



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ**

KATEDRA ZOOTECHNICKÝCH VĚD

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

**DIGITÁLNĚ ŘÍZENÁ DOBA VÝMĚNY CHOVNÝCH NÁDOB U
MYŠÍ A JEJÍ VLIV NA ZDRAVÍ A WELFARE ZVÍŘAT**

MVDr. Jan Honetschläger

České Budějovice

2022

Doktorand: MVDr. Jan Honetschläger

Studijní program: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat

Studijní obor: Zootechnika

Název práce: Digitálně řízená doba výměny chovných nádob u myši a její vliv na welfare zvířat

Školitel: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

Oponenti: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.
Mgr. Jana Petrusová, Ph.D.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské a technologické fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Abstrakt

V posledních letech se v chovech laboratorních myši začínají více využívat moderní technologie umožňující monitorování zvířat a jejich prostředí v chovné nádobě bez nutnosti manipulace se zvířaty nebo s vlastní chovnou nádobou. Monitoring prostředí umožňuje významně individuálně prodloužit intervaly výměny podestýlky, a proto hypotézou této práce je, že při delších intervalech nedochází k narušení welfare a zvýšení stresu.

Ve studii byl využit systém DVC (digitálně ventilovaná chovná nádoba), který v první části studie definoval vhodný termín výměn podestýlky pro jednotlivé chovné nádoby a ve druhé části studie nepřetržitě monitoroval aktivitu zvířat, stanovil cirkadiální rytmus a detekoval jeho odchylky.

DVC definovaná doba přestýlání odpovídá počtu zvířat v chovné nádobě, kde u 1 zvířete v chovné nádobě prodloužila interval až na 29 dní, zatímco u 5 zvířat zkrátila na 10 dní oproti běžně používanému 14dennímu intervalu. Křivka cirkadiálních rytmů se mezi chovnými nádobami s různým počtem zvířat mírně odlišovala, přičemž vyšší aktivitu vykazovaly nádoby s vyšším počtem zvířat a nádoby se samci. Samice naopak vykazovaly vyšší aktivitu bezprostředně po přestlání. Obě pohlaví pak měla větší tendenci vytvářet toalety v přední části chovné nádoby.

Digitálně řízená doba výměny chovné nádoby optimalizuje interval přestýlání dle aktuální situace prostředí v chovné nádobě bez narušení welfare a zvyšování stresu zvířat a umožňuje detekovat odchylky v jejich denní aktivitě. Prodloužení intervalu vede i ke snížení aktivity zvířat a mírnějším reakcím na přestlání a tím i klidnějšímu ustanovení nové hierarchie.

Klíčová slova: interval přestýlání, digitalizace, chovná nádoba, welfare

Abstract

In recent years, modern technologies have begun to be used more in laboratory mouse facilities, allowing monitoring of animals and their environment in a cage without the need to handle animals or the cage itself. Monitoring of the environment allows to significantly extend the individual cage-change intervals, and therefore the hypothesis of this work is that there is no disruption of welfare or increased stress at longer intervals.

The study was focused on the DVC (digitally ventilated cage) system, which in the first part of the study defined a suitable date for cage-change for individual cages, and in the second part of the study continuously monitored the activity of animals, determined the circadian rhythm and detected its deviations.

The DVC defined cage-change corresponds to the number of animals in the cage. DVC extended the interval up to 29 days for 1 animal in the cage, while shortened to 10 days for 5 animals in the cage compared to the commonly used 14-day interval. The curve of circadian rhythms differed slightly between cages with different numbers of animals. Cages with a higher number of animals and cages with males were showing higher activity. Females, on the other hand, showed higher activity immediately after the cage-change. Both sexes then had a higher tendency to create toilets in the front area of the cage.

The digitally controlled cage-change optimizes the interval according to the current situation of the environment in the cage without disturbing the welfare and increasing the stress of the animals and it also allows to detect deviations in their daily activity. The extension of the interval leads to less activity of animals and milder reactions to cage-change and calmer establishment of a new hierarchy.

Keywords: cage-change interval, digitization, housing, welfare

Obsah

1	Úvod.....	6
2	Cíle a hypotézy práce.....	7
3	Materiály a metodika	8
4	Výsledky	12
5	Diskuze	21
6	Závěr a doporučení pro praxi.....	27
7	Seznam použité literatury	29

1 Úvod

Obrovský rozvoj moderních technologií v posledních letech přináší nové materiály, přístroje a produkty, které lze využívat i v oblasti pokusných zvířat. Nové technologie se do chovů i experimentální/laboratorní praxe promítají zvyšující se precizností a citlivostí přístrojů, analytických kitů, anebo větší „výtěžností“ získávaných informací a sníženým počtem použitých pokusných zvířat. Jedním z těchto nových hi-tech přístrojů jsou i takzvané Digitálně ventilované chovné nádoby pro myši (zkratka DVC, z anglického slova *Digital Ventilated Cage*).

Zdraví zvířat v chovném zařízení je ovlivněno řadou faktorů, které byly během mnohaletých celosvětových zkušeností minimalizovány a v celé řadě moderních chovných zařízeních nastaveny adekvátně požadavkům vědeckého pracoviště v souladu s aktuálními trendy v ochraně pohody zvířat (tzv. *animal welfare*, dále v textu jen *welfare*) a dodržování konceptu tří „R“ - tedy *Replacement* (nahrazení), *Reduction* (snížení počtu) a *Refinement* (zjemnění postupů). Každá nová technologie, jejíž plné využití kompletně narušuje a mění zavedené a osvědčené pracovní postupy, vytváří významný rizikový faktor v ochraně zdraví zvířat a následné reprodukovatelnosti výsledků vědeckých pokusů. Proto je třeba k novým technologiím přistupovat pozitivně, ale zároveň i s respektem, a před jejich masivním používáním vyhodnotit všechny předvídatelné dopady.

2 Cíle a hypotézy práce

Cíle disertační práce:

1. Vyhodnotit využití technologie chovu laboratorních myší v DVC chovných nádobách k definování vhodného a zdraví neohrožujícího prodloužení intervalu přestýlání chovných nádob;
2. Porovnat vliv různých intervalů přestýlání chovných nádob na aktivitu a welfare zvířat.

Hypotézy:

1. DVC systém umožní, v závislosti na individuálních standardech jednotlivých chovných zařízení, prodloužit interval výměny podestýlky i na několik týdnů bez narušení mikroklimatických podmínek uvnitř chovné nádoby.
2. Prodloužení intervalu přestýlání chovné nádoby, a tedy i delší interval v narušení sociálního prostředí povede ke snížení stresu a zklidnění zvířat, a tím i k zlepšení jejich welfare a celkových chovatelských výsledků.

3 Materiály a metodika

3.1. Experimentální zvířata a prostředí

V první části studie byly DVC chovné nádoby náhodně obsazeny širokým spektrem SPF kmenů myších linií (převážně standardní C57Bl6 nebo transgenních zvířat na C57Bl6 pozadí), bez ohledu na pohlaví a věk zvířat, s rozmezím 1 - 5 ks zvířat v jedné chovné nádobě. Druhá část studie probíhala výhradně na SPF samcích C57Bl/6NRj ve věku 3 týdnů rozdělených do skupin po 2 ks, 3 ks a 4 ks na jednu chovnou nádobu. Třetí část studie probíhala na SPF samcích a samicích kmene C57Bl/6JOLaHsd dodaných ve věku 6 - 8 týdnů. Zvířata byla chována v individuálně ventilovaných chovných nádobách (IVC) GM 500 vložených do DVC stojanů (Tecniplast S.p.A., Itálie). Chovné nádoby a jiné materiály přicházející do kontaktu se zvířaty byly před použitím dekontaminovány.

Zvířata byla na začátku všech částí studie prostá mikroorganismů uvedených v doporučení FELASA pro zdravotní monitoring hlodavců včetně doplňkových mikroorganismů (Mähler et al., 2014).

3.2. Organizace experimentu první části studie

Před vlastním zahájením první části studie bylo nutné DVC systém "naučit" (vytvořit algoritmus) rozpoznat a vyhodnotit, že je chovná nádoba dostatečně znečištěná a určená k přestlání. Tvorba algoritmu probíhala na čtyřech skupinách chovných nádob s odlišným počtem zvířat, a to až do přestlání poslední chovné nádoby. V našem případě celá „výuková“ fáze trvala 30 dní. Zvířata byla vložena do čistých chovných nádob (den 0) a následně byla denně adspekci vyhodnocena čistota chovné nádoby. V případě nálezu dvou a více mokřých oblastí na dně chovné nádoby byla nádoba přestlána a informace zadána do systému. Na základě získaných dat byl vytvořen algoritmus k vyhodnocování hraniční hodnoty znečištění chovné nádoby.

