



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

Disertační práce

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

Autor práce: MVDr. Jan Honetschläger

Vedoucí práce: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

České Budějovice

2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této disertační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Podpis

Abstrakt

V posledních letech se v chovech laboratorních myší 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 vykazují 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

Poděkování

Děkuji školiteli prof. Ing. Janu Trávníčkovi, CSc. a doc. Ing. Romanu Konečnému, Ph.D. za metodickou pomoc a konzultace v sepisování této práce.

Poděkování patří také mé rodině, přátelům, kolegům, kteří mi se zpracováním práce pomohli. Děkuji jim za podporu, toleranci a cenné rady.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Literární přehled | 10 |
| 1.1. | Laboratorní myš jako pokusné zvíře | 10 |
| 1.1.1 | Charakteristika myši..... | 10 |
| 1.1.2 | Myši v experimentech | 10 |
| 1.1.3 | Rozdělení myši dle mikrobiální kolonizace | 11 |
| 1.2. | Chovné systémy a chovné technologie pro myši | 13 |
| 1.2.1 | Chovné systémy | 13 |
| 1.2.2 | Aktuálně používané technologie pro chov myši | 16 |
| 1.3. | Hygiena chovu a faktory ovlivňující zdraví myši | 22 |
| 1.3.1 | Výživa a napájení..... | 23 |
| 1.3.2 | Mikro a makroklima prostředí | 23 |
| 1.4. | Zdravotní rizika způsobená vnějším prostředím | 28 |
| 2 | Hypotéza a cíle práce | 29 |
| 3 | Materiály a metodika | 30 |
| 3.1. | Experimentální zvířata a prostředí..... | 30 |
| 3.1.1 | Experimentální zvířata | 30 |
| 3.1.2 | Výživa a napájení zvířat..... | 30 |
| 3.1.3 | Podestýlka a hnízdní materiál | 30 |
| 3.1.4 | Manipulace se zvířaty | 31 |
| 3.2. | Technologie chovu | 31 |
| 3.2.1 | Charakteristika chovných zařízení | 31 |
| 3.2.2 | Chovné nádoby | 31 |
| 3.2.3 | DVC stojany..... | 31 |
| 3.2.4 | Zajištění čistoty a standardnosti prostředí..... | 32 |
| 3.2.5 | Zoohygienické podmínky v chovné místnosti | 32 |
| 3.3. | Organizace experimentu první části studie..... | 32 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.3.1 | Postupy hodnocení digitálního a klasického způsobu přestýlání v průběhu experimentu | 33 |
| 3.4. | Organizace experimentu druhé části studie | 34 |
| 3.4.1 | Vybrané metody sledování vlivu intervalu výměny podestýlky na welfare a zdraví zvířat..... | 34 |
| 3.5. | Organizace experimentu třetí části studie..... | 36 |
| 3.6. | Zpracování a statistické vyhodnocení dat | 36 |
| 4 | Výsledky | 39 |
| 4.1. | Vliv DVC systému na frekvenci přestýlání chovných nádob | 39 |
| 4.2. | Vliv DVC systému na frekvenci přestýlání chovných nádob s rodičovskými chovnými zvířaty | 42 |
| 4.3. | Hodnocení frekvence narušení prostředí chovné nádoby..... | 45 |
| 4.4. | Vliv různých intervalů výměny podestýlky na welfare a zdraví zvířat..... | 47 |
| 4.4.1 | Interval přestýlání chovných nádob | 47 |
| 4.4.2 | Průměrná aktivita zvířat v průběhu 24 hodin | 48 |
| 4.4.3 | Aktivita zvířat po přestlání chovné nádoby | 54 |
| 4.4.4 | Rozdíly v aktivitě zvířat po přestlání dle pohlaví | 58 |
| 4.4.5 | Nezvyklá aktivita zvířat v chovné nádobě před výskytem zranění a úhynů v průběhu pokusu..... | 58 |
| 4.4.6 | Změny lokalizace toalety a hnízda v chovné nádobě..... | 61 |
| 5 | Diskuze | 64 |
| 5.1. | Vliv DVC systému na frekvenci přestýlání..... | 64 |
| 5.2. | Vliv různých intervalů výměny podestýlky na welfare a zdraví zvířat..... | 65 |
| 5.2.1 | Interval přestýlání chovných nádob | 65 |
| 5.2.2 | Průměrná aktivita zvířat v průběhu 24 hodin | 66 |
| 5.2.3 | Aktivita zvířat po přestlání chovné nádoby | 67 |
| 5.2.4 | Frontalita a lokalizace toalety v chovné nádobě | 67 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.2.5 | Nezvyklá aktivita zvířat v chovné nádobě před výskytem zranění a úhynu | 68 |
| 6 | Závěr a doporučení pro praxi..... | 70 |
| 7 | Seznam použité literatury | 72 |
| 8 | Seznam obrázků | 79 |
| 9 | Seznam grafů | 80 |
| 10 | Seznam tabulek | 82 |
| 11 | Seznam použitých zkratk..... | 83 |
| 12 | Příloha - publikace | 84 |

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 „výtežností“ 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.

Tato práce má za cíl vyhodnotit potenciální zdravotní rizika, která DVC mohou zvířatům přinést, a zároveň vyhodnotit efektivitu využití tohoto systému v běžném chovu laboratorních myší.

1 Literární přehled

1.1. Laboratorní myš jako pokusné zvíře

1.1.1 Charakteristika myši

Myši (*Mus musculus*) patří do řádu *Rodentia*, čeledi *Muridae*, rodu *Mus*. Myši jsou významnými a nejlépe biologicky a geneticky charakterizovanými laboratorními zvířaty (Johns Hopkins University, 2022). Nejstarší záznamy o vědeckém použití myši sahají do roku 1664, kdy Robert Hooke sledoval vliv zvýšení tlaku vzduchu na jejich biologii (Hedrich a Bullock, 2004). V 19. století byly využívány k šlechtění dle barvy srsti a sledování mendelistické dědičnosti (Johns Hopkins University, 2022, Tucker, 2007). V průběhu 20. století pak došlo k vytvoření inbredních a outbredních kmenů, které v dalších vědeckých pracích vedly k významnému rozvoji boje proti onemocněním, za které bylo uděleno několik Nobelových cen, a to v oblasti imunologie, genetiky a biologie (Hedrich a Bullock, 2004, Tucker, 2007). Mezi nejvíce používané inbrední myši kmeny patří C57Bl/6, BALB/c, C3H, mezi outbrední pak ICR (Lawson, 2010, Johnson, 2012).

Myši mají charakteristickou stavbu těla s různobarevnou krátkou srstí a dlouhým bezsrstým ocasem. Na hlavě jsou typické vztyčené a zakulacené uši, vystupující oči a zašpičatělý nos s hmatovými chlupy. Každá ze čtyř končetin má pět prstů, ale první prst na hrudních končetinách je zakrslý. Typický zubní vzorec obsahuje v horním i dolním zubním oblouku 2 hypselodontní řezáky a 3 páry stoliček (Moore, 2000, Treuting a Dintzis, 2012).

1.1.2 Myši v experimentech

Myši jsou, dle statistických údajů Ministerstva zemědělství, po rybách druhým nejvíce využívaným živočišným druhem ve vědě v České republice (MZe, 2022). Jejich velký podíl na vědeckém výzkumu je dán především vysokou podobností s člověkem v oblasti anatomie, fyziologie, ale hlavně genetiky. V průměru jsou proteiny kódující oblasti myšního a lidského genomu identické z 85 %, některé (evolučně konzervované) geny jsou identické dokonce z 99 %. Díky tomu jsou výborným zdrojem informací při zjišťování příčin či léčení nemocí člověka (Maxwell, 2016, YourGenome, 2022). S genomem myši je možné poměrně snadno manipulovat a navodit tak fenotyp podobný lidskému onemocnění (Lawson, 2010).

Myši jsou využívány zejména i pro svou malou velikost, nízké náklady na chov a brzkou pohlavní zralost (již 6 týdnů od narození) spojenou s vysokou rozmnožovací schopností. Jejich výhodou je také krátký životní cyklus (maximální dožití do 2 let věku) umožňující vědcům senescenční studie (Lawson, 2010, YourGenome, 2022).

1.1.3 Rozdělení myší dle mikrobiální kolonizace

Laboratorní myši lze dle rozsahu mikroorganismů, které je u zvířat potřeba sledovat, na gnotobiotická, specifických patogenů prostá (SPF) a konvenční (Carter, P. B. et al., 2020).

Gnotobiotická zvířata

Za gnotobiotická zvířata se považují zvířata, která nesou známé a definované mikroorganismy (Basic a Bleich, 2019). Běžná gnotobiotická myš není kolonizována mikroorganismy nebo obsahuje přesně definovanou bakteriální mikroflóru, kterou byla cíleně osídlena perorálním podáním. Podané bakterie pomáhají překlenout některé digestivní problémy doprovázející chov axenických zvířat. Gnotobiotická zvířata se získávají hysterektomií nebo embryotransferem, následně musí být chována ve sterilním prostředí, které je chrání před nežádoucí kontaminací (Heine et al., 1998, Hedrich a Bullock, 2004, Lawson, 2010). Gnotobiotická zvířata se v průběhu let stala důležitým nástrojem ke studiu komplexních mikrobiotických interakcí v organismu (Basic a Bleich, 2019).

Axenická zvířata

Axenická (*germ free*) nebo také bezmikrobní zvířata jsou prostá všech detekovatelných mikroorganismů. Jsou získávána císařským řezem v přísných aseptických podmínkách nebo nověji i embryotransferem. Aby nedošlo ke kontaminaci mikroorganismy, musí být zvířata chována v prostoru zamezujícím přímému kontaktu s vnějším prostředím a zároveň je nutné veškeré materiály, které mají přijít se zvířaty do přímého kontaktu, sterilizovat. To platí i pro krmivo, vodu, ale i vzduch. Zvířata zůstanou bezmikrobní pouze tak dlouho, jak dlouho se podaří je udržet ve sterilním prostředí (Lawson, 2009, Lawson, 2010, Asmakh a Zadjali, 2015). K zajištění *germ free* statusu je třeba zvířata pravidelně monitorovat na případnou kontaminaci mikroby za pomoci všech dostupných mikrobiologických a diagnostických technik (Nicklas et al., 2015). Absence mikroorganismů vede u myší k morfologickým změnám jejich organismu. Pro *germ free* zvířata je typické zvětšené

slepé střevo, celková nižší tělesná hmotnost, méně vyvinuté tenké střevo s pomalejší peristaltikou a redukovanou obnovou epiteliálních buněk (Asmakh a Zadjali, 2015). To je příčinou špatného vstřebávání a využití živin, spojeného s častými zažívacími problémy (Lawson, 2009, Lawson, 2010). Proto je nezbytné obohacovat krmivo vyššími dávkami vitamínu B a K, které si tato zvířata nemohou přirozeně syntetizovat pomocí střevní mikroflóry (Hedrich a Bullock, 2004, Asmakh a Zadjali, 2015).

Specifických patogenů prostá zvířata

Specifických patogenů prostá neboli SPF zvířata je třeba odlišit od gnotobiotických zvířat. Zatímco u gnotobiotických zvířat jsou definovány mikroorganismy, které jsou ve zvířeti přítomny, u SPF zvířat je tomu naopak, známe pouze mikroorganismy, které ve zvířeti nejsou přítomny. U SPF jedinců je ale vždy nutné dodatečně upřesnit seznam mikroorganismů, kterých jsou zvířata prostá (Hedrich a Bullock, 2004). Kromě vyspecifikovaného seznamu mohou být zvířata nositeli všech ostatních nevyjmenovaných mikroorganismů a mají komplexní a nedefinovaný mikrobiom (Lawson, 2010, Basic a Bleich, 2019). Seznam specifických patogenů se může lišit mezi zařízeními nebo dodavateli (Lawson, 2010). Měl by však obsahovat hlavní patogeny pro daný druh zvířat, zoonózy a mikroorganismy ovlivňující výsledky pokusů.

SPF zvířata se dříve získávala císařským řezem, dnes se nejčastěji používá embryotransfer, což je přenos embrya do dělohy SPF matky. K zabránění kontaminace nežádoucími mikroorganismy musí být zvířata chována v zařízení s dostatečným systémem dekontaminace vstupních materiálů, vzduchu a personálu. Nejčastěji se k této ochraně zvířat využívají bariérové chovy nebo izolátory, ale SPF zvířata lze, při správném dodržení postupů, úspěšně chovat i v IVC systémech (individuálně ventilovaných klecích) a izolátorech mimo bariéry (Heine et al., 1998, Hedrich a Bullock, 2004).

Konvenční zvířata

Laboratorní zvířata nazývaná konvenční jsou zvířata, jejichž mikrobiologický status není znám a nelze jejich mikroflóru specifikovat. Mohou být také nositeli patogenů. V případě použití takového zvířete v experimentu může být jeho výsledek těmito patogeny ovlivněný, ačkoliv jsou jinak zvířata klinicky zdravá (Heine et al., 1998, Hedrich a Bullock, 2004). Tato zvířata jsou většinou chována v zařízeních bez

jednoznačné ochrany a omezení kontaktu s mikroorganismy z prostředí (Lawson, 2009), s minimálním zabezpečením před kontaminací infekčními agens (Hedrich a Bullock, 2004). Konvenční zvířata jsou relativně levná na produkci a chov a často jsou využívána při výuce a experimentech, u nichž nehrozí, že by výsledek pokusu byl ovlivněn přítomnými mikroorganismy. Naopak nevhodná jsou pro použití například v imunologických studiích (Lawson, 2009).

1.2. Chovné systémy a chovné technologie pro myši

Úroveň ochrany zdraví laboratorních myši vždy záleží na zvolené strategii a potřebách daného vědeckého pracoviště. Dle toho lze chov myši rozdělit do tří základních kategorií: otevřený, bariérový a izolátorový (Jebavý et al., 2014). V rámci každé kategorie pak lze použít různé technologie pro chov myši podle aktuálních potřeb ochrany zvířat před kontaminací nebo šířením případných infekcí.

1.2.1 Chovné systémy

Otevřený systém

Otevřený systém chovu laboratorních zvířat je vysoce rizikový na mikrobiální kontaminaci zvířat a výsledky vědecké práce je pak třeba kriticky zhodnotit (Heine et al., 1998). Tento systém chovu nemá žádná speciální opatření k oddělení čisté a špinavé části. Má minimální požadavky na procedury související se vstupem personálu a zpravidla není požadována ani předchozí dekontaminace materiálu před vstupem do chovu. Nicméně určitá míra ochrany, např. zavedením adekvátního toku vzduchu, respektive přetlaku, je vhodná alespoň k minimální ochraně prostředí před šířením infekčních mikroorganismů, které se jinak v chovných místnostech a přilehlých chodbách nutně mísí s čistým materiálem. Ze stejného důvodu by měl personál nosit oblečení určené pouze pro prostory chovu včetně rukavic a roušky. Krmení a voda mají být pro zvířata mikrobiologicky nezávadné, ne však nutně sterilní. Totéž platí pro chovné vybavení, které je třeba pravidelně čistit a dezinfikovat, ale není nutné ho sterilizovat (Lawson, 2009, Hau a Schapiro, 2011).

Bariérový systém

Bariérové systémy chovu zvířat jsou vždy rozděleny na tzv. čistou a špinavou část, které od sebe vzájemně odděluje bariéra. Bariéra je tvořena souborem stavebně-

konstrukčního a technologického vybavení, ochranných prostředků a pracovních postupů, jejichž společným znakem je snižování rizika kontaminace lidí, zvířat, materiálů a prostředí v bariérových chovech (Lawson, 2009, Jebavý et al., 2014). Schéma bariérového systému je vyobrazeno v Obr. 1.1.

Podstatou bariérového systému chovu zvířat je snaha v maximální možné míře dekontaminovat veškeré materiály, krmivo, vodu, vzduch a osoby před vstupem do čisté části. Termostabilní materiály se dekontaminují v prokládacích autoklávech při vysokých teplotách (121°C – 134°C) a vysokém tlaku po dobu 7 nebo 20 minut v závislosti na zvolené dekontaminační teplotě. Autoklávy se nejvíce využívají k dekontaminaci chovných nádob, krmení, podestýlky nebo vody pro napájení zvířat (Heine et al., 1998, Lawson, 2009, Jebavý et al., 2014, Barnett, 2017). Termolabilní materiály lze při nižších teplotách dekontaminovat chemicky, a to parami vybraných dezinfekčních přípravků, zejména peroxidem vodíku nebo parami chlordioxidu.

