.2 观察鱼类的状态，实验用鱼会依次出现以下状态：

- a) 体型对称鱼类身体失去平衡，游动姿态有较大变化，如：侧游、抽搐等，体型非对称鱼类挣扎过后静止不动；
- b) 实验用鱼彻底失去活动能力，且鳃部呼吸动作在肉眼观察下不明显。

5.2.3 麻醉致死效果监测及处理

5.2.3.1 将实验用鱼从麻醉环境中取出，用相应实验用水清洗其身体表面。

5.2.3.2 将麻醉致死的实验用鱼放入3倍以上体积的实验用水中，若15 min内未见复苏迹象，或实验用鱼表现为鳃部无呼吸动作、腹部上翻，即可认定安乐死成功。

5.2.3.3 如若复苏（恢复正常活动能力），使用350 mg/L麻醉浓度，按5.2.2中流程再次进行麻醉。

5.2.3.4 二次麻醉后重复5.2.3.1至5.2.3.2的步骤，若实验用鱼再次复苏，则按照5.3中步骤进行补充性脑破坏致死。

5.3 补充性脑破坏致死

5.3.1 麻醉

对补充性物理致死的实验用鱼按照5.2.2中流程，使用350 mg/L麻醉浓度进行麻醉。

5.3.2 脑破坏致死流程

5.3.2.1 根据实验用鱼种类定位颅腔，一般对称体型硬骨鱼颅腔位于眼窝后上方、非对称体型硬骨鱼颅腔位于眼窝侧鳃盖上方、软骨鱼颅腔位于眼窝正后方。进入颅腔的位置可选择实验用鱼的口腔、眼窝或颅腔上方。

5.3.2.2 将解剖针从选定的进入位置刺入颅腔。

5.3.2.3 搅动脑组织8~10圈，对其脑部组织进行彻底破坏，完成实验用鱼脑死亡。

5.4 操作流程图

实验用鱼安乐死操作流程，见图1。

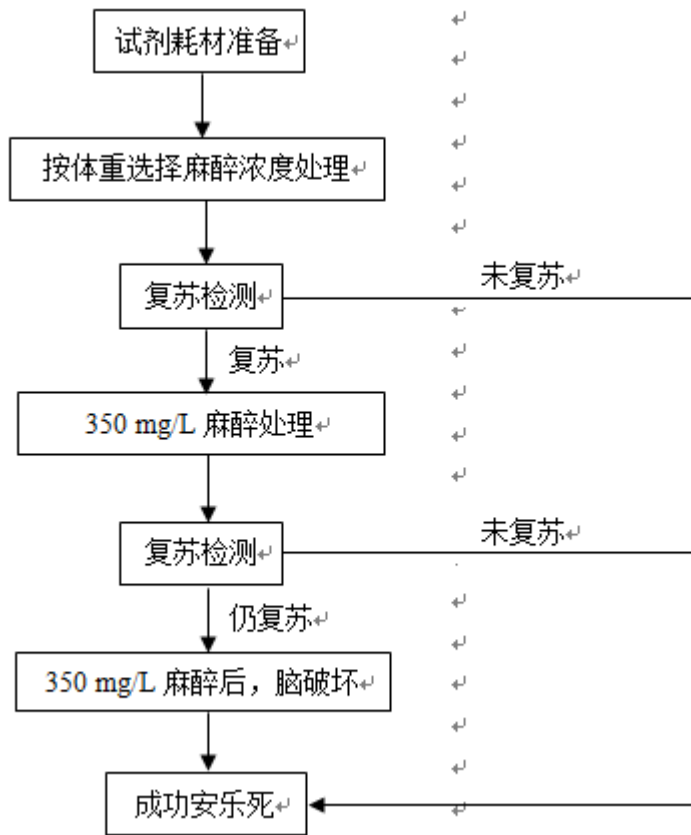


图1 实验用鱼安乐死操作流程

6 档案管理

对所有安乐死实验用鱼的详细情况进行记录归档，记录内容包括：操作日期、鱼类种类、数量、实验项目、麻醉时间及浓度、曾用何种特殊处理、废弃物接收单位、处理人等信息进行标注，并备注是否经过选育或基因工程操作（见附录A）。

7 废弃物处理

7.1 实验用鱼尸体的处理

对于处理后的实验用鱼尸体，严禁食用和出售，应交由医疗废弃物处理单位统一处理，参见中华人民共和国《医疗废物管理条例》的相关内容。

7.2 其余废弃物的处理

其余废弃物处置参照GB 19489的有关规定执行规定执行。

附录 A
(资料性附录)
实验用鱼安乐死档案管理表

表A.1 实验用鱼安乐死档案管理表

日期	实验用鱼种类	数量	实验项目	麻醉时间及浓度	曾用何种特殊处理	废余接收单位	处理人	备注 (是否经过选育或基因工程操作, 何种操作)

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国国务院令 第380号 《医疗废物管理条例》
- [2] 温海深. 鱼类学实验[M]. 山东: 中国海洋大学出版社, 2010: 1-137
- [3] 柴同杰. 动物保护及福利[M]. 北京: 农业出版社, 2008:1-309
- [4] Popovic TN, Strunjak-Perovic I, Coz-Rakovac R, Barisic J, Jadan M, Berakovic AP and Klobucar RS. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. J. Appl. Ichthyol. (2012), 1 - 12
- [5] T, Mullins MC. Dissection of Organs from the Adult Zebrafish. Journal of Visualized Experiments: JoVE. 2010; (37):1717
- [6] 关于善待实验动物的指导性意见 (国科发财字[2006]第398号)
- [7] Vijay Hemmadi. Fish anatomy and physiology. Science. 2016
- [8] Matt Friedman. The evolutionary origin of flatfish asymmetry. Nature. 2008
- [9] VMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. <https://www.avma.org/policies/avma-guidelines-euthanasia-animals>
- [10] ISO 14644-1 洁净室和相关控制环境 第1部分: 空气清洁度的分级 (Cleanrooms and associated controlled environments—Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration)
-