První fáze sběru dat probíhala bez aktivního využití systému DVC, kdy po uvedené době systém pouze monitoroval znečištění chovných nádob a zaznamenával alarmová hlášení aktivity zvířat, nepřítomnosti napájecí láhve, krmiva a nedostatečného

množství vody v láhvi. Po tuto dobu DVC systém nepodával obsluhujícímu personálu žádné pokyny k přestlání chovné nádoby, ani neposílal alarmová hlášení.

V druhé a třetí fázi byl systém DVC již plně funkční a obsluhujícímu personálu aktivně uděloval pokyny k přestlání konkrétních chovných nádob. Rozesílal také informace o alarmových hlášeních prostřednictvím emailových zpráv a upozorněním na požadavky při přihlášení do systému. Před třetí fází byl na základě zpětné vazby ošetřovatelů na úroveň znečištění chovné nádoby upraven algoritmus systému.

V průběhu všech 3 fází první části studie byl denně sledován zdravotní stav zvířat a proběhlo několik mikrobiologických laboratorních vyšetření v rozsahu doporučeného seznamu mikroorganismů dle FELASA včetně dodatečných mikroorganismů (Mähler et al., 2014).

3.3. Organizace experimentu druhé části studie

Zvířata byla rozdělena do tří základních skupin dle délky intervalu přestlání chovné nádoby (1 x 7 dní, 1 x 14 dní, dle DVC systému) a byly na nich sledovány tyto parametry: hmotnost zvířat, hmotnost čisté a špinavé podestýlky, hmotnost napájecí láhve s čerstvou vodou, hmotnost napájecí láhve se zbytkem vody při přestlání, hmotnost krmiva, hmotnost zbytku krmiva při přestlání, lokalizace toalety, lokalizace hnízda, klinické změny a chování zvířat.

V průběhu celého trvání studie byla v rámci DVC systému a jeho softwaru na analýzu dat (DVC Analytics) sbírána tato data: i) obecná aktivita zvířat; ii) doba intervalu přestlání zvířat; iii) aktivita zvířat po přestlání chovné nádoby; iv) lokalizace toalety a hnízda; v) nezvyklá aktivita zvířat v chovné nádobě.

3.4. Organizace experimentu třetí části studie

Ve třetí části experimentu byla zvířata náhodně rozdělena po čtyřech do 20 IVC chovných nádob. Deset nádob pro samce a deset nádob pro samice bylo střídavě vloženo do postranních sloupců stojanu DVC. Centrální sloupky byly naplněny klecemi bez zvířat, ale s podestýlkou a obohacením podobným klecím se zvířaty. Kompletní výměny klece byly prováděny každých 14 dní po dobu pěti po sobě jdoucích cyklů. V průběhu přestlání se již nepřesouvala špinavá podestýlka a ani hnízdní materiál do nové chovné nádoby, jako v případě první a druhé části studie.

Během každého přestýlání byla zvířata zvážena a jejich hmotnost zaznamenána jakožto jeden z měřitelných parametrů sledování dobrých životních podmínek zvířat. Pro zmírnění možných efektů způsobených různými úrovněmi osvětlení ve svislé ose byla každá chovná nádoba během přestlání vždy posunuta o dvě pozice dolů. Spodní dvě chovné nádoby na každé straně stojanu byly přesunuty do dvou horní části stojanu. Tato část studie probíhala paralelně na více pracovištích: Karolinska Institute, Švédsko (KI), Leiden University Medical Centre, Holandsko (LUMC), Université de Grenoble Alpes, Francie (UGA).

3.5. Zpracování a statistické vyhodnocení dat

K měření aktivity zvířat v chovné nádobě byla použita metrika aktivační hustoty klece, tzv. *DVC metrics*. Nezpracovaná data (tzv. *raw data*) byla sbírána každých 250 ms a byla následně agregována do hodnot za jednu minutu (Iannello, 2019). Následně byla vyhodnocena denní aktivita jako průměr všech jednominutových hodnot v rámci denního světelného režimu, a to v průběhu každého dne, a noční aktivita jako průměr aktivit v čase nočního světelného režimu. Dále byla analyzována aktivita v zadní části (zprůměrováním aktivity měřené elektrodami 1-2-3-4-5-6, *Rear area*) a v přední části chovné nádoby (elektrody 7-8-9-10-11-12, *Front area*) v každé kleci samostatně, přičemž přední i zadní část mají každá plochu 250 cm². Na základě rozdělení plochy chovné nádoby na přední a zadní část a identifikací polohy toalety bylo možné definovat tzv. frontality, což je procento aktivity vykonávané v přední části klece z celkové činnosti prováděné přes celou podlahu klece. Protože nezpracovaná data kapacitního odporu DVC jsou ovlivněna přítomností vody nebo moči, mohla být použita technologie DVC k identifikaci polohy toalety uvnitř klece. Poloha toalety byla definována jako oblast s nejvyšším rozdílem mezi průměrem naměřených hodnot kapacitního odporu za poslední noc cyklu a průměrem hodnot naměřených během první noci cyklu.

V první části studie byly pro každou registrovanou chovnou nádobu v systému změřeny intervaly mezi jednotlivými výměnami čisté podestýlky až do ukončení sběru dat, nebo do uzavření chovné nádoby z důvodu utracení zvířat, nebo jejich přestěhování do jiného chovu. Pro každou chovnou nádobu pak byly vypočítány průměrné intervaly přestýlání. Následně byla data seskupena na základě stejného počtu

zvířat v chovné nádobě, a pro tyto skupiny byl vyjádřen aritmetický průměr dle počtu zvířat. Výsledkem jsou hodnoty průměrných intervalů výměny čisté podestýlky pro každou jednotlivou skupinu dle počtu zvířat v chovné nádobě, se směrodatnou odchylkou. K vlastní statistické analýze byl použit program Graph-Pad Prism software (Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Pro porovnání délky intervalů mezi jednotlivými fázemi přestýlání byl použit statistický nepárový Studentův t-test. Pro porovnání délek intervalů v nádobách s chovnými zvířaty byl použit statistický jednostranný ANOVA test. V obou případech bylo jako signifikantní akceptováno $p \leq 0.0001$.

Ve druhé a třetí části byly hodnoty vyjádřeny průměrem a směrodatnou odchylkou, přičemž byl použit neparametrický ANOVA test, kde jako signifikantní se akceptovalo $p \leq 0.05$ a méně.

4 Výsledky

4.1. Vliv DVC systému na frekvenci přestýlání chovných nádob

První část studie měla tři fáze. První fáze sběru dat (bez využití aktivního systému DVC) probíhala s 2429 registrovanými chovnými nádobami a bylo provedeno 7831 výměn podestýlky. Data ukazují průměrný interval přestýlání $13,40 \pm 4,25$ dne pro všechny chovné nádoby bez ohledu na počet zvířat v chovné nádobě, po celou dobu sběru dat. Pro chovné nádoby s jedním zvířetem je interval $13,48 \pm 4,28$ dne, se dvěma zvířaty $13,34 \pm 4,02$ dne, se třemi zvířaty $13,63 \pm 4,42$ dne, se čtyřmi zvířaty $12,97 \pm 4,04$ dne a s pěti zvířaty $13,50 \pm 4,73$ dne.

Druhá fáze (aktivní využití systému DVC) navazovala ihned na první a probíhala s použitím 2530 registrovaných chovných nádob a provedením 6091 výměn podestýlky. Celkový průměrný interval přestýlání bez ohledu na počet zvířat v chovné nádobě se prodloužil o 8,37 dne na $21,77 \pm 7,27$ dne. Pro chovnou nádobu s jedním zvířetem se hodnota prodloužila o 10,83 dne na $24,31 \pm 6,97$ dne, se dvěma zvířaty se interval přestýlání prodloužil o 10,39 dne na $23,73 \pm 6,66$ dne, se třemi zvířaty došlo k prodloužení intervalu přestýlání o 7,55 dne na $21,19 \pm 6,04$ dne, se čtyřmi zvířaty se interval prodloužil jen o 1,44 dne na $14,41 \pm 2,97$ dne a v kategorii chovných nádob s pěti zvířaty došlo ke zkrácení intervalu přestýlání o 1,28 dne na $12,22 \pm 3,08$ dne. Výsledky pro všechny kategorie počtu zvířat v chovné nádobě byly signifikantní ($p \leq 0.0001$).

Celkově je možné konstatovat, že využití automatizovaného DVC systému výrazně prodloužilo interval přestýlání zejména u chovných nádob obsazených 3 a méně jedinci. Jenom mírné prodloužení intervalu nastalo u chovné nádoby se čtyřmi jedinci a DVC systém dokonce doporučil zkrácení intervalu přestýlání podestýlky u nádoby s pěti jedinci.