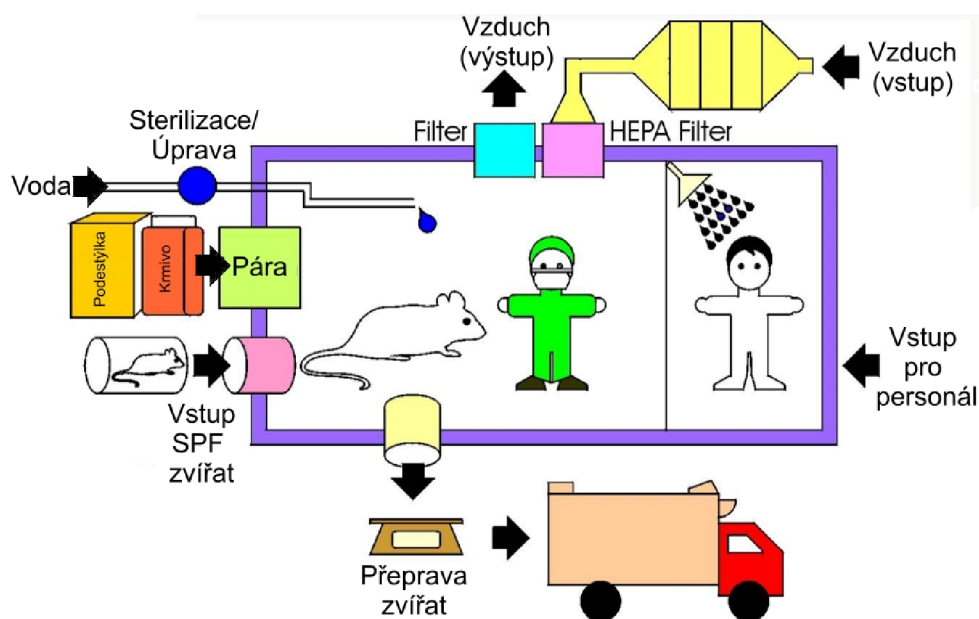
Personál vstupující do čistého prostoru musí projít hygienickou smyčkou. To je v ideálním případě systém tří vzájemně oddělených prostor: špinavé šatny, kde dojde k částečnému nebo úplnému odložení svršků, mokré či vzduchové sprchy a čisté šatny, kde se personál obleče do vysterilizovaného oblečení a obuvi určeného pouze pro pohyb v čistých prostorech. Specifické oblečení se doplňuje o roušku, pokrývku hlavy, případně vousů, a rukavice (Heine et al., 1998, Lawson, 2009, Hau a Schapiro, 2011, Jebavý et al., 2014).

Vzduch nasávaný z vnějšího prostředí je před vstupem do bariérového systému vždy upravován ve vzduchotechnické jednotce. Nejprve je filtrován od hrubých nečistot a následně odvlhčován či zvlhčován, chlazen nebo dohříván v závislosti na venkovních klimatických podmínkách a dle požadavků daného druhu zvířat na teplotu okolního prostředí. Před vlastním vstupem do čistého prostoru je vzduch dočištěn přes HEPA filtry, zachycující částice od velikosti 300 nm. Regulací výměn vzduchu v chovných místnostech a v celém čistém prostoru lze dosáhnout požadovaného kaskádovitého přetlaku a toku vzduchu směrem od nejčistších částí bariérového chovu ke špinavým (Heine et al., 1998, Jebavý et al., 2014).

Vodu určenou pro pití zvířat je možné dekontaminovat několika způsoby v závislosti na použité technologii napájení. Voda se vždy musí nejdříve zbavit mechanických nečistot pomocí hrubých filtrů, ideálně následně změkčit solí. Takto upravenou vodu lze dočistit jemnými filtry o velikosti 0,2 mikronu nebo pomocí reverzní osmózy (Heine et al., 1998). Čistá voda se následně sterilizuje v autoklávu,

UV světlem, anebo se okyseluje na pH 2,5 – 3,0, případně chloruje na hodnoty 6 - 8 ppm volného chloru při pH 5 (Hedrich a Bullock, 2004).

Vstup zvířat do bariéry je podmíněn jejich zdravotním statutem, jejich případnou předchozí izolací a vždy nastává až po kontrole zdravotního stavu. V závislosti na vybavenosti bariéry a servisu na pracovišti lze využít k přenosu zvířat za bariéru metody embryotransferu nebo živých zvířat. Přesun živých zvířat prochází přes komory nebo prokládací boxy s laminárním prouděním vzduchu a vždy je doprovázen souborem dezinfekčních a operačních procedur k zajištění minimalizace přenosu kontaminace do čisté části chovu. Po každém přesunu zvířat je nutné komoru, resp. laminární box dekontaminovat dezinfekcí nebo UV světlem (Heine et al., 1998, Lawson, 2009). Bariérové chovné systémy jsou nejvíce využívány k chovu zvířat, u kterých je nezbytné vyloučit kontaminaci specifickými mikroorganismy. V tomto systému lze zvířata chovat jak v otevřených chovných nádobách, tak v individuálně ventilovaných chovných nádobách (IVC, z anglického *individually ventilated cages*) (Hedrich a Bullock, 2004, Barnett, 2017), které ochranu zvířat a prostředí ještě zvyšují.



Obrázek 1.1: Schéma bariérového systému zjednodušeně popisuje prostorovou organizaci chovu, se schematicky znázorněnými vstupy a výstupy pro personál, chovaná zvířata, vodu, vzduch, krmení a stelivo (převzato a upraveno z Charles River Laboratories Inc.).

Izolátorový systém

Izolátorové systémy, jak už název napovídá, využívají principu fungování izolátorů k izolaci zvířat v přístroji daném prostoru, ať už za účelem ochrany prostředí před potenciální mikrobiální kontaminací od jiných zvířat, nebo nejčastěji k ochraně zvířat před kontaminací z prostředí. Izolátory podobně jako bariérové chovy mají filtrovaný vzduch přes HEPA filtry jak na vstupu do izolátoru, tak na výstupu z něj. Veškerý materiál vkládaný do izolátoru musí být předem vysterilizovaný a bezprostředně před vložením do izolátoru chemicky povrchově dekontaminovaný, a to postřikem vybranými dezinfekčními přípravky nebo například parami peroxidu vodíku. Práce v izolátoru probíhá přes průhlednou stěnu vybavenou integrovanými rukávy, takže personál nepřijde do přímého kontaktu se zvířaty. Izolátory jsou často vybaveny otevřenými chovnými nádobami a představují tak jednu mikrobiologickou jednotku. Izolátorový systém je pro své dobré vlastnosti v ochraně zdraví zvířat hojně využíván pro chov SPF, SOPF nebo gnotobiotických a axenických zvířat (Heine et al., 1998, Hedrich a Bullock, 2004, Carter, P. B. et al., 2020).

1.2.2 Aktuálně používané technologie pro chov myši

Všechny technologie pro chov zvířat musí splňovat minimální požadavky na fyzické a behaviorální potřeby daného druhu. Mít dostatek prostoru pro *enrichment*, sociální aktivity nebo soukromí, aby mohla močit, defekovat, porodit a vychovat mláďata. Musí mít také dostatečný přístup k vodě a krmení, ale také dostatek světla, regulovanou teplotu a vlhkost (Barnett, 2017). Vlastní rozměr technologií a chovných nádob je pak dán velikostí zvířete a je upravován legislativou v poměru hmotnosti zvířete vůči obývané ploše (Lawson, 2010, Vyhláška 419/2012). Specifický výběr technologie je závislý na účelu použití – zejména zda jde o krátkodobé nebo dlouhodobé umístění zvířat, individuální nebo skupinové, resp. sběr klinických nebo metabolických dat (Lawson, 2009).

Otevřené klece

Otevřené nebo také konvenční chovné nádoby se skládají z pevné spodní části, která je překrytá nerezovou mřížkou bránící úniku zvířat. Mřížka zároveň slouží jako zásobník na krmivo, držák na napáječku a umožňuje vizuální kontrolu zvířat (Obr. 1.2) (Lawson, 2010). Otevřené klece se vyrábí z různých materiálů. Mohou být kovové, ale většina je vyrobena z plastů s různou úrovní transparence a odolnosti vůči

mechanickému a chemickému opotřebení při mytí a dekontaminaci. Tento typ klecí se nejvíce používá v provozech s otevřeným systémem chovu, kde je pak snazší monitorovat zdravotní stav zvířat, ale lze je využít i v izolátorech (Heine et al., 1998, Lawson, 2009, Lawson, 2010, Barnett, 2017).



Obrázek 1.2: Otevřená chovná nádoba (zdroj: Tecniplast S.p.A).

Statické mikroizolátory

Statické mikroizolátory jsou otevřené klece s plastovým krytem překrývajícím celou chovnou nádobu včetně nerezové mřížky, krmiva a vody (Obr. 1.3). Víko obsahuje filtr, který umožňuje pasivní výměnu vzduchu v chovné nádobě a udržuje prach a většinu mikroorganismů mimo chovnou nádobu (Hedrich a Bullock, 2004, Lawson, 2010, Hau a Schapiro, 2011). Díky víku je tak snížena prašnost v chovné místnosti včetně rozšiřování mikroorganismů a alergenů, ale také dochází ke zvýšení koncentrace čpavku, oxidu uhličitého a vlhkosti na úrovni zvířat, což může vést ke zdravotním rizikům (Hedrich a Bullock, 2004, Hau a Schapiro, 2011).



Obrázek 1.3: Statický mikroizolátor (zdroj: Tecniplast S.p.A).

Izolátory

Izolátor je plně uzavřená a těsná chovná technologie, ve které se se zvířaty manipuluje pouze přes integrované rukavice (Obr. 1.4). Aktivní výměna vzduchu probíhá přes ventilační jednotku a vzduch je čištěn přes HEPA filtry na vstupu do izolátoru, a také na odvodu vzduchu z izolátoru zpět do chovné místnosti. Pro vstup předem vysterilizovaných a hermeticky uzavřených materiálů je izolátor vybaven propustí, kde je povrch materiálů ještě dekontaminován chemicky (Hedrich a Bullock, 2004, Hau a Schapiro, 2011, Basic a Bleich, 2019). Izolátory mají díky svému uzavřenému prostředí široké možnosti využití ať už pro chov gnotobiotických nebo SPF zvířat, respektive při nastavení izolátoru do režimu podtlaku, tak také pro chov infekčních a zdravotně rizikových zvířat (Hedrich a Bullock, 2004, Hau a Schapiro, 2011).



Obrázek 1.4: Izolátor (zdroj: Class Biologically Clean Ltd).

Individuálně ventilované chovné nádoby (IVC)

Individuálně ventilované chovné nádoby (*individually ventilated cages*, dále jen IVC) jsou uzavřené nádoby vsazené do stojanů s filtrovaným a regulovaným přívodem a odtahem vzduchu, které díky zvýšené výměně vzduchu uvnitř chovné nádoby rychleji vysouší podestýlku a snižují tak hladinu čpavku, a tím mohou celkově zkrátit interval výměny chovných nádob (Hedrich a Bullock, 2004, Barnett, 2017).

Každá chovná nádoba má plastovou transparentní spodní část, nerezovou mřížku s krmítkem a transparentní plastové víko, které uzavírá chovnou nádobu (Obr. 1.5). Cirkulace vzduchu v chovné nádobě je zajištěna přívodem vzduchu v úrovni zvířat, anebo kombinací přívodu a odtahu vzduchu integrovanými do víka nádoby. Vlastní víko nádoby má u novějších typů již integrovaný mikrobiologický filtr umožňující lepší výměnu vzduchu a ochranu zvířat v případě výpadku proudu a nucené ventilace.

Vlastní chovná nádoba je vsazena do IVC stojanu, skrze který je napojena na ventilační jednotku. Nejčastěji je ventilační jednotka uvnitř místnosti a zásobuje až čtyři IVC stojany vzduchem nasávaným z místnosti, pročištěným přes HEPA filtry. Vzduch, který je odsávaný z chovné nádoby, opět prochází filtrací přes HEPA filtry a následně je vypouštěn buď do prostoru chovné místnosti, nebo je napojen na odtahové potrubí vzduchotechnické jednotky (Hedrich a Bullock, 2004). IVC chovné nádoby včetně IVC stojanů je možné sterilizovat autoklávováním, IVC jednotky pak lze dekontaminovat například pomocí par peroxidu vodíku.

Díky svým vlastnostem a schopnosti chránit mikroprostředí na úrovni chovné nádoby se IVC systémy používají v chovných a experimentálních prostorech, kde je třeba podpořit ochranu zvířat před vnější kontaminací. K tomu napomáhá možnost nastavení pozitivního tlaku (tzn. přetlaku) uvnitř chovné nádoby. Chovné nádoby s nastaveným negativním tlakem (tzn. podtlakem) jsou naopak využívány k ochraně prostředí před kontaminací mikroorganismy od chovaných zvířat a používají se nejčastěji v karanténních chovech a izolacích zvířat, nebo při práci s infekčními materiály.

Nedílnou a neméně důležitou součástí chovu experimentálních myší v IVC systému a udržení ochrany před vnější kontaminací je také proces výměny chovných nádob. Nezbytnou součástí IVC systému je proto tzv. přestýlací laminární box. Tento box vytváří pracovní plochu chráněnou laminárním prouděním vzduchu očištěného přes HEPA filtr. Po otevření víka IVC chovné nádoby v kombinaci se správným pracovním postupem a vhodnou dezinfekcí zajišťuje kontinuální ochranu zvířat, resp. okolí (Hedrich a Bullock, 2004). Dle Hedrich a Nicklas (2012) je problémem tohoto systému monitoring zdravotního stavu chovaných zvířat. Zvířata lze testovat individuálně, avšak potenciální velké množství testovaných zvířat je neekonomické. Proto se provádí především nepřímé testování, prostřednictvím sentinelů.



Obrázek 1.5: Individuálně ventilovaná chovná nádoba typ GM500 (zdroj: Tecniplast S.p.A).

Digitálně ventilovaná klec (DVC)

Digitální ventilované chovné nádoby (*digitally ventilated cage*, dále jen DVC) představují novou technologii navazující na IVC chovné nádoby typu GM500, Tecniplast (Obr. 1.5). Ačkoliv název evokuje digitalizaci chovné nádoby, jedná se primárně o digitalizaci IVC stojanu a prostoru kolem chovné nádoby (Obr. 1.6), tak aby mohlo být kontinuálně monitorováno prostředí chovné nádoby bez potřeby vnějšího zásahu. V DVC stojanech je pod každou chovnou nádobou umístěna tzv. DVC monitorovací deska (*DVC board*). Tato deska je vybavená 12 elektrodami zalitými do pryskyřice. Každá z elektrod vytváří mírné elektromagnetické pole, které měří kapacitní odpor všech materiálů, včetně zvířat vložených nad povrch desky, to znamená na dno chovné nádoby, a to s frekvencí čtyřikrát za sekundu (Goltstein et al., 2018, Pernold et al., 2019, Recordati et al., 2019). Díky tomu dochází ke kontinuálnímu automatickému měření nejen aktivity zvířat uvnitř chovné nádoby, ale také změn ve vlhkosti podestýlky (Pernold et al., 2019).

Kromě DVC desky je chovná nádoba monitorována z více pozic, a to díky dalším senzorům. V lištách po obou stranách chovné nádoby jsou umístěny infračervené detektory na úrovni umístění lahve a hladiny vody v lahvi, určené k detekci přítomnosti lahve a jejího naplnění. Další senzory jsou umístěny v zadní části chovné nádoby na úrovni krmítka a jsou určené k detekci přítomnosti krmiva. Poslední senzor

je nad víkem chovné nádoby a detekuje přítomnost konkrétní chovné nádoby v konkrétní pozici stojanu. Díky tomuto senzoru lze chovnou nádobu identifikovat, zjistit či přiřadit všechny potřebné údaje o kleci a zvířatech v ní umístěných. Tyto údaje se pak sbírají a automaticky analyzují v programu dodávanému výrobcem.