Třetí fáze (aktivní využití DVC systému po úpravě algoritmu) proběhla s 3653 registrovanými chovnými nádobami a provedením 11925 výměn podestýlky. Celkový průměrný interval přestýlání bez ohledu na počet zvířat v chovné nádobě se v porovnání s první fází, reprezentující běžně používaný přístup k frekvenci přestýlání IVC chovných nádob, navýšil o 6,60 dne na hodnotu $20,00 \pm 6,60$ dne, což je o 1,77 dne méně než ve druhé fázi. Pro chovnou nádobu s jedním zvířetem se hodnota oproti

klasickému způsobu přestýlání prodloužila o 8,42 dne, na $21,90 \pm 7,20$ dne a proti druhé fázi zkrátila o 2,41 dne. U nádob s dvěma zvířaty došlo k zachování prodloužení intervalu o 7,46 dne na průměrných $20,80 \pm 4,40$ dne, ale prodloužení bylo opět ve srovnání s druhou fází celkově kratší o 2,93 dne. Interval přestýlání pro nádoby se třemi zvířaty se prodloužil o 2,47 dne na $16,10 \pm 4,10$ dne, což je o 5,09 dne kratší než ve druhé fázi. U nádob se čtyřmi zvířaty došlo k prodloužení intervalu jen o 1,03 dne na $14,00 \pm 2,50$ dne, přičemž ve druhé fázi byla hodnota prodloužení intervalu o 0,41 dne delší. Chovné nádoby s pěti zvířaty vykazovaly již ve druhé fázi zkrácení intervalu, který se ve třetí fázi ještě o 0,62 dne snížil na hodnotu $11,60 \pm 1,60$ dne a vůči první fázi se celkově zkrátit o 1,90 dne. Výsledky pro všechny kategorie počtu zvířat v chovné nádobě byly signifikantní ($p \leq 0.0001$).

Po upravení algoritmu DVC systému pro vyhodnocování byly doporučené intervaly nadále delší, než je standardní chovná praxe. Nedošlo tak k výraznému snížení počtu dnů mezi dvěma výměnami podestýlky při srovnání s druhou fází testování (automatizovaný DVC). Nadále přetrvávalo výrazné prodloužení intervalu přestýlání u chovných nádob obsazených 3 a méně jedinci. U chovných nádob se čtyřmi jedinci byl interval shodný se standardním postupem a u nádoby s pěti jedinci doporučil DVC systém (stejně jako ve druhé fázi testování) dřívější přestýlání.

Celkový průměrný interval přestýlání bez ohledu na počet zvířat v chovné nádobě se v porovnání s první fází prodloužil ve druhé fázi měření o 38 % a ve třetí fázi o 33 %. Největší extenze intervalu byla zaznamenána u chovných nádob s jedním zvířetem ve druhé fázi s navýšením o 45 %, které se ve třetí fázi snížilo na 38 %. Chovné nádoby se dvěma zvířaty zaznamenaly extenzi o 44 % ve druhé a o 36 % ve třetí fázi. U tří zvířat bylo prodloužení o 36 % ve druhé fázi s větším poklesem na 15 % ve třetí fázi. Chovné nádoby se čtyřmi zvířaty již měly prodloužení intervalu nižší, s hodnotou 10 % ve druhé a 7 % ve třetí fázi. U nádob s pěti zvířaty došlo ke zkrácení intervalu přestýlání o 10 % ve druhé a o 16 % ve třetí fázi.

4.2. Vliv DVC systému na frekvenci přestýlání chovných nádob s rodičovskými chovnými zvířaty

Z celkového počtu nádob zařazených do studie tvořily v jednotlivých fázích přibližně jednu třetinu chovné nádoby s rodičovskými chovnými zvířaty. Cyklus přestýlání

těchto chovných nádob má často svá specifika s ohledem na porodnost jednotlivých kmenů nebo celkové množství mláďat v nádobě. Z pohledu intervalu přestýlání jsme zaznamenali následující výsledky. Do první fáze se zapojilo 604 nádob, do druhé 632 nádob a do třetí 945 chovných nádob s jedním, dvěma nebo třemi zvířaty. Jedna myš v nádobě představuje samce nebo samici, dvě zvířata jsou chovným párem (samec a samice) a tři zvířata v nádobě je tzv. trio (dvě samice a jeden samec).

V celkovém průměru se u nádob s chovnými zvířaty v první fázi zaznamenal interval přestýlání $12,60 \pm 2,80$ dne, ve druhé fázi se interval navýšil o 89 % na $23,80 \pm 7,20$ dne. Ve třetí fázi došlo, dle očekávání, ke zkrácení intervalu na $20,30 \pm 5,30$ dne, což ale stále představuje prodloužení intervalu přestýlání vůči první fázi o 61 %. U chovných nádob s jedním zvířetem byl zaznamenán v první fázi interval přestýlání $12,40 \pm 2,90$ dne, který se ve druhé fázi prodloužil na $28,00 \pm 5,30$ dne, což znamená prodloužení o 126 %. Ve třetí fázi došlo k mírnému zkrácení intervalu proti druhé fázi o 5,80 dne na $22,20 \pm 5,80$ dne a tím k prodloužení intervalu vůči první fázi o 79 %. Chovné nádoby s chovnými páry dosahovaly v první fázi průměrného intervalu přestýlání $12,70 \pm 2,40$ dne, který se ve druhé fázi prodloužil o 111 % až na $26,80 \pm 7,40$ dne. Ve třetí fázi nebylo prodloužení intervalu v porovnání s první fází tak velké a navýšilo se o 59 % na hodnotu $20,20 \pm 3,90$ dne, což je o 6,60 dne méně než hodnota ve druhé fázi. Všechny výsledky pro celkový průměr, nádoby s jedním zvířetem a nádoby s chovnými páry byly pro všechny fáze signifikantní ($p \leq 0.0001$). Chovné nádoby s chovnými trii zaznamenaly v první fázi interval přestýlání $14,80 \pm 3,80$ dne. Interval se ve druhé fázi signifikantně ($p \leq 0.0001$) navýšil o 62 % na $23,90 \pm 10,40$ dne. Ve třetí fázi ale došlo ke zkrácení intervalu vůči druhé fázi o 9,30 dne na hodnotu $14,60 \pm 2,70$ dne a tím i zkrácení intervalu vůči první fázi o 2 %. Porovnání dat první a třetí fáze již signifikantní nebylo.

4.3. Hodnocení frekvence narušení prostředí chovné nádoby

Z pohledu welfare zvířat jsou zajímavé výsledky, které zachycují, jakým způsobem se digitálně indukovaná změna frekvence výměny podestýlky projevila na redukci nebo navýšení počtu přestýlání chovných nádob, a tedy i narušení hierarchie a mikroklimatu uvnitř chovné nádoby. V celkovém průměru všech chovných nádob došlo v porovnání s první fází ke zmenšení počtu přestýlání o 38 % a ve třetí fázi se celková redukce počtu přestýlání mírně snížila na 33 %. V kategorii chovných nádob s jedním zvířetem byly

redukce v průběhu druhé fáze s hodnotou 45 % nejvyšší a následně došlo v průběhu třetí fáze o pokles na hodnotu 38 %. Chovné nádoby se dvěma zvířaty zaznamenaly redukcí o 44 % ve druhé fázi a o 36 % ve třetí fázi. U chovných nádob se třemi zvířaty dosáhla redukce nejdříve 36 % ve druhé fázi a následně 15 % ve třetí fázi. Skupina nádob se čtyřmi zvířaty již zaznamenala výrazné snížení redukce počtu přestlání ve druhé fázi pouze o 10 % a ve třetí fázi pouze 7 %. Naopak u chovných nádob s 5 zvířaty se projevil opačný trend, kde došlo vlivem digitálního řízení k navýšení frekvence přestlání chovných nádob o 10 % ve druhé fázi a 16 % ve třetí fázi.

Významnější redukce počtu přestlání byla zaznamenána u nádob s chovnými zvířaty, tzn. chovnými páry nebo chovnými trii. V celkovém průměru došlo u všech nádob bez ohledu na počet zvířat v nádobě k redukcí počtu přestlání o 47 % ve druhé fázi a o 38 % ve třetí fázi. Počet přestlání u chovných nádob s jedním zvířetem dosáhl 56 % ve druhé fázi a následně se snížil na 44 % ve třetí fázi. Hodnoty redukce přestlání pro chovné páry dosáhly 53 % ve druhé fázi a 37 % ve fázi třetí. Pro chovná tria je zajímavý posun redukce přestlání o 38 % ve druhé fázi, ale naopak nárůst počtu přestlání o 2 % ve fázi třetí.