Přes dodávaný software systém DVC komunikuje s uživatelem, automaticky poskytuje alarmová hlášení ze senzorů, například o chybějící láhvi, nízké hladině pitné vody v láhvi nebo nedostatečném množství krmení. DVC systém, podle informací z DVC desky a nastavení systému uživatelem, denně identifikuje chovné nádoby, které je nutné přestlat z důvodu zvýšené vlhkosti podestýlky. Také informuje ošetřovatele o nezvyklé aktivitě zvířat, čímž upozorňuje na případně zranění, úhyn nebo onemocnění zvířete (Tecniplast, 2010). Monitoring všech těchto parametrů je důležitý pro rychlost reakce ošetřovatelů na případný diskomfort zvířat a tím i pro jejich celkový welfare.



Obrázek 1.6: Pozice pro chovnou nádobu v DVC stojanu s deskou na monitoring aktivity zvířat a vlhkosti podestýlky a postranními elektrodami (zdroj Tecniplast S.p.A).

1.3. Hygiena chovu a faktory ovlivňující zdraví myši

Zdravotní rizika jsou vždy ovlivněna metodikou chovu zvířat, způsobem ochrany prostředí, typem ustájení a frekvencí přestýlání chovných nádob. DVC jsou ve své podstatě technologickou nadstavbou dnes již běžně používaných IVC klecí. S novou technologií dochází ke změně pracovních návyků a vzniku nových neprozkoumaných vlivů na zdraví zvířat, kdy jakékoliv narušení standardního prostředí se může projevit

zvýšeným záchytem nežádoucích mikroorganismů ve zvířatech, zvýšeným výskytem klinických nebo histopatologických příznaků onemocnění, narušením welfare, zvýšeným stresem, sníženou porodností nebo také sníženým počtem narozených a odchovaných mláďat (Heine et al., 1998, Heffner a Heffner, 2007, Castelhana-Carlos a Baumans, 2009, Lawson, 2010, National Research Council, 2011, Turner, 2020).

1.3.1 Výživa a napájení

Kvalita krmiva

Základním předpokladem zachování zdraví zvířat je použití krmiva před datem expirace. Krmivo musí být skladováno daleko od tepelných zdrojů, případně dle složení krmiva i v chladicích boxech. Před vlastním zkrmením je také nutná kontrola balení na přítomnost kondenzované vody (Fridland, 2008). V současných chovech pokusných zvířat se používají převážně druhově specifická krmiva s recepturami pokrývajícími všechny nutriční nároky zvířete tak, aby nebylo nutné přidávat doplňková krmiva (Heine et al., 1998). V konvenčních chovech se používá krmivo pasterizované, v SPF chovech a chovech gnotobiotických zvířat se krmivo před podáním sterilizuje radiací (gamma zářením 25 kGy) nebo autoklávováním. Ve druhém případě je krmivo před podáním dodatečně obohaceno o termolabilní vitamíny a aminokyseliny (Hedrich a Bullock, 2004).

Kvalita vody

K napájení zvířat se nejčastěji používá voda z vodovodního řadu, která sice již obsahuje díky chloraci nižší podíl mikroorganismů, ale k napájení SPF nebo gnotobiotických zvířat je tuto vodu třeba ještě ošetřit filtrací přes jemné filtry nebo reverzní osmózou. Takto upravenou vodu je možné dále sterilizovat UV světlem nebo autoklávováním (Heine et al., 1998). V případě, že je cílem zabezpečit zdravotně nezávadnou vodu po více dnů, je nutné vodu okyselit na pH 2,5 – 3, nebo chlorovat na hodnotu 6-8 ppm při pH 5 (Hedrich a Bullock, 2004). Takto upravenou vodu lze v napájecích lahvích nechat i 7 dnů.

1.3.2 Mikro a makroklima prostředí

Teplota a vlhkost

Teplota a vlhkost jsou základními parametry k vyhodnocování vhodnosti prostředí pro chov zvířat. Příliš velké teplo nebo naopak příliš velká zima vedou ke stresu zvířete a

ke zdravotním komplikacím. Obě veličiny se musí přizpůsobit druhu zvířete, věku, vývojovému stádiu, typu osrstění nebo proběhlým pokusným úkonům (Lawson, 2010, National Research Council, 2011). Přestože se termoneutrální zóna u myši pohybuje v rozmezí 26°C – 34°C, jsou standardem pro chov myši teploty v rozmezí 20°C – 24°C. Rozdíly teploty si však myši dokáží regulovat, pokud mají v chovné nádobě možnost postavit si hnízdo (obohacené prostředí) (Gaskill et al., 2011, National Research Council, 2011).

Vlhkostí je míněno množství vodných částic ve vzduchu. Vlhkost vzduchu by se měla pohybovat v rozmezí 30 - 70 %. Dlouhodobá nízká vlhkost může vyvolávat zdravotní komplikace respiračního traktu nebo poškození kůže u potkanů tzv. *ring-tail*. Vysoká vlhkost zase může vést ke vzniku kožních plísni (Lawson, 2010, National Research Council, 2011).

Podestýlka

Jako stelivo se pro laboratorní zvířata používají materiály, které mají dobré absorpční schopnosti, jsou dobře sterilizovatelné, bezprašné, bez zápachu, bez škodlivých chemických látek a ideálně použitelné i jako materiál k přirozené potřebě stavění hnízd. Nízká prašnost podestýlky snižuje celkovou prašnost v chovné místnosti a tím i potenciální rozšiřování suchých exkrementů a mikroorganismů, ale také iritaci a záněty sliznic u chovaných zvířat. Nejčastěji se používá měkké dřevo o různých velikostech štěpky, v zahraničí pak kukuřičná drť nebo produkty z celulózy. Dřevěné hobliny nebo jiné pozůstatky z pil nejsou vhodné pro velmi ostré hrany, jemné mechanické částice a chemické látky, které mohou dráždit sliznice chovaných zvířat (Heine et al., 1998, National Research Council, 2011, Barnett, 2017).

Intervaly výměny podestýlky

Metoda, interval a intenzita výměny podestýlky v chovných nádobách je daná fyziologií zvířat a jejich charakteristickým chováním, velikostí chovné nádoby, a hlavně podle jejich linie, pohlaví, věku a jejich počtu. Také záleží na podmínkách okolního prostředí, na druhu použité podestýlky a na množství výměny vzduchu v chovné nádobě. Minimální frekvence výměny podestýlky není dána a pohybuje se mezi denními až čtrnáctidenními intervaly (National Research Council, 2011). Příliš častá výměna podestýlky vede u myši k chronickému stresu, snižování tělesné hmotnosti a k vyššímu úhynu mláďat (Burn et al., 2006). Naopak dlouhé intervaly

mezi výměnami vedou ke zvýšenému množství čpavku a bakteriální zátěže zvířat (Ulfhake et al., 2021).

V mnoha chovných zařízeních je proto běžným standardem výměna podestýlky v chovné nádobě jednou za 7 dní. Tato frekvence výměny se běžně používá u otevřených chovných nádob a takzvaných mikroizolátorových chovných nádob. Cílem je udržet požadovanou úroveň zdraví zvířat ve vhodném mikroprostředí chovné nádoby, a to při minimálním stresu zvířete (Rosenbaum et al., et al., 2009). Je tedy nevyhnutné udržet vlhkost podestýlky a relativní vlhkost uvnitř chovné nádoby na takové úrovni, aby zamezovala růstu bakterií produkujících ureázu (Gamble a Clough, 1976, Serrano, 1971, Potgieter a Wilke, 1996) a nepřekračovala hladinu čpavku, která by již mohla dráždit mukózní membránu sliznic zvířete (National Research Council, 2011, Ulfhake et al., 2021). U IVC chovných nádob, které mají konstantní nucenou výměnu vzduchu uvnitř chovné nádoby, tím pádem snazší vysoušení podestýlky a nižší hladinu čpavku, se běžně prodlužuje interval výměny podestýlky až na čtrnáct dní (Hedrich a Bullock, 2004, Schondelmeyer et al., 2006, National Research Council, 2011).

Variabilní prostředí a metody chovu laboratorních zvířat mohou ovlivnit fyziologii a chování zvířat. Například pomocí behaviorálních testů bylo zjištěno, že přestýlání zvířat, samotná manipulace se zvířetem včetně jeho přesunu do čisté nebo špinavé chovné nádoby, vede k přechodnému zvýšení kortikosteronu v krevním séru a výskytu úzkostného chování (Rasmussen et al., 2011). Mnoho studií již prokázalo vztah mezi výměnou chovné nádoby a vznikem stresu u hlodavců (Hurst, 1993, Reeb-Whitaker et al., 2001, van Loo et al., 2004). Proto byla také dříve výměna chovných nádob u myši používána k cílenému vytvoření hypertenzního stresu (Morimoto et al., 1991, Watanabe et al., 1999). Důvodů vzniku stresu zvířat při přesunu do nové chovné nádoby je několik: i) absence feromonu, který myši používají při udržování hierarchie ve skupině; ii) světelná fáze dne při přestýlání, kdy jsou zvířata rušena v klidovém režimu; iii) vlastní metoda přestýlání. Reakcí na stres je obecně zvýšená aktivita, agresivita a souboje (van Loo et al., 2000, Rosenbaum et al., 2009). U samic je to pak snížená chovatelská výkonnost, vyšší mortalita mláďat nebo kanibalismus (Reeb-Whitaker et al., 2001, Burn et al., 2008). Z těchto důvodů je nutné adekvátně přizpůsobit termín a tedy i interval přestýlání chovných nádob podle naplánovaných pokusů tak, aby tato rutina měla pokud možno co nejmenší negativní vliv na celkovou pohodu zvířat (Rasmussen et al., 2011, Rosenbaum et al., 2009).

Ventilace

V chovných místnostech by mělo být za účelem snížení akumulace odpadních plynů (zejména oxidu uhličitého a čpavku) zajištěné dostatečné provětrávání místnosti 10 – 15násobnými výměnami objemu vzduchu místnosti za hodinu (Heine et al., 1998, Lawson, 2010, National Research Council, 2011). Vhodná ventilace místnosti také vede k odvětrávání mikroorganismů, zlepšuje regulaci teploty a vlhkosti v chovných prostorech. Snaha o standardizaci prostředí v chovech hlodavců vedla k vytvoření IVC chovných nádob, kde je ventilace na úrovni jedné nádoby a není tolik ovlivněna úrovní ventilace celé místnosti (Lawson, 2010). Rychlost proudění vzduchu v IVC chovné nádobě, tedy na úrovni zvířat, by neměla přesáhnout 0.2 m/s (Heine et al., 1998).

Zvuky a vibrace

Zvuky a vibrace jsou jednoznačným stresovým faktorem zvířat a je obtížné je z prostředí úplně eliminovat. Oba faktory je však nezbytné co nejvíce omezit, aby nedocházelo ke snižování chovatelské výkonnosti, k hormonální dysbalanci nebo zraněním. Slyšitelné zvukové rozmezí zvířat je odlišné od lidského a liší se i mezi jednotlivými druhy zvířat (Heffner a Heffner, 2007, Lawson, 2010). V chovech hlodavců je nutné se vyvarovat používání přístrojů nebo světel emitujících ultrazvuk a celkovou hladinu hluku držet pod úrovní 60 – 70 dB (Heine et al., 1998, Turner, 2020). Podobné je to s vibracemi, kdy vibrace z přístrojů člověkem vnímány jako jemné mohou u zvířat vyvolat silný stres. Proto by se neměla překračovat hladina 0.025 g. Zvýšené hladiny hluku a vibrací tedy vedou k narušení welfare zvířat a tím ke zvýšení variability vědeckých výsledků (Lawson, 2010, Turner, 2020).

Osvětlení

Světelný režim v některých chovných zařízeních není regulovaný. Přirozené denní světlo ze slunečního svitu určuje cirkadiální rytmy chovaných zvířat bez umělého osvětlení. V bariérových chovech a v zařízení, kde záleží na minimalizaci vlivu prostředí na pokusy, je nutné použít umělé osvětlení se střídáním fáze dne a noci, obvykle v poměru 12 h svitu: 12 h tmy nebo 14 h svitu: 10 h tmy (Castelhano-Carlos a Baumans, 2009, Lawson, 2010). Intenzita umělého pracovního osvětlení by se měla pohybovat v hodnotách 300 – 450 lx, měřeno 1 m nad úrovní podlahy. Chovné nádoby v horních řadách by měly být chráněny před vyšší intenzitou světla. Albinotická

zvířata by měla mít intenzitu osvětlení pod hodnotou 40 lx (National Research Council, 2011), resp. 60 lx (Heine et al., 1998, Castelhana-Carlos a Baumans, 2009), aby nedocházelo k patologickému poškození retiny a zvýšené aktivitě endokrinních orgánů (Heine et al., 1998, National Research Council, 2011).

Vůně a pachy

Myši mají velmi citlivý olfaktorický systém, který používají k rozpoznání prostředí a komunikaci s ostatními jedinci. Výměna podestýlky za čistou, tedy bez pachových stop, tak může vést ke stresu a následné agresivitě z neznámého prostředí nebo potřebě reorganizovat hierarchie ve skupině (van Loo et al., 2000, Burn et al., 2006, Rosenbaum et al., 2009). Dále také platí, že ošetřující personál, ale i vědečtí pracovníci se musí vyvarovat používání parfémů, kosmetických přípravků a chemických látek se silnou vůní (Lawson, 2010).

Elektromagnetické pole

Elektrické pole je definováno přítomností elektrického napětí. Magnetické pole je tvořeno elektrickým proudem. Elektromagnetické pole (EMP) vzniká spojením a vzájemným ovlivňováním elektrického a magnetického pole (internetový zdroj EMFS). Zvýšené používání moderních technologií a tím také častější expozice živých organismů elektromagnetickému poli vyústilo v diskuzi o potenciálním terapeutickém využití, jelikož naznačovalo, že EMP může mít biologické účinky (SCENIHR, 2015, Vadala et al., 2015, Vadala et al., 2016).

DVC je vybaveno bezdrátovou technologií, která využívá velmi nízkou intenzitu elektromagnetického pole rozprostřeného na ploše 500 cm², přičemž celková spotřeba elektrické energie v jedné desce je přibližně 250 mW (Recordati et al., 2019).

Recordati et al. (2019) uvádí, že v chovných místnostech je za normálních okolností několik potenciálních zdrojů EMP, například zásuvky, světla, laminární boxy nebo internetový Wi-Fi signál. DVC deska umístěná těsně pod chovnou nádobou, tedy v nejbližším kontaktu se zvířaty, vyzařuje EMP o frekvenci 5 Hz – 3 GHz naměřeno ve výšce 2,55 cm nad deskou. V průběhu roční expozice EMP obou pohlaví myši kmene C57Bl/6NCrl v DVC nebyly zjištěny žádné klinické příznaky ani zvýšená mortalita. Žádné významné rozdíly neodhalilo ani patologické, hematologické a histopatologické vyšetření exponovaných jedinců. Burman et al.

(2018) tato tvrzení doplňuje o behaviorální testy (chování související s úzkostí a kognicí) a dodává, že nenalezl signifikantní vliv EMP na chování a welfare zvířat.

1.4. Zdravotní rizika způsobená vnějším prostředím

Onemocnění lze definovat jako stav, který narušuje životní pohodu zvířat. Lze je dělit na infekční – způsobená mikroorganismy a lze je přenést na jiná zvířata, a neinfekční – způsobená vlivem vnějšího či vnitřního prostředí (Lawson, 2009, Barnett, 2017). Obecně můžeme neinfekční nemoci rozdělit na nemoci způsobené nutričním nedostatkem, dědičná onemocnění a kongenitální onemocnění, která nemusí být dědičná – jako např. kosterní deformity způsobené nedostatkem živin, expozicí chemickým látkám v průběhu gravidity nebo degenerativní onemocnění spojená s věkem zvířete. Mezi nejčastější neinfekční nemoci myši patří: alopecie, vykusování srsti (tzv. *barbering*), tumory, záněty spojivek, dermatitidy, dystokie, malokluze, kruhovitě nekrózy ocasu (tzv. *ringtail*), traumatická zranění z bojů nebo o *enrichment* v chovné nádobě, sebepoškozování a jiné behaviorální poruchy (Lindsey et al., 1991, Lawson, 2009, Winnicker et al., 2012). Onemocnění jsou kromě typických příznaků často doprovázena kombinací projevů nemocnosti, jako je neobvykle nahrbený postoj, naježená a neupravená srst, absence pohybu či agresivita, stranění se ostatních zvířat ze skupiny a porucha příjmu potravy a vody (Winnicker et al., 2012, Barnett, 2017).