4.4. Vliv různých intervalů výměny podestýlky na welfare a zdraví zvířat

4.4.1 Interval přestlání chovných nádob

Pro sledování vlivu intervalu přestlání na welfare jedinců v chovných nádobách jsme použili stejný algoritmus k identifikaci vhodných nádob k přestlání jako ve třetí fázi první části studie. Ve druhé části studie se ale průměrný interval výměny podestýlky řízené systémem mírně prodloužil na hodnotu 24,09 dne pro skupinu se dvěma zvířaty, 18,41 dne pro skupinu se třemi zvířaty a 14,29 dne pro skupinu se 4 zvířaty. Vliv na prodloužení intervalu přestlání měla pravděpodobně vliv změna personálu, lokality měření a zejména menší počet sledovaných chovných nádob a měření hodnot pouze u jednoho myšního kmene.

4.4.2 Průměrná aktivita zvířat v průběhu 24 hodin

Průměrná běžná aktivita zvířat byla měřena uprostřed sedmidenního cyklu výměny podestýlky a sledována v průběhu 24 hodin. Ve druhé části studie, ve skupině nádob s dvěma zvířaty, byla naměřena hodnota aktivity zvířat 0,024 v době zapnutí světelného režimu v chovné místnosti. Následně aktivita během první hodiny klesla na

hodnotu 0,011 a dále půl hodiny stoupala na hodnotu 0,0137. Po malém setrvání na této hladině začala aktivita v průběhu následujících 6,5 hodiny nejdříve prudčeji, pak volněji klesat do klidového režimu zvířat až na nejnižší hodnotu 0,0019, které dosáhla 8 hodin po rozsvícení světel. V klidovém režimu o hodnotách kolem 0,006 se zvířata nacházela v časovém rozmezí od 3 hod do 11,5 hodin po rozsvícení světel. 12 hodin po rozsvícení nastal přechod do nočního režimu. Vypnutí světel předcházely prudký nárůst aktivity trvající až do 12,5 hodiny denního cyklu s vrcholem aktivity na hodnotě 0,0281. Po krátkém vrcholu aktivity nastal během půl hodiny prudký propad na hodnoty 0,0141 následovaný prudkým, později pozvolnějším růstem ke třetímu a nejdéle trvajícímu vrcholu aktivity denního cyklu, s maximální hodnotou aktivity 0,0239, a to 17 hodin po rozsvícení světel. Následující pozvolné pětihodinové klesání aktivity dosáhlo krátkého klidového režimu s hodnotou 0,0062. Dvě hodiny před ukončením tmavé fáze dne se opět prudce zvýšila aktivita zvířat s vrcholovou hodnotou 0,0277 čtvrt hodiny před rozsvícením světel. Podobný trend je patrný při měření aktivity jedinců mezi 14denním přestláním i ve skupině DVC, měřeno uprostřed systémem doporučeného intervalu přestlání. Ve skupinách s třemi a čtyřmi zvířaty jsou patrné podobné křivky kopírující křivku se dvěma zvířaty. Vlastní hodnoty v křivkách jsou ve skupině se třemi a čtyřmi zvířaty vyšší než ve skupině se dvěma zvířaty a odpovídají počtu zvířat ve skupině. Byly také zaznamenány i drobné rozdíly v úrovni mírného zvýšení aktivity přibližně jednu hodinu po rozsvícení světel – zatímco ve skupinách s týdenním přestýláním je tato aktivita výraznější, ve skupině s přestýláním jednou za čtrnáct dní lze již pozorovat zmenšení této aktivity a ve skupině DVC je tento vrchol ještě menší a klesá rychleji do klidové fáze zvířat.

Při porovnání průměrných hodnot aktivity zvířat za 24 hodin v chovných nádobách v rámci jedné skupiny zvířat, ale s různým intervalem přestýlání, je ve skupinách se třemi a čtyřmi zvířaty patrné celkové snížení aktivity zvířat přestlaných podle doporučení DVC. Skupina se dvěma zvířaty vykazuje vyrovnané intenzity aktivity u všech třech intervalů přestýlání.

Průměrná aktivita zvířat za 24 hodin měřená uprostřed přestýlacího intervalu ukazuje u všech skupin opakující se křivku klidnějšího režimu ve světelné části dne se třemi píky zvýšené aktivity v tmavé části dne. Tato základní křivka mění pouze svoji

intenzitu podle počtu zvířat ve skupině a má průměrně nižší intenzitu ve skupinách přestlaných podle doporučení DVC.

Ve třetí části studie byla sledována a porovnána průměrná aktivita zvířat za 24 hodin u obou pohlaví. Ze zaznamenaných dat je patrný podobný trend aktivity zvířat napříč partnerskými institucemi s malou odchylkou pomalého nástupu aktivity samců po nástupu tmavé části dne v chovných prostorách Ústavu molekulární genetiky.

U všech partnerských institucí byla denní aktivita výrazně nižší než aktivita v noci. Denní aktivita se také příliš nelišila mezi pohlavími ($P = 0,481$), ale byly patrné rozdíly v aktivitě mezi institucemi ($p = 1.2E-34$). V tmavé části dne byl zaznamenán významný rozdíl mezi intenzitou aktivity samců a samic ($p = 1,3E-16$) a také rozdíly mezi a institucemi ($p = 1.1E-3$).

4.4.3 Aktivita zvířat po přestlání chovné nádoby

Měření aktivity jedinců v chovných nádobách proběhlo bezprostředně po přestlání, přičemž první měření proběhlo po 1 hodině od přestlání. V detailnějším pohledu na aktivitu zvířat v tomto období lze vidět, že ve skupině se 2 zvířaty v chovné nádobě a s intervalem výměny podestýlky jedenkrát za sedm dní byla aktivita signifikantně vyšší ($p \leq 0.01$) než v DVC skupině. Jako signifikantně vyšší aktivitu ($p \leq 0.05$) lze pak považovat, v porovnání s DVC skupinou, průměrnou aktivitu skupiny s přestýláním jedenkrát za 14 dní. Ve skupinách se třemi a čtyřmi zvířaty byla vždy při porovnání s DVC skupinou naměřena signifikantně vyšší ($p \leq 0.0001$) aktivita zvířat.

Pozorované signifikantní změny v aktivitě mezi jednotlivými skupinami myší, spojené s frekvencí přestlání, nás vedlo k pozorování a vyhodnocení aktivity zvířat bezprostředně po výměně podestýlky, a to po dobu 180 minut, s 15minutovými intervaly měření. Aktivita dvou zvířat měřena v prvních 180 minutách následujících po přestlání chovné nádoby ukazuje téměř stejný vzorec chování myší přestlaných jednou za dva týdny a v DVC režimu. Konkrétně, DVC skupina byla na začátku o něco méně aktivní, ale po 90 minutách dosáhla stejné úrovně (0,050) jako zvířata s dvoutýdenním přestláním a po 180 minutách klesla aktivita obou skupin na hodnotu 0,025. Přitom zvířata s týdenním přestýláním poklesu na stejnou úroveň aktivity dosáhla již po 120 minutách. Ve skupině tří zvířat je patrná zvýšená aktivita po přestlání ve skupině se sedmidenní a čtrnáctidenní frekvencí výměny podestýlky

začínající u hodnot 0,175 s postupným klesáním na 0,050 (14denní) a 0,025 (7denní). DVC skupina začíná na hodnotě 0,100 a zklidnění na hodnotu 0,025 nastává již ve 165. minutě. Ve skupině čtyř zvířat je počáteční aktivita po přestlání opět vyšší než v předchozích skupinách a pro jedince se sedmidenní a čtrnáctidenní frekvencí přestýlání začíná na hodnotě 0,200 s poklesem na 0,050 (14denní) a 0,250 (7denní). DVC skupina začíná na hodnotě 0,160 a po 180 minutách je, stejně jako skupina přestýlaná každých 14 dní, na hodnotě 0,050.

Z výsledků je možné vyhodnotit, že pokud se jedná o chov skupiny myši o počtu tři a více, nižší frekvence přestýlání u takovéto skupiny nemá negativní vliv na jejich aktivitu. Dá se předpokládat, že myši jsou klidnější, jejich „startovací“ aktivita v čase bezprostředně po přestlání je nižší a rychleji pak dosahují klidového režimu. Toto pozorování však neplatí pro skupinu dvou jedinců, kde jejich aktivita byla srovnatelná se 14denní frekvencí výměny podestýlky, i když DVC prodloužil interval na 24 dnů. Zajímavý je však fenomén snížené aktivity u DVC myši ve skupině čtyř jedinců, který byl optimálně stanovený na výměnu podestýlky po 14 dnech chovu. Výsledné změny v chování by se tedy neměly výrazně lišit od skupiny čtyř jedinců přestýlaných každých 14 dní. U DVC myši je ale patrná snížená aktivita již bezprostředně po výměně podestýlky.