Každodenní monitorování zdravotního stavu zvířat a kontrola podmínek prostředí je vyžadována podle Zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Přesto může dojít ke zvýšenému stresu, který často vznik onemocnění doprovází. Z vnějšího prostředí mohou stres vyvolat například zvuky, vibrace, přeprava zvířat, nuda, vysoké počty zvířat v chovné nádobě nebo v místnosti. Mezi experimentální a chovatelské příklady vyvolání stresu řadíme také výměnu podestýlky, náhlou změnu diety nebo špatnou manipulaci se zvířaty (Barnett, 2017).

2 Hypotéza a cíle práce

Využití nových technologií má většinou za účel usnadnit či zefektivnit práci, snížit provozní náklady a zvýšit senzitivitu záchytu mimořádných událostí. To všechno umožňuje nová technologie, provádějící kontinuální monitoring chovné nádoby. Otázkou však zůstává, jak tato technologie pozitivně či negativně ovlivňuje stres, welfare a tedy i zdraví zvířat, při dlouhodobějším používání. Dle literatury dlouhodobé vystavování zvířat EMP nemá žádný negativní vliv na jejich zdraví. Bylo také zjištěno, že intervaly výměny podestýlky v IVC mezi 7 – 14 dny nemají vliv na zvyšování hladiny čpavku a zvířata to negativně neovlivňuje.

Hypotézou této práce je, že DVC systém umožní prodloužit interval výměny podestýlky i na několik týdnů, v závislosti na individuálních standardech jednotlivých chovných zařízení. Tento předpoklad je ale přímo závislý na dostatečné aktivní výměně vzduchu v chovných nádobách. Není jasné, zda standardně výrobcem nastavená výměna vzduchu v chovných nádobách bude při intervalech přestýlání převyšujících čtrnáct dní ještě dostačující a nebude se tak v chovné nádobě zvyšovat vlhké prostředí vystavené většímu objemu exkrementů a moči a s největší pravděpodobností také větší koncentraci čpavku. To by pak mohlo vést k většímu stresu pro zvířata a ovlivňovat jejich denní aktivitu. Na druhou stranu by mohl delší interval mezi přestláním chovných nádob, a tedy i delší interval v narušení sociálního prostředí vést ke snížení stresu a zklidnění zvířat, a tím i k zlepšení jejich welfare a celkových chovatelských výsledků.

Tato studie si tedy klade za cíl:

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.

3 Materiály a metodika

3.1. Experimentální zvířata a prostředí

3.1.1 Experimentální zvířata

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/6J01aHsd dodaných ve věku 6 - 8 týdnů.

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

Vlastní práce se zvířaty v průběhu studie nenaplňovala podmínky pro podání žádosti o schválení projektu pokusů příslušnému státnímu orgánu ke schvalování projektů pokusů.

3.1.2 Výživa a napájení zvířat

Zvířata byla krmena dietou Altromin 1314 Forti (Altromin Specialfutter GmbH & Co. KG, Německo) sterilizovanou v autoklávu a napájena chlorovanou vodou čištěnou reverzní osmózou (Waterfilter s.r.o., Česká Republika), a to v průběhu první a druhé části studie. V rámci třetí části studie bylo použito krmení SDS sterilizované radiací (25 kGy) (Special Diet Service, Velká Británie).

3.1.3 Podestýlka a hnízdní materiál

V průběhu první a druhé části studie byla zvířata chována na cca 140 g vrstvy podestýlky z topolové štěpky (Safe Select, J. Rettenmaier Europa BS GmbH, Německo) a s hnízdním materiálem ve formě buničité vaty (Batist Medical, Česká republika). Ve třetí části studie bylo použito 100 g sterilizované podestýlky z osikové štěpky (Tapvei Estonia OÜ, Estonsko) a hnízdní materiál Bed-r'Nest (Datesand Ltd, Velká Británie).

3.1.4 Manipulace se zvířaty

Manipulace se zvířaty byla prováděna pouze pod ochranou laminárního proudění v přestýlacím laminárním boxu (Laminar Flow Class II changing stations; Tecniplast, Itálie). Pouze v průběhu první a druhé části studie byla při každém přestlání do nového boxu přenesena také malá část špinavé podestýlky nebo hnízdního materiálu za účelem snížení stresu z nového prostředí a zachování hierarchie uvnitř chovné nádoby.

3.2. Technologie chovu

3.2.1 Charakteristika chovných zařízení

První část studie měla tři fáze a probíhala ve zvěřinci Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i. (IMG) ve Vestci u Prahy s dvoukoridorovým systémem oddělení čisté a špinavé části a jednosměrným tokem materiálu směrem z čisté chovné místnosti přímo do špinavé chodby. Vstup do čistého prostoru byl umožněn pouze přes hygienickou tříkomorovou smyčku s mokrou sprchou a následným oblečením personálu do sterilního oděvu. Druhá část studie probíhala v experimentálním zvěřinci IMG v Praze s jednoridorovým systémem provozu a omezeným vstupem bez mokré hygienické smyčky. Třetí část studie probíhala ve zvěřinci Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i. (IMG) ve Vestci u Prahy v experimentální části s omezeným vstupem a nutností převlečení do sterilního oblečení.

3.2.2 Chovné nádoby

Zvířata byla chována v individuálně ventilovaných chovných nádobách (IVC) GM 500 vložených do DVC stojanů (Tecniplast S.p.A., Itálie) (Obr. 1.5 a 1.6).

3.2.3 DVC stojany

DVC stojany obsahují oddělená potrubí pro přívod a odtah vzduchu z ventilační jednotky do jednotlivých chovných nádob. Každá pozice chovné nádoby na stojanu je vybavena deskou se zabudovanými elektrodami umožňující automatický 24hodinový sběr informací o aktivitě zvířat a úrovni vlhkosti podestýlky bez narušení prostředí zvířat (Obr. 1.6). Stejně tak elektrody po stranách chovných nádob monitorují přítomnost napájecí láhve, krmiva a dostatek vody v láhvi. Vzduchotechnická jednotka adekvátně napojená na potrubí stojanu saje vzduch z místnosti, filtruje ho přes HEPA filtry H-14, vymění vzduch v chovné nádobě, opětovně filtruje přes HEPA

filtry a vrací zpět do chovné místnosti. Takto zajišťuje 75 výměn vzduchu v chovných nádobách za hodinu a negativní tlak uvnitř chovné nádoby (-20 %).

3.2.4 Zajištění čistoty a standardnosti prostředí

V obou provozech IMG ve Vestci a v Praze je personál oblečen do sterilního oděvu s antistatickou úpravou, roušku, pokrývku hlavy, případně vousenku, rukavice, ponožky a obuv určenou pouze pro pohyb v prostorech se zvířaty.

V obou zvěřincích byly všechny termostabilní materiály včetně zkompletovaných chovných nádob s podestýlkou dekontaminovány parním sterilizátorem Vakulab/Sterivap (MMM Group CZ, Česká Republika). Termolabilní materiály byly dekontaminovány peroxidovou komorou DeconLock (IWT s.r.l., Itálie) nebo pomocí externího vyvíječe par peroxidu vodíku (Steris, USA).

3.2.5 Zoohygienické podmínky v chovné místnosti

Zvířata byla chována ve světelném režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Teplota prostředí byla po celou dobu studie udržována v rozmezí 20°C – 24°C a relativní vlhkost v rozmezí 55 ± 5 %. Vzduch byl čištěn přes předfiltry, zchlazen, případně odvlhčen nebo dohříván a dočištěn přes HEPA filtry. Regulací výměn vzduchu v chovné místnosti bylo dosaženo kaskádovitého přetlaku směrem z centrální čisté chodby do chovných místností a dále do špinavé chodby. Výměny vzduchu v chovných místnostech se pohybují v rozmezí 10 - 15x za hodinu.

3.3. 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 určena k přestlání. Tvorba algoritmu probíhala na čtyřech skupinách chovných nádob s odlišným počtem zvířat (Tabulka 3.1), 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 mokřích 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.

Tabulka 3.1: Rozdělení zvířat do skupin pro vytvoření algoritmu.

| Skupina nádob | Počet chovných nádob | Počet jedinců v chovné nádobě |
|---------------|----------------------|-------------------------------|
| 1 | 20 | 2 |
| 2 | 20 | 3 |
| 3 | 20 | 4 |
| 4 | 20 | 5 |

3.3.1 Postupy hodnocení digitálního a klasického způsobu přestýlání v průběhu experimentu

První fáze sběru dat probíhala v období od 15. 2. 2017 do 15. 5. 2017 (3 kalendářní měsíce) s 2429 registrovanými chovnými nádobami a bylo provedeno 7831 výměn podestýlky. Probíhala bez aktivního využití systému DVC, kdy po uvedení doby systém pouze monitoroval znečištění více než 2000 ks 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.

Druhá fáze probíhala v období od 16. 5. 2017 do 12. 8. 2017 (3 kalendářní měsíce). Bylo v ní použito 2530 registrovaných chovných nádob a provedeno 6091 výměn podestýlky. Systém DVC byl 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.

V čase mezi druhou a třetí fází probíhal sběr informací od ošetřovatelů, kteří srovnávali úroveň znečištění chovné nádoby vyhodnocené systémem DVC s vyhodnocením ošetřovatele. To znamená, že ošetřovatelé dávali při každém přestlání do systému informaci, zda podle nich systém dobře vyhodnotil míru znečištění a vlhkosti chovné nádoby, což znamená indikaci k přestlání. Na základě souhrnných dat byl upraven algoritmus systému, který byl k detekci chovné nádoby vhodně k přestlání přísnější.

Třetí fáze proběhla od 27. 2. 2019 do 27. 5. 2019 (3 kalendářní měsíce). DVC systém byl plně funkční a obsluhující personál byl aktivně informován o alarmových hlášeních a dostával pokyny, jaké chovné nádoby a kdy přestlat.

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).

3.4. Organizace experimentu druhé části studie

3.4.1 Vybrané metody sledování vlivu intervalu výměny podestýlky na welfare a zdraví zvířat

Zvířata byla rozdělena do tří základních skupin dle délky intervalu přestýlání chovné nádoby (Tabulka 3.2) a byly na nich sledovány parametry uvedené v Tabulce 3.3.

Tabulka 3.2: Rozdělení skupin a počtů zvířat

| Skupina | Interval přestýlání | Počet jedinců v chovné nádobě | Počet chovných nádob v podskupině |
|---------|---------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 1 x 7 dní | 2 | 7 |
| | | 3 | 7 |
| | | 4 | 7 |
| 2 | 1 x 14 dní | 2 | 7 |
| | | 3 | 7 |
| | | 4 | 7 |
| 3 | Dle DVC systému | 2 | 7 |
| | | 3 | 7 |
| | | 4 | 7 |

Tabulka 3.3: Měřené parametry

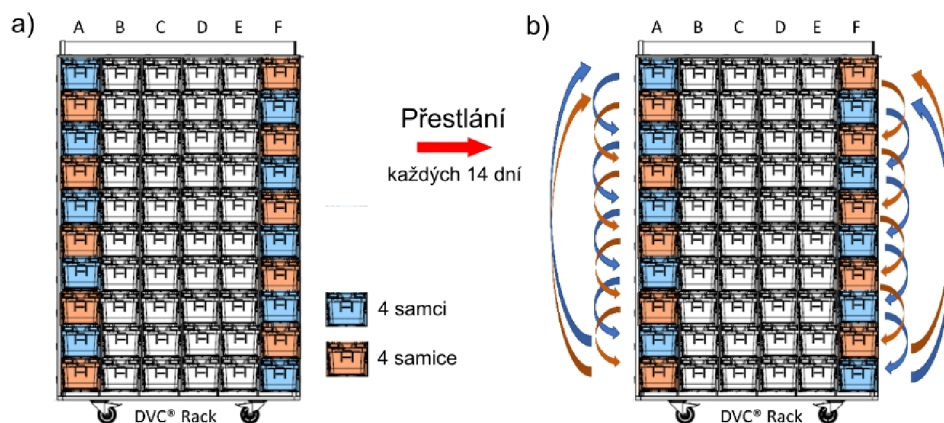
| Parametr | Den | |
|--------------------------------|------------------|------------|
| | 0 | Přestýlání |
| Hmotnost zvířat | + | + |
| Hmotnost podestýlky | čistá | + |
| | špinavá | + |
| Hmotnost napájecí láhve | s čerstvou vodou | + |
| | se zbytkem vody | + |
| Hmotnost krmiva | nové | + |
| | zbytek | + |
| Lokalizace toalety | | + |
| Lokalizace hnízda | | + |
| Klinické změny | průběžně | + |
| Chování zvířat | průběžně | + |

V den 0 byla na digitálních váhách (Kern PBS4200-2M, Kern & Sohn GmbH, Německo) zvážena čistá podestýlka, voda, krmivo a zvířata. V den přestýlání byla zvážena špinavá podestýlka, voda, zbytky krmení a zvířata, a pak opět zvážena čistá podestýlka, čerstvá voda a doplněné krmení. Toto měření probíhalo po celou dobu studie. V případě nutnosti výměny vody mimo termín přestýlání proběhlo také vážení všech položek, jak popsáno výše.

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 přestýlání zvířat; iii) aktivita zvířat po přestýlání chovné nádoby; iv) lokalizace toalety a hnízda; v) nezvyklá aktivita zvířat v chovné nádobě. Tyto údaje jsou statisticky vyhodnoceny a zaneseny v grafech.

3.5. 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 (A a F) sloupců stojanu DVC (Obr. 3.1a). Centrální (B-E) sloupy 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 přestýlání se již nepřesouvala špinavá podestýlka a ani hnízdní materiál do nového 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 (Obr. 3.1b). Tato část studie probíhala paralelně na více pracovištích: Karolinska Institute, Švédsko (KI), Leiden University Medical Centre, Holandsko (LUMC), Université de Grenoble Alpes, Francie (UGA).

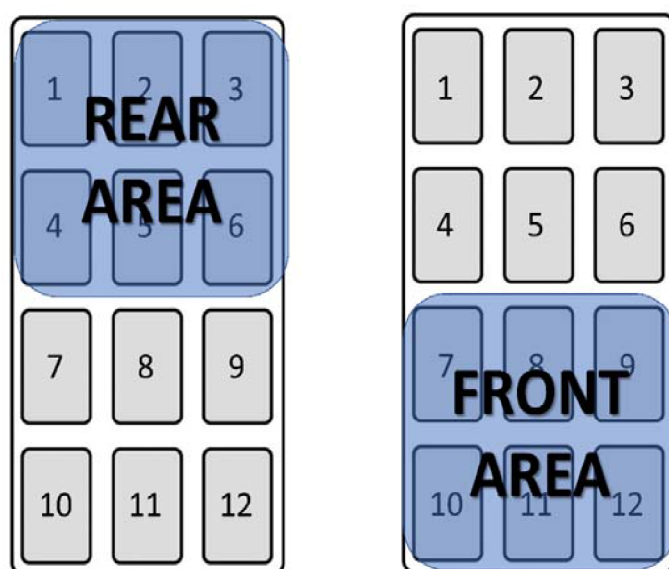


Obrázek 3.1: Umístění chovných nádob dle pohlaví do stojanu DVC a jejich rotace při každém přestýlání (zdroj Ulfhake, Honetschläger et al., 2022).

3.6. Zpracování a statistické vyhodnocení dat

K měření aktivity zvířat v chovné nádobě byla použita metrika aktivační hustoty klece, tzv. *DVC metrics*. Nepracovaná 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 jednodominutových 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 (Obr. 3.2). 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.



Obrázek 3.2: Rozmístění elektrod v DVC desce a jejich příslušnost k přední (*front area*) a zadní (*rear area*) části chovné plochy (zdroj Ulfhake, Honetschläger et al., 2022).

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.

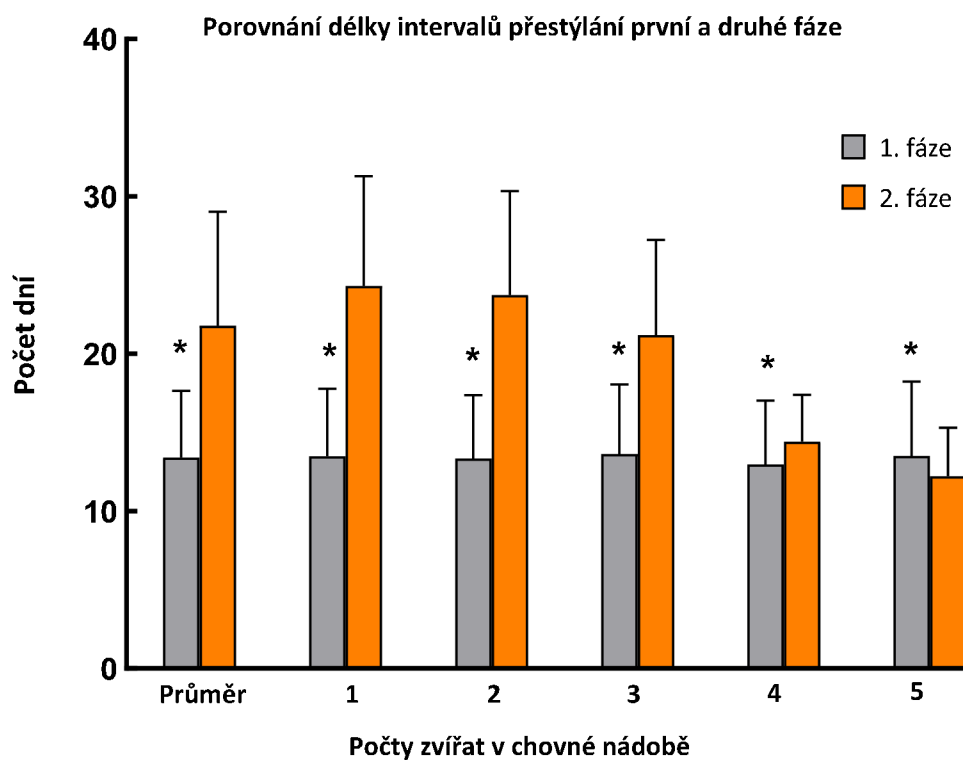
4 Výsledky

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. (Graf 4.1, šedé sloupce)

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 ($p \leq 0.0001$, Graf 4.1, oranžové sloupce)

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 (Graf 4.1).

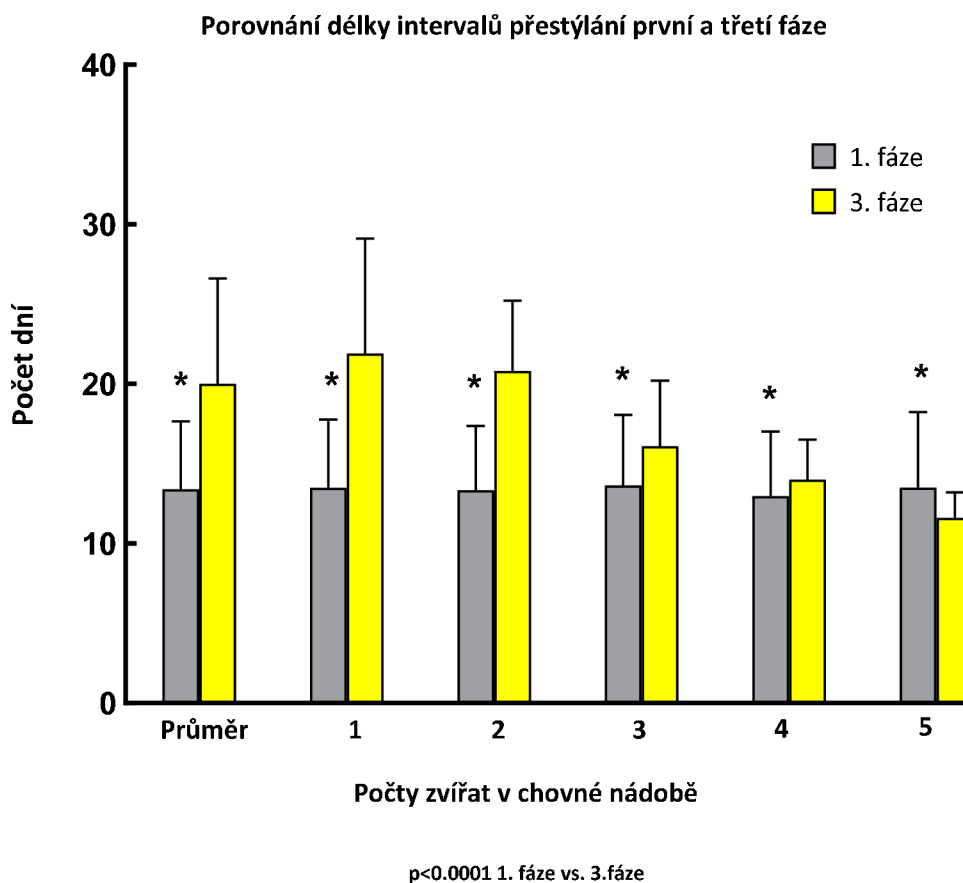


Graf 4.1: Porovnání délky intervalů přestýlání chovných nádob v první a druhé fázi pokusu

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 zkrátil o 1,90 dne. Výsledky pro všechny kategorie počtu zvířat v chovné nádobě byly signifikantní ($p \leq 0.0001$, Graf 4.2, žluté sloupce)

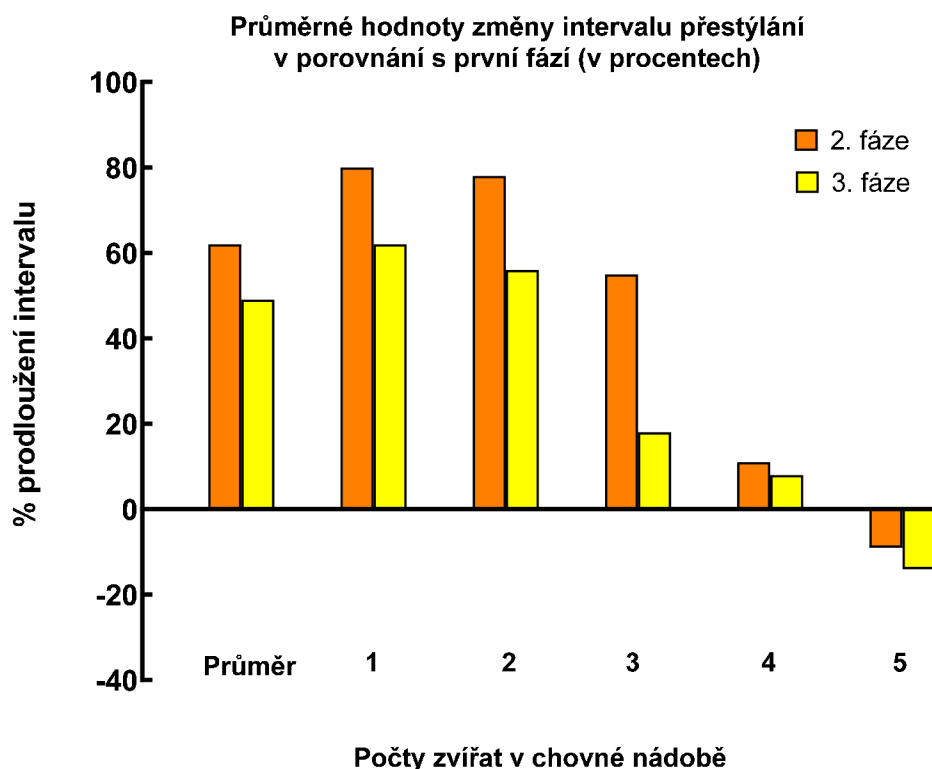
Po upravení algoritmu DVC systému pro vyhodnocování byly doporučeny intervaly nadále delší, než je standardní chovná praxe. Nedošlo tak k výraznému snížení počtu dnů mezi dvěma výměnami podestýlky při srovnání s druhou fází testování (automatizovaný DVC). Nadále přetrvává výrazné prodloužení intervalu 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 přestlání (Graf 4.2).



Graf 4.2: Porovnání délky intervalů přestýlání chovných nádob v první a třetí fázi pokusu

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 % (Graf 4.3, oranžové

sloupce) a ve třetí fázi o 33 % (Graf 4.3, žluté sloupce). 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 (Graf 4.3).



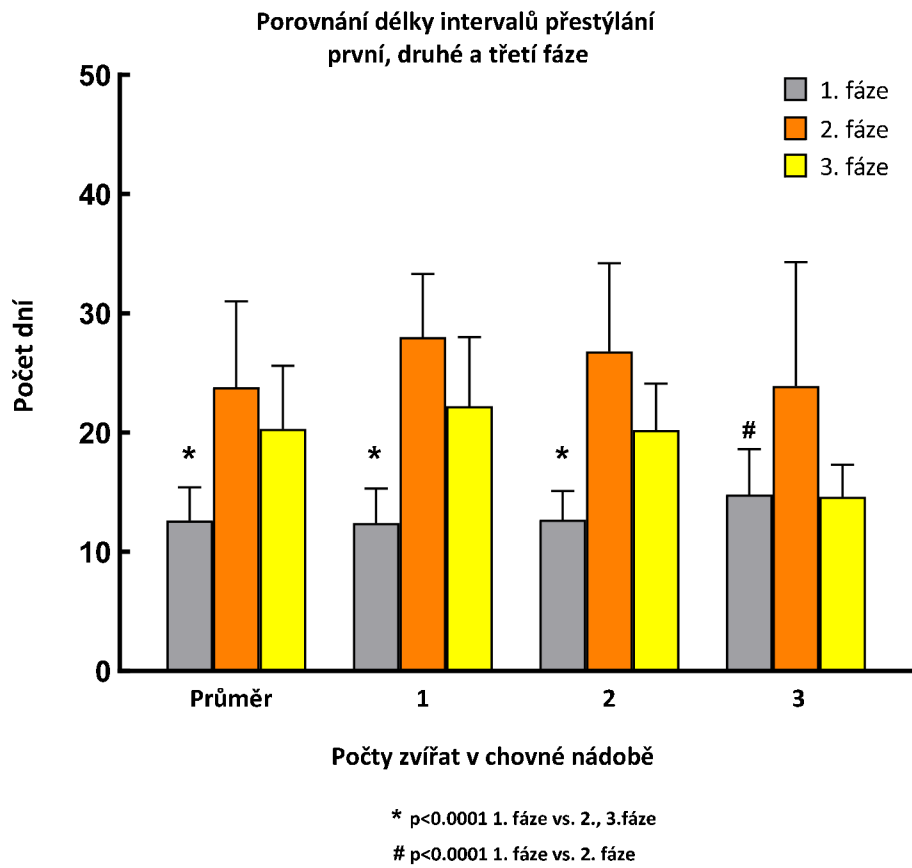
Graf 4.3: Porovnání procentuální změny délky intervalů ve druhé a třetí fázi pokusu

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

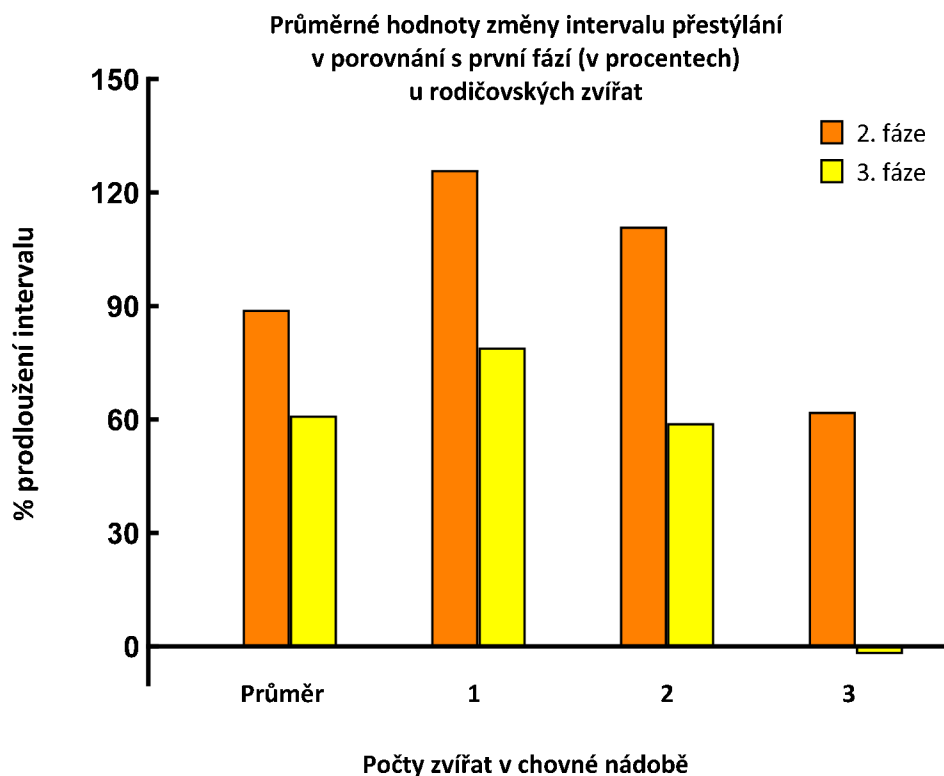
Z celkového počtu nádob zařazených do studie tvořily v jednotlivých fázích přibližně jednu třetinu chovné nádoby s rodičovskými chovnými zvířaty. Cyklus přestýlání těchto chovných nádob má často svá specifika s ohledem na porodnost jednotlivých kmenů nebo celkové množství mláďat v nádobě. Z pohledu intervalu 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 (Graf 4.4 a Graf 4.5).



Graf 4.4: Porovnání délky intervalů první, druhé a třetí fáze v nádobách s rodičovskými chovnými zvířaty

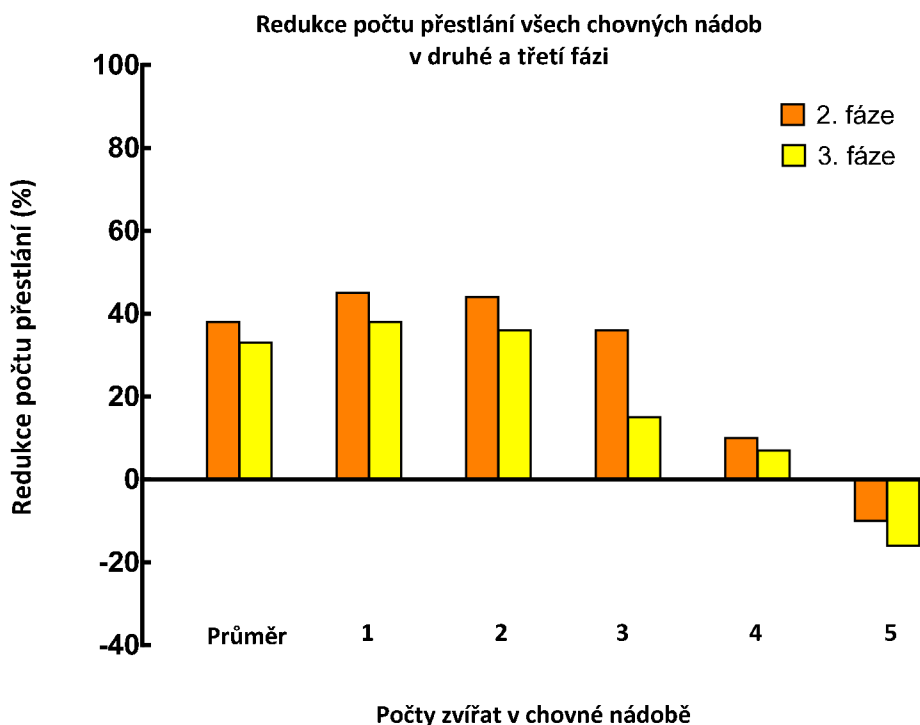


Graf 4.5: Porovnání procentuální změny délky intervalů ve druhé a třetí fázi v nádobách s rodičovskými chovnými zvířaty