4.4.4 Rozdíly v aktivitě zvířat po přestlání dle pohlaví

Zaznamenané výsledky ukazují rozdílnost průměrné aktivity jednotlivých pohlaví bezprostředně po přestlání zvířat v průběhu 5 po sobě jdoucích přestýlacích cyklů v rámci třetí části studie. Je také zřejmé, že aktivnější jsou samice než samci a celková aktivita je vždy větší bezprostředně po přestlání chovné nádoby s klesající tendencí o 25 % v rámci dnů. Tento vzorec vyšší aktivity samic se projevuje jak ve světlé, tak v tmavé části dne.

4.4.5 Nezvyklá aktivita zvířat v chovné nádobě před výskytem zranění a úhynů v průběhu pokusu

V průběhu sběru dat se vyskytly čtyři případy zranění způsobených vzájemnými souboji. Konkrétně dva případy pokousání v oblasti beder, jeden v oblasti genitálií a jeden případ pokousání na břicho. Zraněná zvířata byla separována od skupiny a do experimentu se již nevrátila. Zranění se objevila vždy ve skupině se čtyřmi zvířaty, z toho jednou ve skupině s přestýláním jednou za 7 dní, jednou ve skupině

s přestýláním jednou za 14 dní a dvakrát ve skupině s přestýláním řízeným DVC. Ve skupině s týdenním přestýláním a dvěma zvířaty se vyskytly dva případy vykousávání srsti (tzv. *barbering*). Náhlý úhyn zvířat byl zjištěn pouze u skupiny čtyř zvířat s přestýláním řízeným DVC.

Aktivita zvířat zaznamenaná den před zjištěním zranění nebo úhynu ve všech případech ukazuje velké množství krátkých vrcholů aktivity následované často rychlým poklesem aktivity bez ohledu na tmavou nebo světlou část dne. Vrcholy aktivity se v době rozsvícených světel pohybují v nižších průměrných hladinách a v tmavé části dne jsou průměrně vyšší. Z výsledků je také patrné, že klidové fáze i fáze aktivity trvají krátkou dobu. Dva úhyny zvířat a jedno zranění v DVC skupině se čtyřmi zvířaty bylo objeveno vždy v jedné chovné nádobě, kde byl zřejmě přítomen agresivnější jedinec.

Žádné ze zaznamenaných zranění nebo úhynů časově nesouvisela s přestýláním nebo jinou manipulací se zvířaty nebo manipulací s chovnou nádobou, ale byla pravděpodobně vyvolána agresivitou jedince. Výrazné změny v aktivitě den před zraněním nebo úhynem je možné považovat za dobrý indikátor nestandardní situace v chovné nádobě a impuls k možnému předejití zranění nebo alespoň včasnému ošetření zraněného zvířete.

4.4.6 Změny lokalizace toalety a hnízda v chovné nádobě

V rámci druhé části studie byly lokalizace toalety a hnízda v chovných nádobách detekované systémem DVC shodné s lokalitami zaznamenanými ošetřovateli v den přestýlání. Vzájemná pozice toalet nebo hnízda se bez ohledu na počet zvířat v chovných nádobách nebo interval přestýlání měnila a nebyla v jejich vzájemných pozicích zjištěna žádná statistická významná změna. Rovněž nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ve změně pozice toalety a hnízda po přestýlání v rámci jedné chovné nádoby.

Ve třetí části studie se pozice toalety po přestýlání měnila, ale ve dvou třetinách případů byla umístěna do původní lokality před přestýláním. Větší tendenci k přesunu toalety měli samci. Samice i samci měli větší tendenci vytvářet toalety v přední části chovné nádoby.

Sledování míst se zvýšenou aktivitou zvířat a jejich porovnání s umístěním toalety vedlo k definování preference trávení aktivit v průběhu dne v dané části chovné nádoby neboli frontality.

Procentuální aktivita v přední části chovné nádoby se obecně zvyšuje v případě umístění toalety v zadní části chovné nádoby a snižuje v případě umístění toalety v přední části chovné nádoby. Toto chování bylo signifikantní po celou dobu sběru dat ($p = 9E-34$ až $p = 1.2E-04$).

Samice myší mají tendenci v oblasti toalety snižovat aktivitu o 5 až 10 % již během 2. týdne po výměně chovné nádoby, zatímco samci vykazují mnohem výraznější aktivity v prostoru bez toalety již první den po přestlání. Poloha toalety ale neměla v IMG a v KI žádný statisticky významný ($p = 4,4E-01$) vliv na preferenci samic myší pro frontalitu v průběhu celé třetí části studie.

5 Diskuze

5.1. Vliv DVC systému na frekvenci přestýlání

Výsledky první fáze monitorují běžnou praxi velkokapacitních chovů vybavených individuálně ventilovanými chovnými nádobami a jsou ve shodě s obecným doporučením popsáním v literatuře (Lawson, 2009, Barnett, 2017, National Research Council, 2011). Mírná odchylka 0,37 – 1,03 dne od požadovaného 14denního intervalu přestýlání je přijatelná. Je způsobena dalšími neplánovanými požadavky na výkony personálu v průběhu daného období a nutností odpovídajícím způsobem flexibilně přizpůsobit navazující práce. Dalšími důvody zkrácení intervalu může být spojení drobných procedur na zvířatech (např. značení zvířat, odběr biologického materiálu) s přestýláním chovné nádoby nebo vylití vody z napájecí láhve.

Výsledky druhé fáze ukazují výrazné prodloužení intervalu přestýlání až na průměrných 21,77 dne. Markantnější prodloužení intervalu se dle očekávání projevilo zejména ve skupinách s nižšími počty zvířat a potvrdilo tak všeobecně rozšířené zkušenosti s přímou úměrou počtu zvířat v chovné nádobě a intenzitou znečištění chovných prostor. Minimální navýšení intervalu tedy bylo ve skupině chovných nádob se čtyřmi zvířaty, zatímco ve skupině s pěti zvířaty v chovné nádobě došlo naopak ke zkrácení intervalu oproti běžně používanému standardu na 12,22 dne.

Ve třetí fázi výsledky ukázaly celkové zkrácení intervalu přestýlání vůči druhé fázi o 1,77 dne na průměrných 20,0 dne pro všechny chovné nádoby bez ohledu na počet zvířat. Zkrácení intervalu přestýlání bylo sledováno u všech skupin zvířat a je pravděpodobně zapříčiněno časovým odstupem od druhé fáze, kdy se začátkem druhé fáze začal i sběr informací a postřehů od ošetřovatelů, kteří hodnotili úroveň znečištění chovné nádoby definované systémem DVC. Tato data pak vedla ke zpřesnění algoritmů před započítáním třetí fáze a tím ke zkrácení intervalů přestýlání vůči druhé fázi. Z výsledků je zřejmé téměř ideální standardní nastavení intervalu přestýlání pro skupinu se čtyřmi zvířaty. Důležité je zjištění, že u skupiny s pěti jedinci lze doporučit zkrácení intervalu výměny podestýlky na 11,6 dne (proti 14denní rutině). Je to vhodné zejména z pohledu welfare zvířat a jejich případného vystavování zdravotně závadné nadměrné vlhkosti z prostředí (Rosenbaum et al., 2009).

Rodičovské chovné nádoby jsou velmi specifické. Počty jedinců v chovných nádobách se často mění, ať už z důvodu vytváření nových chovných párů, chovných

trojic, nebo naopak „odhazováním“ samic po detekci kopulačních zátek, nebo náhlým navýšením počtu zvířat v chovné nádobě po porodu. S těmito změnami se mění i intenzita znečišťování chovných nádob, a tedy i nároky na intervaly výměny podestýlky. V rodičovských nádobách s jedním zvířetem je prodloužení intervalu přestýlání výraznější než u průměrných intervalů všech zvířat v chovu. Může to být dáno tím, že specifické skupiny chovných zvířat, jako například samice určené pro časovanou březost nebo březí samice, zůstávají v našem zařízení určitou dobu samy v chovné nádobě. U nádob s chovnými páry lze také v porovnání s průměrnými intervaly všech chovných zvířat pozorovat oproti očekávání delší intervaly přestýlání. Jiná situace byla pozorována ve skupině tří chovných zvířat, kde dokonce ve třetí fázi došlo k výraznému zkrácení intervalu oproti druhé fázi, který si lze vysvětlit větším počtem nádob s mláďaty.

Zajímavé by mohly být také výsledky sledující vliv počtu narozených a odchovaných mláďat ve vztahu k intervalu přestýlání. Vzhledem k pozorováním v této studii lze očekávat větší klid matek, méně stresu a tím i větší počty odchovaných potomků. Sanderson (2010) sice ve své studii došel k závěru, že přestýlání chovných nádob s čerstvě narozenými mláďaty nemá negativní vliv na chovatelskou výkonnost, ale praxe v různých chovech jednoznačně podporuje přímou souvislost mezi zvýšením úspěšnosti odchovu mláďat a ponecháním matek s mláďaty v delším klidu po porodu. Celkový klid v chovné nádobě má podle Reeb-Whitaker et al. (2001) a Burn et al. (2006) vliv na mortalitu mláďat, a proto by mohl mít vliv i na lepší příjem a konverzi krmiva, tím i vyšší hmotnost zvířat při odstavu nebo v době pohlavní zralosti.

Prodloužením intervalů přestýlání chovných nádob dochází zároveň i ke snížení počtu zásahů ošetřovatelů do prostředí a sociálních vazeb zvířat. Snížení počtu otevírání chovné nádoby o 33 % u všech nádob v zařízení a o 38 % u nádob s chovnými zvířaty může vést k nepřímému pozitivnímu vlivu na péči o zvířata (více času ošetřovatelů), a samozřejmě také na ekonomickou stránku chovu experimentálních zvířat.

5.2. Vliv různých intervalů výměny podestýlky na welfare a zdraví zvířat

5.2.1 Interval přestýlání chovných nádob

Intervaly výměny podestýlky dle DVC se ve druhé části studie významně nelišily od intervalů naměřených v první části. Mírná odlišnost byla pravděpodobně dána

rozdílem počtu monitorovaných chovných nádob, různými kmeny zvířat, variabilitou věku, pohlavím a vlivem skladby chovných nádob v první části, kde bylo pracováno i s chovnými nádobami s chovnými páry a neodstavenými mláďaty. Jistý vliv mohl mít i jiný personál a odlišná lokalita umístění experimentu.

5.2.2 Průměrná aktivita zvířat v průběhu 24 hodin

Data aktivity zvířat v průběhu 24 hodin ukazují, že bez ohledu na jejich počet v chovné nádobě nebo frekvenci přestýlání vykazují všechny skupiny v zásadě stejný vzorec chování se střídáním větší aktivity v době zhasnutých světel v chovné místnosti a celkově snížené aktivity v době, kdy jsou světla v chovné místnosti rozsvícena. Ve sledovaném časovém úseku se pravidelně objevují 3 výrazné vrcholy aktivity zvířat, a sice dva krátké po rozsvícení světel a po jejich zhasnutí a jeden delší vrchol zvýšené aktivity přibližně uprostřed noci. Pernold et al. (2019), Fuochi et al. (2021) i Ulfhake et al. (2022) ve svých pracích zahrnujících srovnání aktivity zvířat i z dalších institucí popisují v podstatě stejný vzorec chování, kde se výrazně zvyšuje aktivita zvířat po zhasnutí světel a zůstává na variabilní úrovni po dobu prvních dvou třetin tmavé fáze dne s následným klesáním aktivity až na úroveň klidové fáze pozorované za světelné části dne. Před přechodem do světelné fáze dne je pozorováno, stejně jako v této studii, rychlé zvýšení aktivity pokračující i krátce po rozsvícení světel. Porovnání aktivity mezi jednotlivými institucemi v rámci práce Ulfhake et al. (2022) ukazuje, že je sice základní vzorec aktivity stejný, ale jednoznačně bude na úrovni jednotlivých institucí a zvířetníků ovlivňován dalšími environmentálními faktory a faktory různého pracovního přístupu personálu a pracovního biorytmu uživatelských zařízení. Stejný vliv budou mít rozdíly mezi pohlavími zvířat s jednoznačně vyšší aktivitou samic, nebo zvolený typ podestýlky, tvrdost krmiva, typ hnízdního materiálu, ale i množství a pestrost *enrichmentu*.

Rozdíly v intenzitě aktivity v rámci jednotlivých skupin s různou frekvencí přestýlání chovných nádob jsou bezesporu dány rozdílným počtem zvířat v jedné chovné nádobě, totéž dokládá i Vagima et al. (2020). Zajímavé jsou rozdíly v úrovni mírného zvýšení aktivity přibližně jednu hodinu po rozsvícení světel, kdy je tato aktivita nejmenší v DVC skupinách, a v DVC skupině se třemi a čtyřmi zvířaty lze také pozorovat mírné snížení hladiny vrcholů aktivity oproti ostatním skupinám. Je na zvážení a dalším pozorování, zda průměrně snížená frekvence přestýlání zvířat sice

nevedla ke změně rytmu denní aktivity zvířat, ale mohla vést ke snížení vlastních aktivních fází, a tedy i k větší relaxaci zvířat.

5.2.3 Aktivita zvířat po přestlání chovné nádoby

Výsledky ve všech sledovaných skupinách ukazují vyšší aktivity zvířat ihned po přestlání bez ohledu na počet zvířat ve skupině a snížení aktivity v průběhu následujících 180 minut na téměř stejnou úroveň. Vyšší počáteční aktivita byla přisuzována změně prostředí a rozdílnému olfaktorickému vjemu. Rasmussen et al. (2011) ale tuto hypotézu ve své studii nepotvrzuje, a naopak jako jeden z možných faktorů uvádí způsob manipulace se zvířaty během přestýlání. Aktuálně preferovaný způsob přestýlání myši pomocí ruličky papíru, menší nádoby nebo v „miscé“ vytvořené z dlaní vede, podle některých publikovaných prací, ke snížení úzkosti během přestýlání, menšímu vylučování během manipulace a menšímu strachu z lidské ruky. Je pravděpodobné, že takto manipulovaná zvířata budou vykazovat odlišné počáteční křivky aktivity a lze se jen domnívat, že u těchto zvířat také dojde k rychlejšímu snížení aktivity na jejich základní úroveň. Za povšimnutí stojí, že DVC skupina vykazuje v porovnání s ostatními skupinami vždy nižší počáteční aktivitu po přestlání, kterou si udržuje v případě nádob se dvěma zvířaty až 75 minut, v případě nádob se třemi zvířaty 180 minut a u nádob se čtyřmi zvířaty 135 minut. Skupiny s týdenním a čtrnáctidenním přestýláním začínají aktivitu na téměř stejné úrovni. U skupiny s týdenním přestýláním je ale vždy patrná nižší hladina aktivity než u skupiny se čtrnáctidenním přestýláním, skupina s týdenním přestýláním dosahuje nejnižších hladin aktivity také po 180 minutách. DVC skupiny působí celkově klidnějším dojmem možná způsobeným větším obdobím klidu před přestýláním. Výjimkou však byla skupina se dvěma zvířaty, kde nebyly rozdíly na začátku křivky ani v jejím průběhu tak markantní, přestože byl v této skupině interval přestýlání nejdelší.

5.2.4 Frontalita a lokalizace toalety v chovné nádobě

Naše studie podhaluje první poznatky zkoumání behaviorálního chování myši a jejich preference k umístění toalety, hnízda a místa, kde tráví v průběhu světelné nebo tmavé části dne nejvíce času. V uvedené studii a díky možnosti porovnání výsledků s dalšími třemi institucemi lze konstatovat, že samice méně často mění pozici toalety po přestlání chovné nádoby a preferují její umístění v přední části chovné nádoby. Samci