4.3. Hodnocení frekvence narušení prostředí chovné nádoby

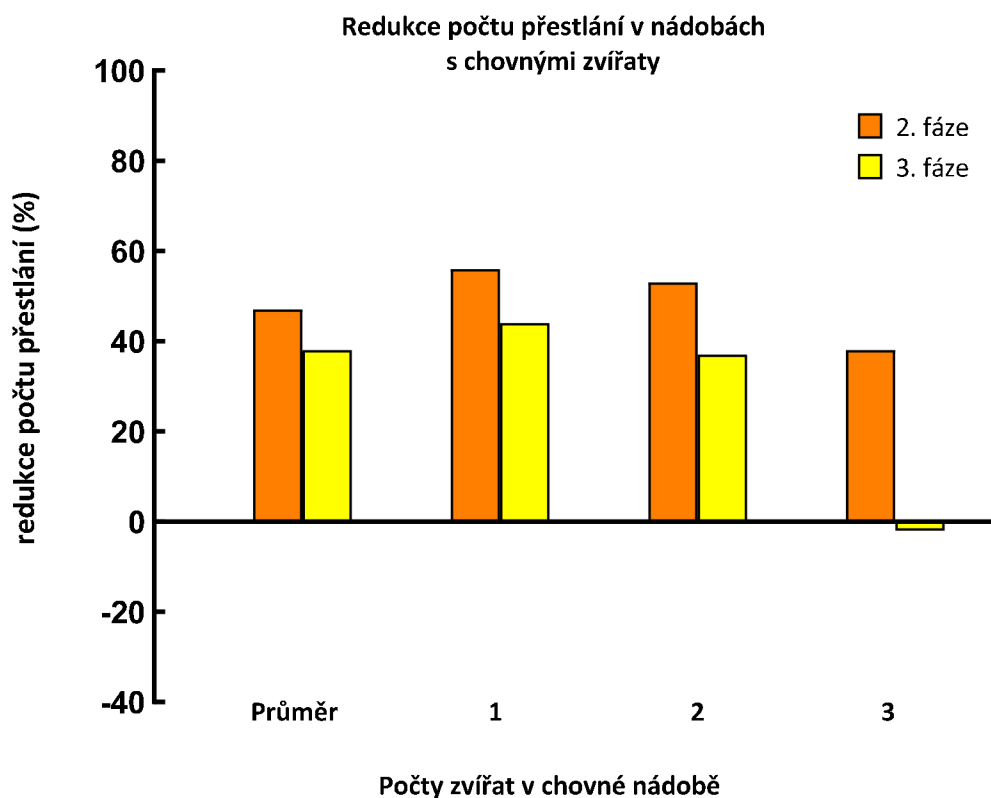
Z pohledu welfare zvířat jsou zajímavé výsledky, které zachycují, jakým způsobem se digitálně indukovaná změna frekvence výměny podestýlky projevila na redukcí nebo navýšení počtu přestýlání chovných nádob, a tedy i narušení hierarchie a mikroklimatu uvnitř chovné nádoby. V celkovém průměru všech chovných nádob došlo v porovnání s první fází ke zmenšení počtu přestlání o 38 % a ve třetí fázi se celková redukce počtu přestlání 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 redukci 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 přestýlání chovných nádob o 10 % ve druhé fázi a 16 % ve třetí fázi (Graf 4.6).



Graf 4.6: Redukce počtu přestlání všech chovných nádob ve druhé a třetí fázi pokusu

Významnější redukce počtu přestýlání 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 redukci 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 (Graf 4.7).



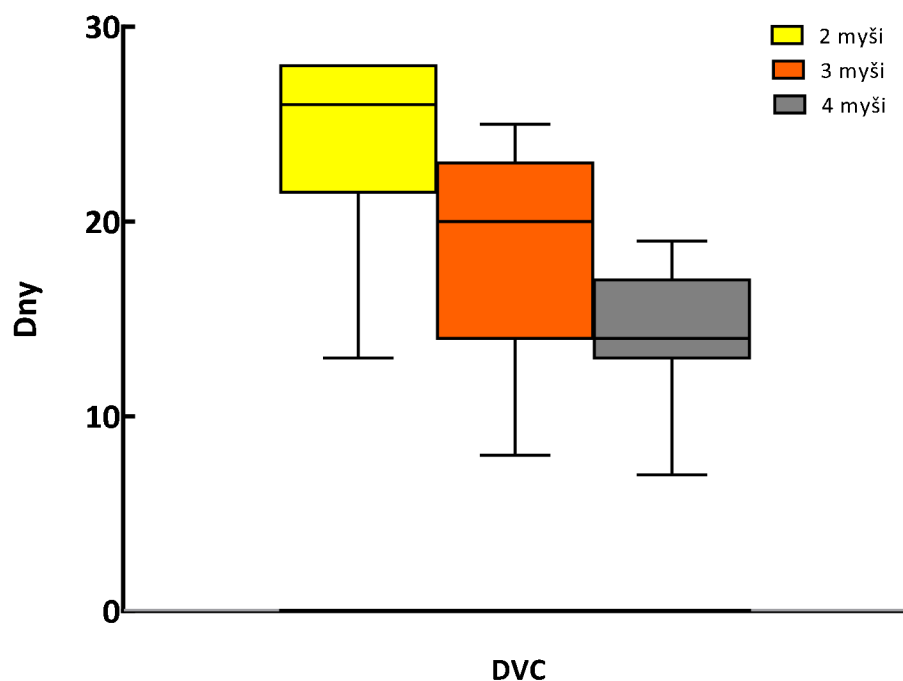
Graf 4.7: Redukce počtu přestlání ve druhé a třetí fázi v nádobách s chovnými zvířaty

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

4.4.1 Interval přestýlání chovných nádob

Pro sledování vlivu intervalu přestýlání 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 (Graf 4.8). 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.

Interval přestýlání chovných nádob

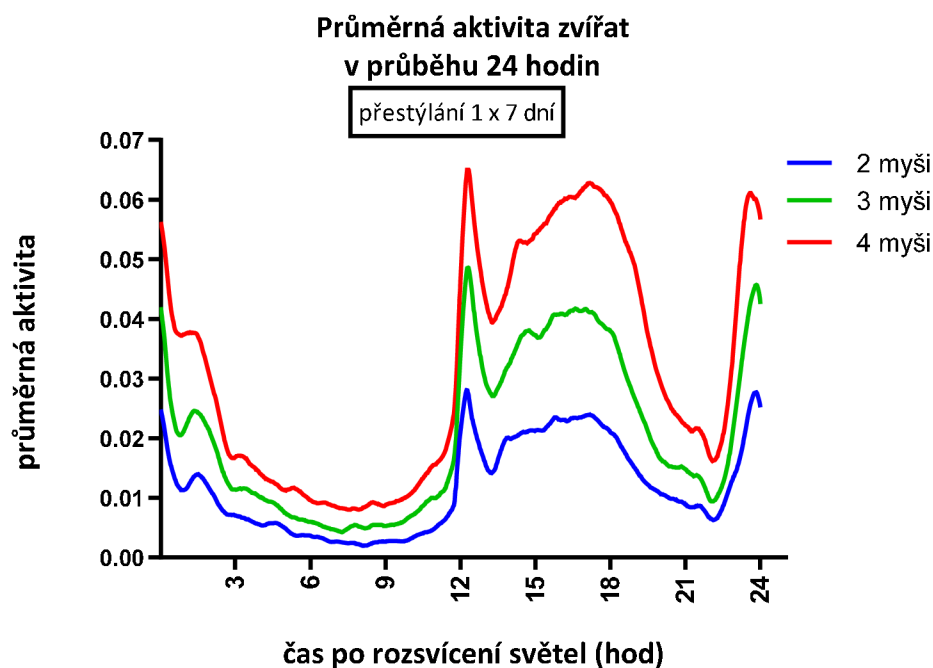


Graf 4.8: Intervaly přestýlání chovných nádob během sledování welfare zvířat

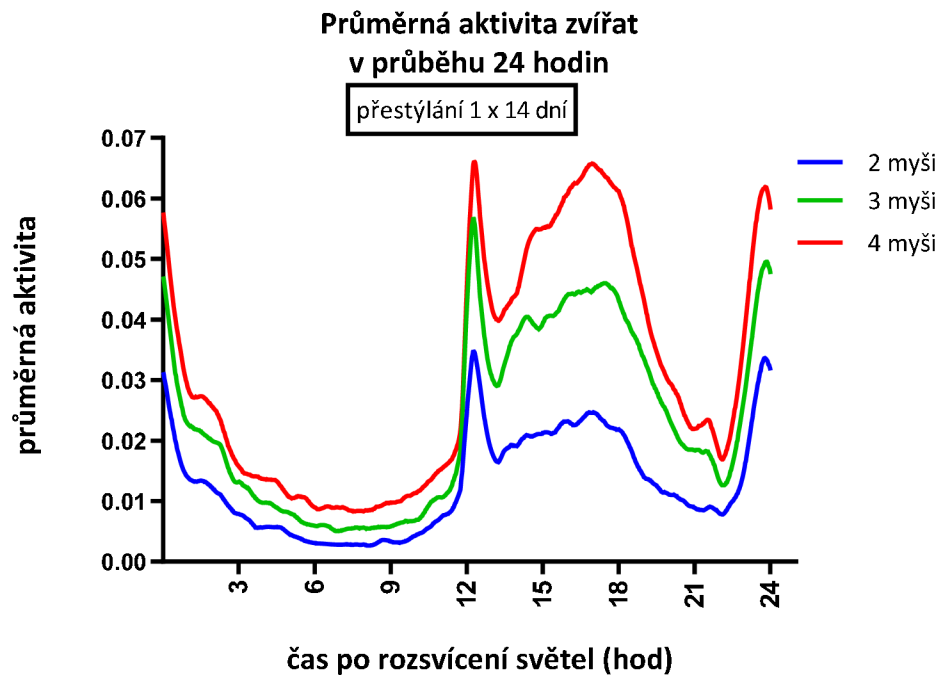
4.4.2 Průměrná aktivita zvířat v průběhu 24 hodin

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 předcházel 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 trvajícimu vrcholu aktivity denního cyklu, s maximální hodnotou aktivity

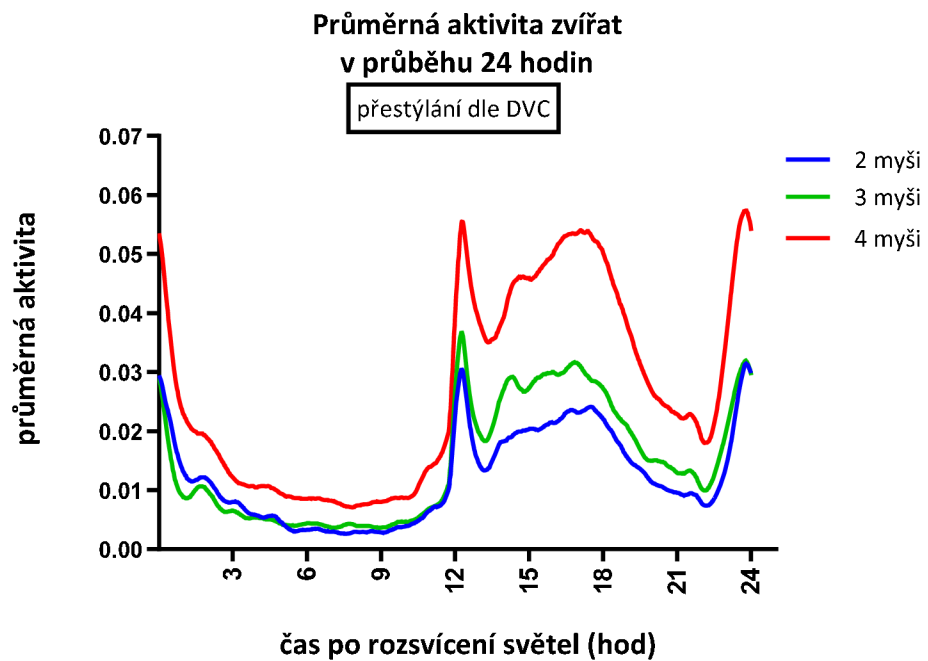
0,0239, a to 17 hodin po rozsvícení světél. Následující pozvolné pětihodinové klesání aktivity dosáhlo krátkého klidového režimu s hodnotou 0,0062. Dvě hodiny před ukončením tmavé fáze dne se opět prudce zvýšila aktivita zvířat s vrcholovou hodnotou 0,0277 čtvrt hodiny před rozsvícením světél (Graf 4.9). Podobný trend je patrný při měření aktivity jedinců mezi 14denním přestláním (Graf 4.10) i ve skupině DVC, měřeno uprostřed systémem doporučeného intervalu přestlání (Graf 4.11). 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 světél – 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.



Graf 4.9: Průměrná aktivita zvířat za 24 hodin naměřena uprostřed přestýlacího cyklu 1 x za 7 dní

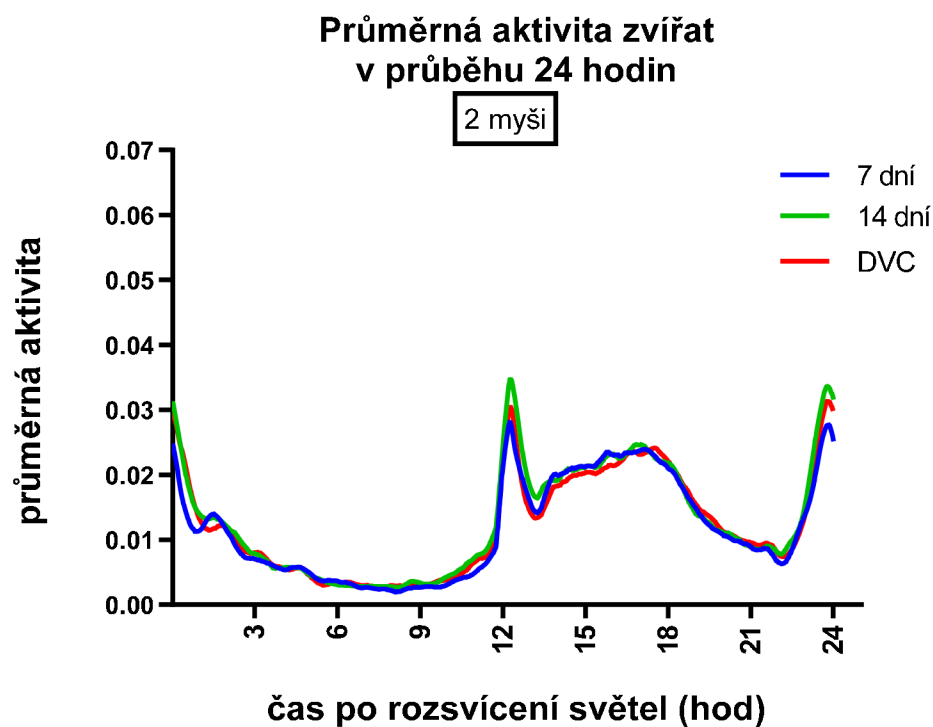


Graf 4.10: Průměrná aktivita zvířat za 24 hodin naměřena uprostřed přestýlacího cyklu 1 x za 14 dní

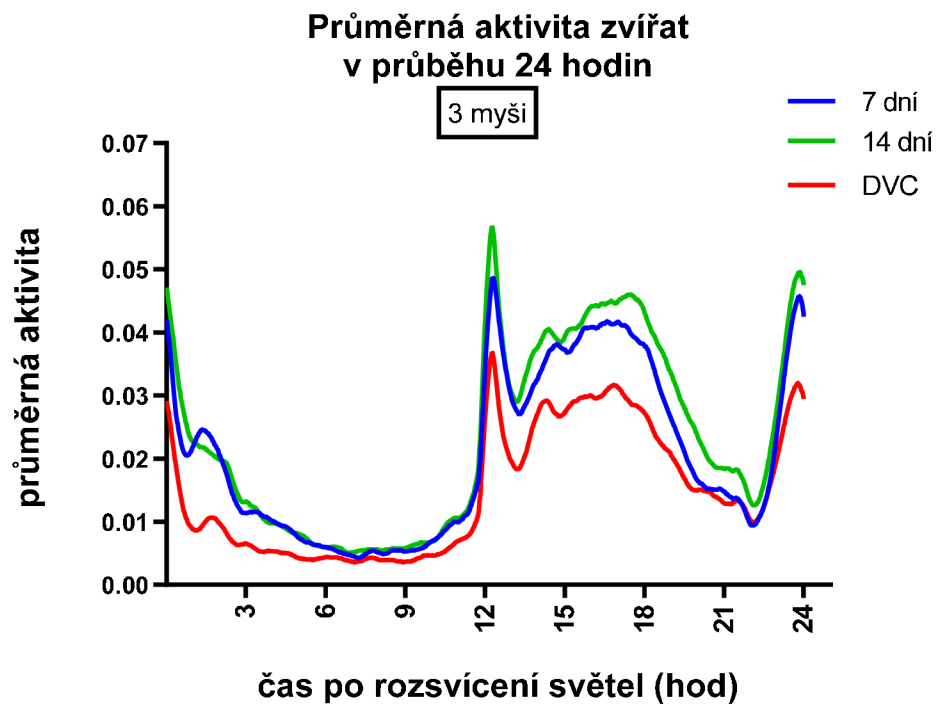


Graf 4.11: Průměrná aktivita zvířat za 24 hodin naměřena uprostřed přestýlacího cyklu doporučeného dle DVC

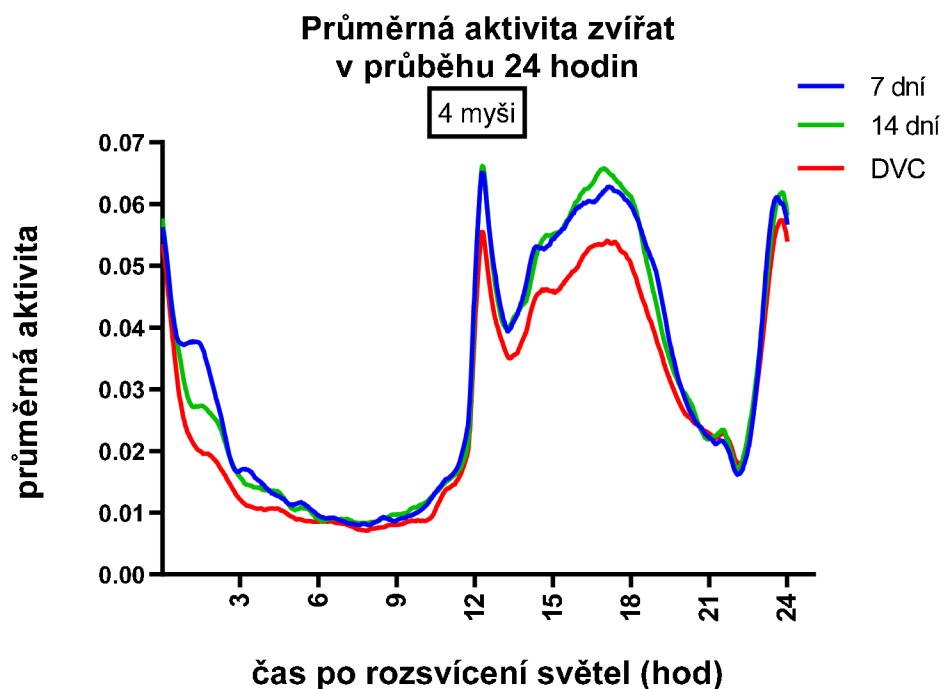
Při porovnání průměrných hodnot aktivity zvířat za 24 hodin v chovných nádobách v rámci jedné skupiny zvířat, ale s různým intervalem přestýlání, je ve skupinách se třemi a čtyřmi zvířaty patrné celkové snížení aktivity zvířat přestlaných podle doporučení DVC (Graf 4.13 a 4.14). Skupina se dvěma zvířaty vykazuje vyrovnané intenzity aktivity u všech třech intervalů přestýlání (Graf 4.12).



Graf 4.12: Porovnání průměrné aktivity zvířat za 24 hodin v chovných nádobách se dvěma zvířaty a různým intervalem přestýlání



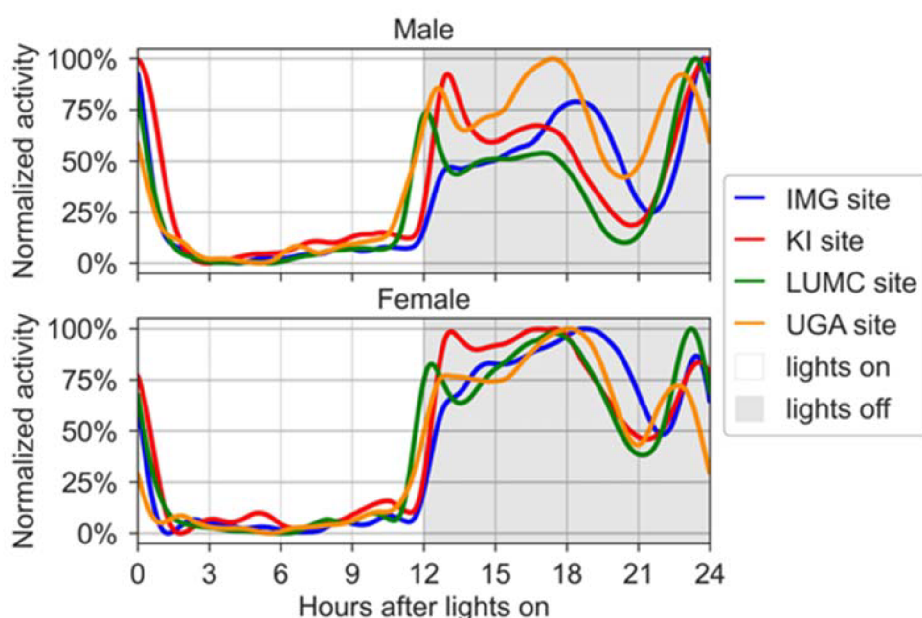
Graf 4.13: Porovnání průměrné aktivity zvířat za 24 hodin v chovných nádobách se třemi zvířaty a různým intervalem přestýlání



Graf 4.14: Porovnání průměrné aktivity zvířat za 24 hodin v chovných nádobách se čtyřmi zvířaty a různým intervalem 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.

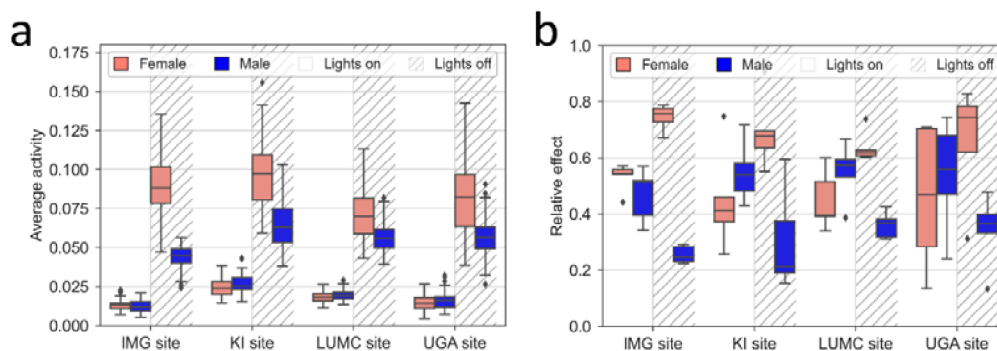
Ve třetí části studie byla sledována a porovnána průměrná aktivita zvířat za 24 hodin u obou pohlaví. V grafu 4.15 je zobrazena průměrná aktivita zvířat napříč partnerskými institucemi zařazenými do studie. Z tohoto grafu je také patrný podobný trend aktivity napříč partnerskými institucemi s malou odchylkou pomalého nástupu aktivity samců po nástupu tmavé části dne v chovných prostorách Ústavu molekulární genetiky.



Graf 4.15: Porovnání průměrné aktivity obou pohlaví za 24 hodin a mezi partnerskými institucemi (zdroj Ulfhake, Honetschläger et al., 2022). IMG – Ústav molekulární genetiky; KI – Karolinska Institute; LUMC - Leiden University Medical Center; UGA - Université de Grenoble Alpes.

Graf 4.16a znázorňuje průměrnou denní a noční aktivitu a graf 4.16b relativní vliv pohlaví na aktivitu zvířat ve všech partnerských institucích. Z těchto grafů je zřejmé, že 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 jsou patrné rozdíly v aktivitě mezi institucemi ($p = 1.2E-34$). V tmavé části dne byl zaznamenán

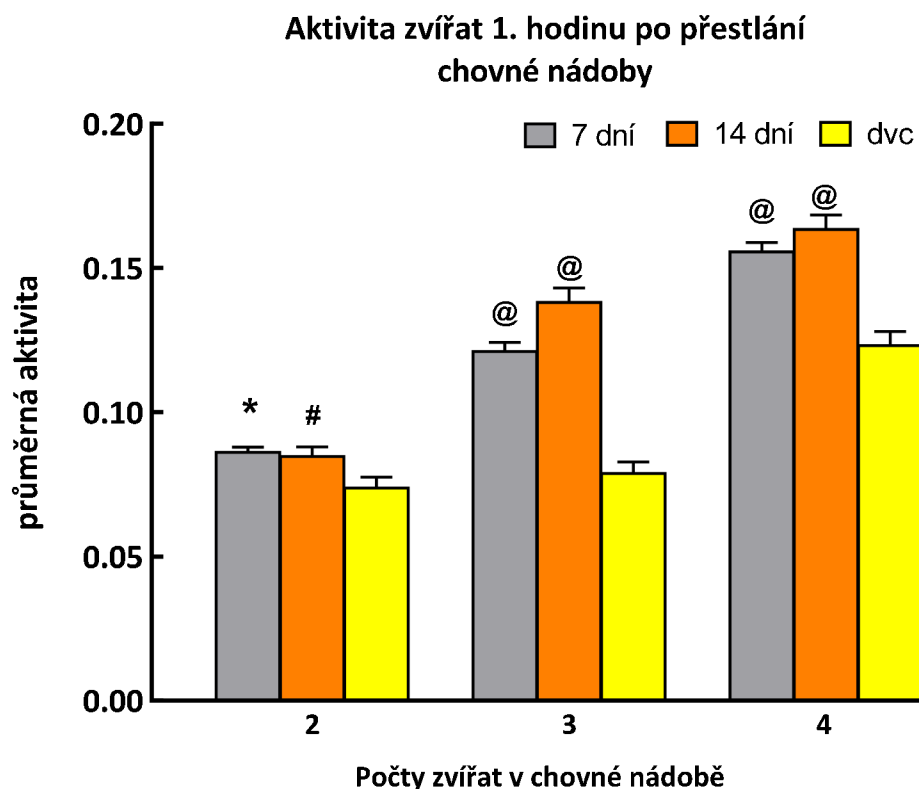
významný rozdíl mezi intenzitou aktivity samců a samic ($p = 1,3E-16$) a také rozdíly mezi a institucemi ($p = 1.1E-3$).



Graf 4.16: a) Průměrná aktivita obou pohlaví za 24 hodin v rámci 5 přestlání podestýlky; b) relativní vliv pohlaví na aktivitu zvířat (zdroj Ulfhake, Honetschläger et al., 2022). IMG – Ústav molekulární genetiky; KI – Karolinska Institute; LUMC - Leiden University Medical Center; UGA - Université de Grenoble Alpes.

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 (Graf 4.17).

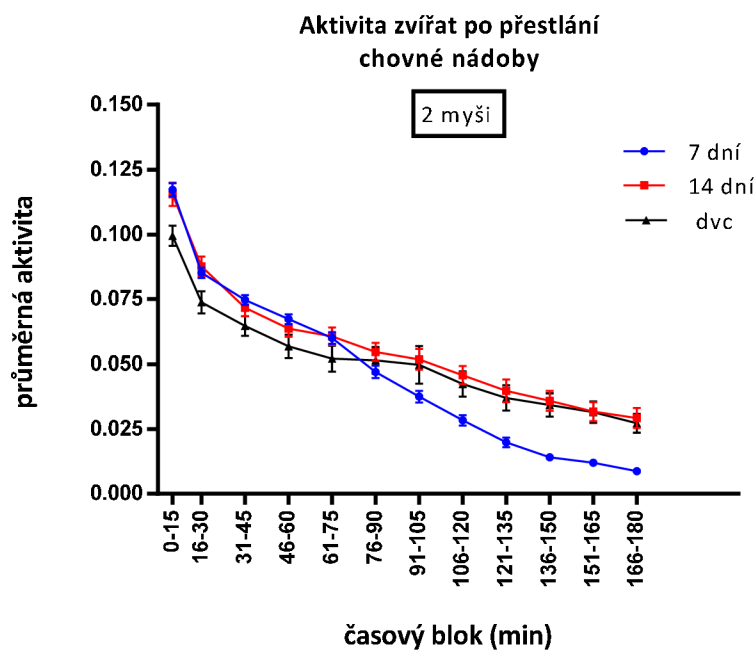


Graf 4.17: Aktivita zvířat 1 hodinu po přestlání chovné nádoby

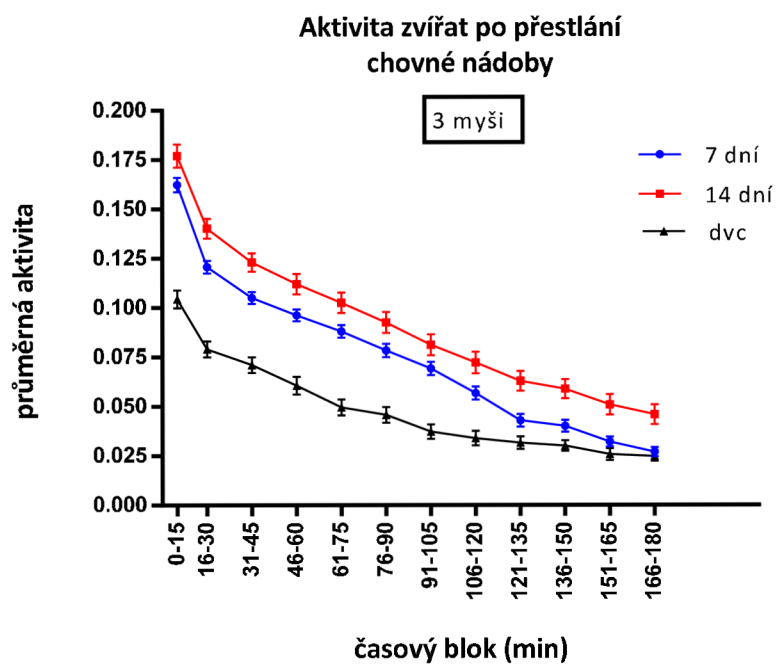
Pozorované signifikantní změny v aktivitě mezi jednotlivými skupinami myší, spojené s frekvencí přestlání, nás vedlo k pozorování a vyhodnocení aktivity zvířat bezprostředně po výměně podestýlky, a to po dobu 180 minut, s 15minutovými intervaly měření. Aktivita dvou zvířat měřena v prvních 180 minutách 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 (Graf 4.18). 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 (Graf 4.19). 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 (Graf 4.20).

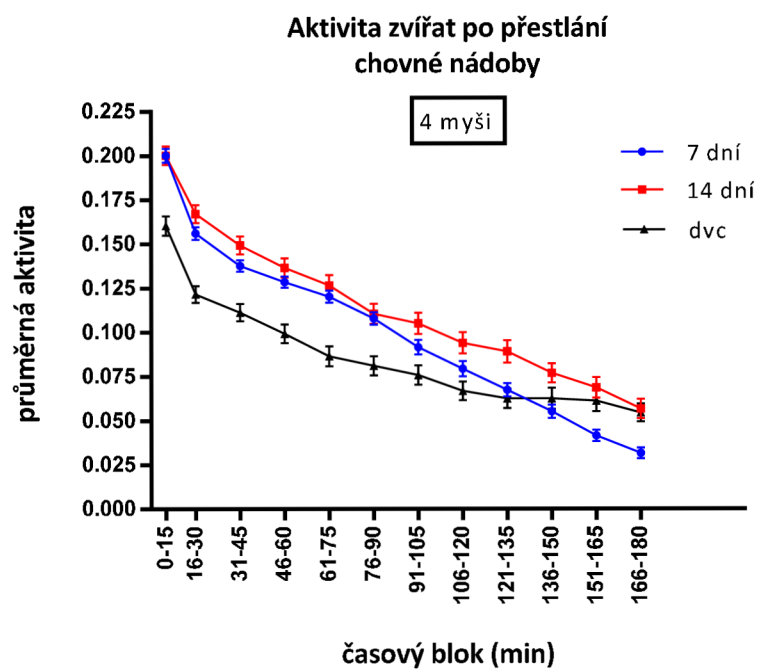
Z grafů je možné vyhodnotit, že pokud se jedná o chov skupiny myší o počtu tři a více, nižší frekvence přestýlání u takovéto skupiny nemá negativní vliv na jejich aktivitu. Dá se předpokládat, že myši jsou klidnější, jejich „startovací“ aktivita v čase bezprostředně po přestlání je nižší a rychleji pak 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 myší 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 myší je ale patrná snížená aktivita již bezprostředně po výměně podestýlky.