jsou v tomto chování více variabilní, více tedy mění pozice toalety po přestlání a zároveň preference umístění toalety, jak vyplynulo z výsledků dosažených v rámci sledování v různých institucích. Ze studie Ulfhake et al. (2022) je zřejmé, že zvířata obecně tráví více času na opačné straně chovné nádoby, než si zvolila pro toaletu. Možnou příčinou této skutečnosti jsou jednak olfaktorické důvody, ale i zvyšující se koncentrace amoniaku v souvislosti s akumulací trusu. V naší studii koncentrace amoniaku ale při 14denním intervalu výměny podestýlky v IVC nedosahovala hodnot, které by měly jasně prokazatelný vliv na zdraví zvířat nebo na histologické změny v rostrálních částech respiračního aparátu. Výše popsaná frontalita může být ovlivněna stejně jako u cirkadiálního rytmu dalšími environmentálními faktory a faktory různého pracovního přístupu personálu a pracovního biorytmu uživatelských zařízení. Například v případě umístění stojanu ke zdi sousedící s výtahem lze očekávat snahu zvířat trávit více času v přední části chovné nádoby, a naopak v případě většího pohybu v chovných místnostech se zvířata lokalizují více do zadních částí chovných nádob. V rámci druhé části studie jsme sice nezjistili statisticky průkazný rozdíl v rámci pozice hnízda a toalety, ale bylo zaznamenáno několik případů, kdy si myši samci vytvořili hnízdo v blízkosti toalety, které udrželi až do doby následujícího přestlání nádoby. Otázkou také zůstává, zda je většinová preference zvířat umístit toaletu do přední části chovné nádoby dána snahou o nižší kontaminaci krmiva exkrementy vzhledem k umístění krmítka v zadní části chovné nádoby, což vede k většímu výskytu zbytků potravy v podestýlce v této oblasti, nebo zda je toto chování více ovlivněno designem použité individuálně ventilované chovné nádoby. Zvolené chovné nádoby mají přívod i odtah vzduchu ve víku nádoby. Přiváděný vzduch tak proudí na dno chovné nádoby přes krmítko nebo těsně za ním a v přední části chovné nádoby se stáčí k víku nádoby a vrací se do odtahového ventilu. Díky tomu jsou možná lépe z toalet umístěných v přední části nádoby odvětrávány nežádoucí pachy a amoniak. Zajímavé by bylo srovnání stejné studie s dalšími výrobci IVC, kteří mají vzduch přiváděný ve spodní části chovné nádoby v úrovni zvířat, nebo systémem, který má přívod a odvod vzduchu v rámci celého víka IVC nádoby.

5.2.5 Nezvyklá aktivita zvířat v chovné nádobě před výskytem zranění a úhynu

Aktivita zvířat zaznamenaná den před zjištěním zranění nebo úhynu je ve všech případech charakteristická častým střídáním prudkého nárůstu aktivity a jejího následného poklesu. V porovnání se vzorcem denní aktivity jsou patrné velmi krátké

doby odpočinku, ale i krátké trvání vrcholů aktivity, kterých je výrazně vyšší počet. Lze usuzovat, že zvířata jsou po většinu dne ve stresu, zaměstnána krátkými souboji. Uhynulé zvíře a zraněný jedinec v DVC skupině byli nalezeni vždy v jedné chovné nádobě, kde byl zřejmě přítomen agresivnější samec. Nemají tedy přímou souvislost s intenzitou přestýlání, manipulací nebo chovnou nádobou. Podle van Loo et al. (2001), který doporučuje maximální počet zvířat ve skupinách samců omezit na 3, bylo možné vyšší agresi ve skupině čtyř samců předvídat. Naše pozorování jeho tvrzení částečně podporují, protože zranění způsobená agresivitou byla zaznamenána pouze v chovných nádobách se čtyřmi samci. V průběhu studie jsme ale v této oblasti neposbírali dostatek dat, abychom ze studie dokázali vyvodit, zda ovlivnění frekvence přestýlání chovných nádob může způsobit vyšší agresivitu u zvířat. Je ale zřejmé, že systém dokáže nezvyklou aktivitu spolehlivě detekovat a může ošetřovatelům pomoci identifikovat zraněná nebo nemocná zvířata a poskytnout jim včasnou odpovídající péči.

6 Závěr a doporučení pro praxi

Výsledky této práce potvrzují hypotézu o možnosti využití systému DVC k prodloužení intervalu výměny podestýlky i na více než čtrnáct dnů v závislosti na počtu zvířat v chovné nádobě za současného zachování vhodných mikroklimatických podmínek pro zvířata uvnitř chovné nádoby. DVC systémem řízená doba přestýlání intervaly výměny podestýlky dle aktuálního stavu prostředí v chovné nádobě prodlužuje nebo zkracuje. Výsledky potvrdily, že běžně používaný interval přestýlání jedenkrát za čtrnáct dní je ideální pro chovné nádoby se čtyřmi zvířaty, ale je nevyhovující pro chovné nádoby s pěti zvířaty. Je tedy ke zvážení, zda i přes nenaplnění legislativního limitu maximálního počtu zvířat, respektive limitu celkové živé hmotnosti na plochu chovné nádoby nebude vhodné v nejvíce používaných nádobách typu II L počty zvířat omezit na maximální počet čtyř kusů na jednu nádobu.

Uvedené změny intervalu přestýlání chovných nádob DVC systémem je třeba kriticky vztahovat pouze k danému zařízení, počtu a kmeni zvířat. Dále také k personálu a lokálním zvyklostem péče o zvířata, stejně tak i k lokálnímu vnímání úrovně znečištění podestýlky a naléhavosti její výměny. Konkrétní hodnoty se tedy mohou v různých zařízeních lišit. Pestré zastoupení různých kmenů zvířat a velký počet sledovaných chovných nádob nám ale poskytuje možnost námi zjištěné hodnoty doporučit zařízením, která nedisponují DVC technologií. Aplikace našeho doporučení umožní změnit denní rutinu intervalu přestýlání chovných nádob, a to jak ve prospěch pohody zvířat, tak s ohledem na ekonomicko-ekologické výhody ve formě 30% redukce počtu přestlání.

Díky neustálému monitoringu aktivity zvířat bylo možné stanovit základní vzorce denní aktivity a ověřit, že se replikují bez ohledu na intervaly přestýlání a počet zvířat v chovných nádobách. K narušení vzorců aktivity dochází zpravidla v době přestlání a manipulace a velmi pravděpodobně i v případě procedur se zvířaty. Tyto poznatky mohou vést k lepšímu plánování nastavení světelného režimu zvířat s ohledem na rutinní činnosti v chovných místnostech, ale i plánování experimentu tak, aby byly tyto činnosti prováděny přednostně v prvních 4 hodinách po rozsvícení světel a docházelo tak k co nejmenšímu narušování klidové fáze zvířat.

Tato práce také potvrdila druhou část hypotézy, že prodloužení intervalu přestýlání chovných nádob, a tedy i delší pobyt zvířat v nenarušeném chovném prostředí nepovede ke zvýšení hladiny stresu nebo ke snížení úrovně welfare zvířat

s následným narušením zdravotního stavu. Prodloužení intervalů nevede k významnému zvýšení bojů mezi zvířaty. Naopak, po přestlání u skupin s delším intervalem lze sledovat celkově menší aktivitu zvířat, mírnější reakce na změnu prostředí a hierarchie. Automatický monitoring prostředí chovných nádob a aktivity zvířat může v chovech zvyšovat pravděpodobnost záchytu případných problémů s napájecím systémem a upozornit na zvýšenou vlhkost podestýlky např. při vytečení napájecích lahví nebo zaplavení chovné nádoby. To umožní předcházet zdravotním rizikům zvířat. Díky známému vzorci denní aktivity zvířat dokáže systém upozornit na odchylky, a tedy i na případný výskyt zranění po bojích nebo vznik klinických příznaků onemocnění zvířat. V tomto smyslu mohou být výsledky, dosažené v rámci této studie, využity i jako nástroj k detekci tzv. „*humane endpoints*“ v průběhu experimentů, to znamená detekci takové úrovně zhoršení klinického stavu, kdy je z etických důvodů nutné experiment ukončit utracením zvířete.

7 Seznam použité literatury

Asmakh, M. A. a Zadjali, F. (2015). Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25:1583-1588.

Barnett, W. S. (2017). *Introduction to Laboratory Animal Science, Technology and Welfare*. Třetí vydání, Institute of Animal Technology, Oxford. ISBN 978-1-9999168-0-0.

Basic, M. a Bleich, A. (2019). Gnotobiotics: Past, present and future. *Laboratory Animals*, 53(3):232-243.

Burman, O. et al. (2018). The effect of exposure to low frequency electromagnetic fields (EMF) as an integral part of the housing system on anxiety-related behaviour, cognition and welfare in two strains of laboratory mouse. *PLOS ONE*, 13(5): e0197054.

Burn, C. C. et al. (2006). Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. *Laboratory Animals*, 40(4):353-70.

Burn, C. C. et al. (2008). Effects of cage-cleaning frequency on laboratory rat reproduction, cannibalism, and welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 114 (1): 235–247.

Carter, P. B. et al. (2020). Gnotobiotics and the Microbiome. In: Suckow, M. A. et al. *The Laboratory Rat*, Třetí vydání, Academic Press, pp. 827-848. ISBN 9780128143384.

Castelhano-Carlos, M. J. a Baumans, V. (2009). The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. *Laboratory Animals*, 43(4):311-327.

Charles River Laboratories Inc. (2018). Standardization Processes at a commercial Breeder. Wilmington, Massachusetts, USA, Charles River Laboratories Inc.

Class Biologically Clean Ltd., (2022). Specialty Isolators. [online] [20. 5. 2022]. Dostupné z: <https://www.cbclean.com>

Fridland, G. H. (2008). *Laboratory animal technologist Training Manual*. American Association for Laboratory Animal Science, Drumwright and Co.

Fuochi, S. et al. (2021). Phenotyping spontaneous locomotor activity in inbred and outbred mouse strains by using Digital Ventilated Cages. *Lab Animal*, **50**:215–223.

Gamble, M. R. a Clough, G. (1976). Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. *Laboratory Animals*, 10:93-104.

Gaskill, B. N. et al. (2011). Working with what you've got: Changes in thermal preference and behavior in mice with or without nesting material. *Journal of Thermal Biology*, 36 (3):193–199.

Goltstein, P. M. et al. (2018). Food and water restriction lead to differential learning behaviors in a head-fixed two-choice visual discrimination task for mice. *PLOS ONE*, 13(9):e0204066.

Hau, J. a Schapiro, S. J. (2011). *Handbook of Laboratory Animal Science, Volume I, Essential Principles and Practices*. CRC Press, Boca Raton Florida. ISBN 978-14200-8456-6.

Hedrich, H. J. a Bullock, G. (2004). *The Laboratory Mouse*. První vydání. Elsevier, London. ISBN 978-0-12-336425-8.

Hedrich, H. J. a Nicklas, W. (2012). Housing and Maintenance. In: Hedrich, H. J. et al. *The Laboratory Mouse*, Druhé vydání, Academic Press, pp. 521–545. ISBN 978-0123820082.

Heffner, H. E. a Heffner, R. S. (2007). Hearing ranges of laboratory animals. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46(1):20-2.

Heine, W. O. P. et al. (1998). *Environmental management in laboratory animal units: Basic technology and hygiene. Methods and practice*. Pabst science publishers. Lengerich, Berlin, Scottsdale, Wien, Zagreb. ISBN 3-933 151-09-0.

Hurst, J. L. (1993). The priming effects of urine substrate marks on interactions between male house mice, *Mus musculus domesticus* Schwarz and Schwarz. *Animal Behaviour*, 45(1):55-81.

Iannello, F. (2019). Non-intrusive high throughput automated data collection from the home cage. *Heliyon*, 5(4):e01454.

Jebavý, L. et al. (2014). *Ochrana, chov a využití pokusných zvířat*. Společnost pro vědu o laboratorních zvířatech, Brno. ISBN 978-80-213-2486-2.

Johns Hopkins University (2022). The Mouse. [online] [20. 5. 2022]. Dostupné z: <https://web.jhu.edu/animalcare/procedures/mouse.html>

Johnson, M. (2012). Laboratory Mice and Rats. Materials and Methods. [online] Labome.com [cit. 20. 5. 2022]. Dostupné z: <https://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>

Lawson, P. T. (2009). *Laboratory Animal Technician Training Manual*. American Association for Laboratory Animal Science, Drumwright and Co.

Lawson, P. T. (2010). *Assistant Laboratory Animal Technician Training Manual*. American Association for Laboratory Animal Science, Drumwright and Co.

Lindsey, J. R. et al. (1991). *Infectious Diseases of Mice and Rats*. National Academy Press, Washington (DC). ISBN 0-309-06332-9.

Mähler, M. et al. (2014). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals*, 48(3):178-192.

Maxwell, A. (2016). Why do scientists use mice in medical research? [online] Blood.ca [cit. 20. 5. 2022]. Dostupné z: <https://www.blood.ca/en/research/our-research-stories/research-education-discovery/why-do-scientists-use-mice-medical>

Moore, D. M. (2000). *Laboratory animal medicine and science series II. Rats and mice: Biology*. Health sciences center for educational resources University of Washington. Seattle, WA. ISBN: 1-55910-051-6.

Morimoto, A. et al. (1991). Possible involvement of prostaglandins in psychological stress-induced response in rats. *The Journal of physiology*, 443:421–429.

Ministerstvo zemědělství ČR (MZe) (2022). Grafy vývoje počtu použitých pokusných zvířat. [online] [cit. 20. 5. 2022]. Dostupné z: <https://eagri.cz/public/web/mze/ochrana-zvirat/pokusna-zvirata/prehled-zvirat-pouzitych-k-pokusum/grafy/>

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Osmé vydání. National Academy Press, Washington (DC). ISBN 978-0-309-15400-0.

Nicklas, W. et al. (2015). Maintaining and Monitoring the Defined Microbiota Status of Gnotobiotic Rodents, *ILAR Journal*, 56(2):241–249.

Pernold, K. et al. (2019). Towards large scale automated cage monitoring – diurnal rhythm and impact of interventions on in-cage activity of C57BL/6J mice recorded 24/7 with a non-disrupting capacitive-based technique. *PLOS ONE*, 14(2):e0211063.

Potgieter, F. J. a Wilke, P. I. (1996). The dust content, dust generation, ammonia production, and absorption properties of three different rodent bedding types. *Laboratory Animals*, 30(1):79-87.

Rasmussen, S. et al. (2011). Cage Change Influences Serum Corticosterone and Anxiety-Like Behaviors in the Mouse. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(4):479-483.

Recordati, C. et al. (2019). Long-Term Study on the Effects of Housing C57BL/6NCrl Mice in Cages Equipped with Wireless Technology Generating Extremely Low-Intensity Electromagnetic Fields. *Toxicologic Pathology*, 47(5):598-611.

Reeb-Whitaker, C. K. et al. (2001). The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. *Laboratory Animals*, 35(1):58–73.

Rosenbaum, M. D. et al. (2009). Effects of Cage Change Frequency and Bedding Volume on Mice and Their Microenvironment. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48(6):763-773.

Sanderson, A. E. et al. (2010). Effect of cage-change frequency on rodent breeding performance. *Lab Animal*, 39(6):177-82.

Schondelmeyer, C. W. et al. (2006). Investigation of appropriate sanitization frequency for rodent caging accessories: evidence supporting less-frequent cleaning. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 45(6):40-3.

Scientific Committee on Emerging Newly Identified Health Risks (SCENIHR), (2015). Opinion on potential health effects of exposure to electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 36(6):480-4.

Serrano, L. J. (1971). Carbon dioxide and ammonia in mouse cages: effect of cage covers, population, and activity. *Laboratory animal science*, 21(1):75-85.

Tecniplast S.p.A. (2010). DVC System Instructions For Use. Bugugiate, Varese, Itálie, Tecniplast S.p.A.

Treuting, P. M. a Dintzis, S. M. (2012). *Comparative anatomy and histology. A mouse and human atlas*. První vydání. Academic Press. Elsevier. ISBN 978-0-12-381361-9.

Tucker, P. K. (2007). Systematics of the genus *Mus*. In: Fox J. G. Et al. *The Mouse in Biomedical Research. History, Wild Mice, and Genetics*. Druhé vydání. Academic Press. Elsevier. pp. 13-23. ISBN 978-0-12-369455-3.

Turner, J. G. (2020). Noise and Vibration in the Vivarium: Recommendations for Developing a Measurement Plan. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 59(6):1-8.

Ulfhake, B. et al. (2022). A multicentre study on spontaneous in-cage activity and micro-environmental conditions of IVC housed C57BL/6J mice during consecutive cycles of bi-weekly cage-change. *PLOS ONE*, 17(5):e0267281.

Vadala, M. et al. (2015). Mechanisms and therapeutic applications of electromagnetic therapy in Parkinson's disease. *Behavioral and brain functions*, 11:26.

Vadala, M. et al. (2016). Mechanisms and therapeutic effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in oncology. *Cancer Medicine*, 5(11):3128-3139.

Vagima, Y. et al. (2020). Group activity of mice in communal home cage used as an indicator of disease progression and rate of recovery: Effects of LPS and influenza virus. *Life sciences*, 258:118214.

van Loo, P. L. et al. (2000). Modulation of aggression in male mice: influence of cage cleaning regime and scent markers. *Animal Welfare*, 9(3):281–295.

van Loo, P. L. et al. (2001). Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiology and Behavior*, 72(5):675–683.

van Loo, P. L. et al. (2004). Long-term effects of husbandry procedures on stress-related parameters in male mice of two strains. *Laboratory Animals*, 38(2):169–177.

Vyhláška č. 419/2012, o ochraně pokusných zvířat, ve znění pozdějších předpisů.

Watanabe, T. et al. (1999). Effects of targeted disruption of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene on stress-induced hyperthermia. *The Journal of Physiology*, 515(Pt 3):881–885.

Winnicker, C. et al. (2012). *A Guide to the Behavior and Enrichment of Laboratory Rodents*. Charles River Laboratories. ISBN 978-0-9835453-3-0.

YourGenome, (2022). Why use the mouse in research. [online] [20. 5. 2022]. Dostupné z: <https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-mouse-in-research/>

Zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.