Graf 4.18: Porovnání aktivity zvířat po přestlání chovné nádoby ve skupině 2 myší



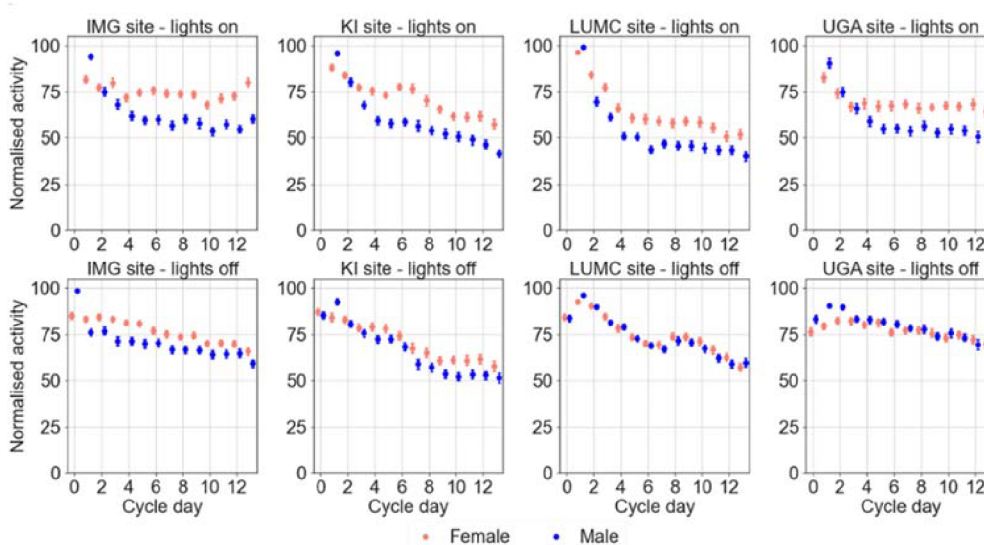
Graf 4.19: Porovnání aktivity zvířat po přestlání chovné nádoby ve skupině 3 myši



Graf 4.20: Porovnání aktivity zvířat po přestlání chovné nádoby ve skupině 4 myši

4.4.4 Rozdíly v aktivitě zvířat po přestlání dle pohlaví

Graf 4.21 ukazuje rozdílnost průměrné aktivity jednotlivých pohlaví bezprostředně po přestlání zvířat v průběhu 5 po sobě jdoucích přestýlacích cyklů v rámci třetí části studie. Z grafu je patrné, 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.



Graf 4.21: Porovnání průměrné aktivity samic a samců v 5 po sobě jdoucích přestýlacích cyklech (zdroj Ulfhake, Honetschläger et al., 2022). IMG – Ústav molekulární genetiky; KI – Karolinska Institute; LUMC - Leiden University Medical Center; UGA - Université de Grenoble Alpes.

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

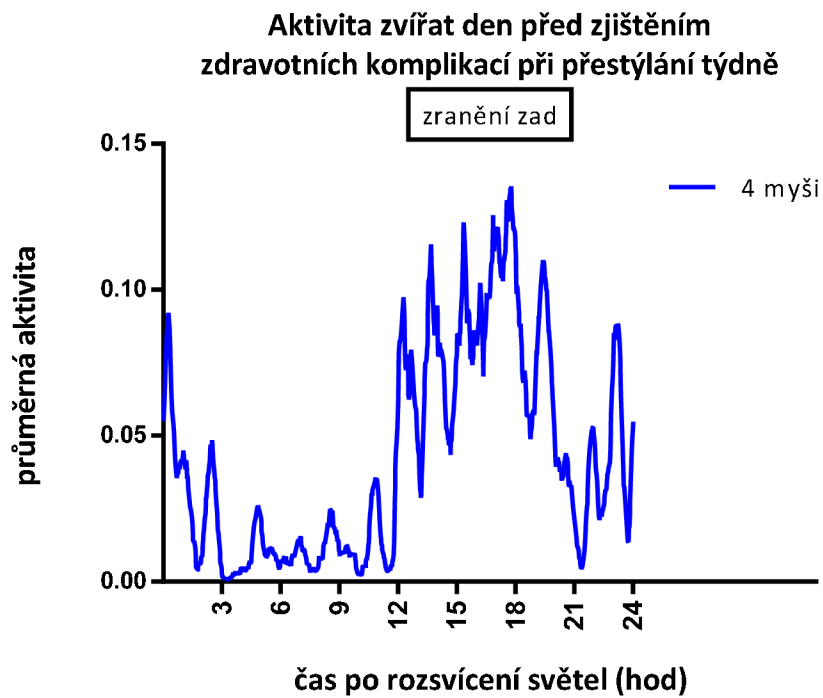
V průběhu sběru dat se vyskytly čtyři případy zranění způsobených vzájemnými souboji. Konkrétně dva případy pokousání v oblasti beder, jeden v oblasti genitálií a jeden případ pokousání na břicho. Zraněná zvířata byla separována od skupiny a do experimentu se již nevrátila. Zranění se objevila vždy ve 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 s přestýláním řízeným DVC (Tabulka 4.1).

Tabulka 4.1: Zranění a úhyny v průběhu sledování zvířat

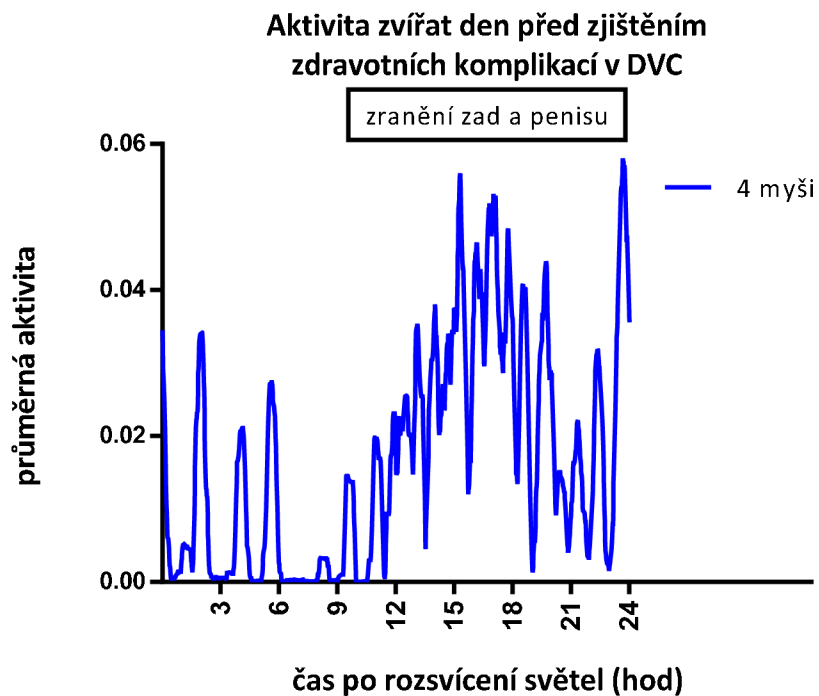
Zranění a úhyny v průběhu sledování zvířat

| Počet myší v chovné nádobě | Interval přestýlání | Barbering | Zranění | Úhyn |
|----------------------------|---------------------|-----------|---------|------|
| 2 | 1 x 7 dní | 2x | | |
| | 1 x 14 dní | | | |
| | DVC | | | |
| 3 | 1 x 7 dní | | | |
| | 1 x 14 dní | | | |
| | DVC | | | |
| 4 | 1 x 7 dní | | 1x | |
| | 1 x 14 dní | | 1x | |
| | DVC | | 2x | 2x |

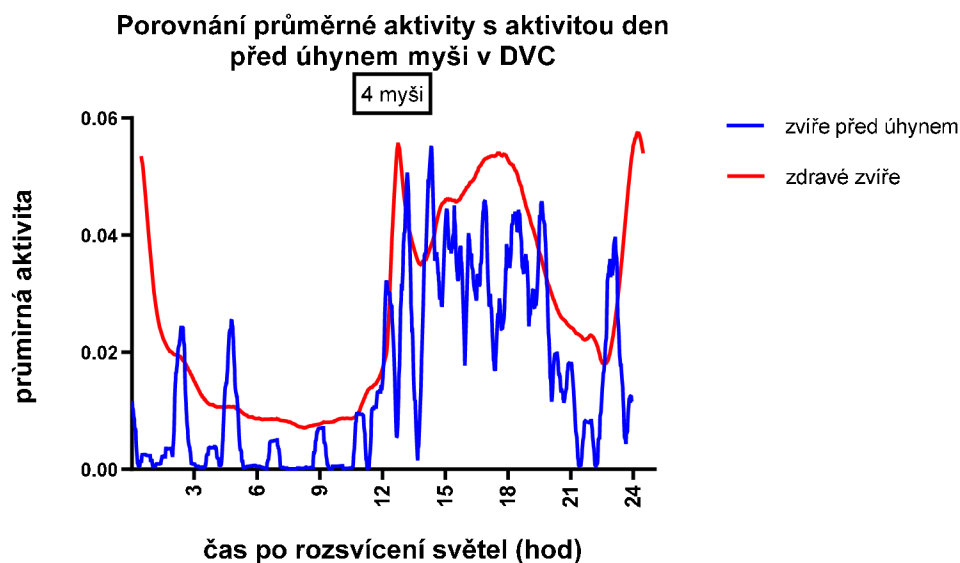
Aktivita zvířat zaznamenaná den před zjištěním zranění (Graf 4.22, Graf 4.23) nebo úhynu (Graf 4.24) ve všech případech ukazuje velké množství krátkých vrcholů aktivity následované často rychlým poklesem aktivity bez ohledu na tmavou nebo světelnou část dne. Vrcholy aktivity se v době rozsvícených světel pohybují v nižších průměrných hladinách a v tmavé části dne jsou průměrně vyšší. Z grafů 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.



Graf 4.22: Aktivita zvířat den před zjištěním zranění zad



Graf 4.23: Aktivita zvířat den před zjištěním zranění zad a penisu



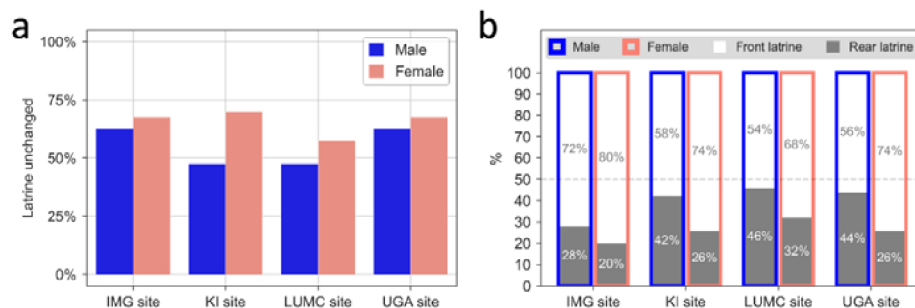
Graf 4.24: Porovnání průměrné aktivity zvířat uprostřed přestýlacího cyklu s průměrnou aktivitou 1 den před úhynem v chovné nádobě se čtyřmi zvířaty ve skupině DVC

Žádná z objevených zranění nebo úhynů uvedených v Tabulce 4.1 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

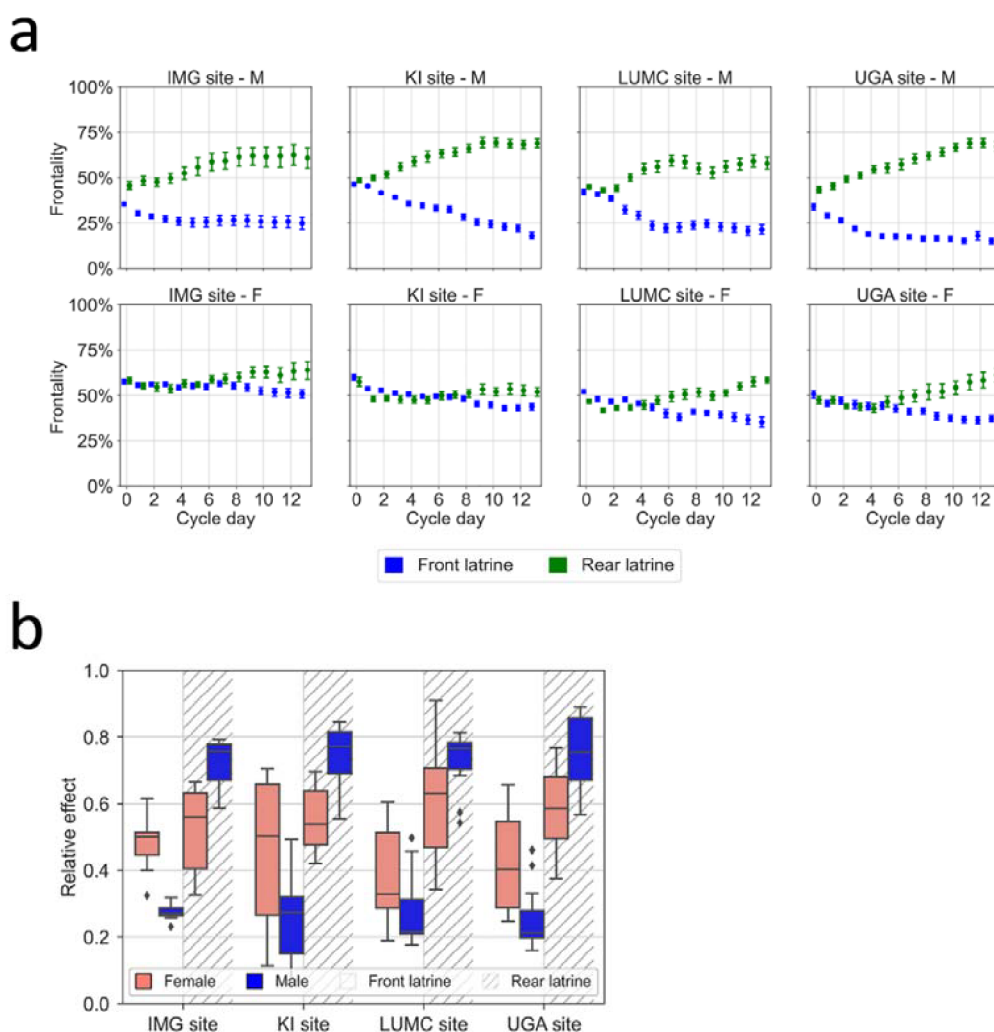
V rámci druhé části studie byly lokalizace toalety a hnízda v chovných nádobách detekované systémem DVC shodné s lokalitami zaznamenanými ošetřovateli v den přestýlání. Vzájemná pozice toalet nebo hnízda se bez ohledu na počet zvířat v chovných nádobách nebo interval přestýlání měnila a nebyla v jejich 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 (Grafy 4.25a a 4.25b).



Graf 4.25: Pozice toalety. a) procentuální vyjádření případů beze změny lokality toalety po přestlání. b) procentuální vyjádření umístění toalety v přední (front latrine) nebo zadní části (rear latrine) chovné nádoby (zdroj Ulfhake, Honetschläger et al., 2022). IMG – Ústav molekulární genetiky; KI – Karolinska Institute; LUMC - Leiden University Medical Center; UGA - Université de Grenoble Alpes.

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 (Grafy 4.26a a 4.26b).



Graf 4.26: a) Frontalita ve vztahu k pozici toalety v průběhu 14 dnů po přestlání chovné nádoby pro obě pohlaví. b) Relativní výsledek frontality mezi pohlavími a pozicí toalety, kdy bílé pozadí značí toaletu umístěnou v přední části chovné nádoby. Šrafované pozadí značí toaletu umístěnou v zadní části chovné nádoby (zdroj Ulfhake, Honetschläger et al., 2022). IMG – Ústav molekulární genetiky; KI – Karolinska Institute; LUMC - Leiden University Medical Center; UGA - Université de Grenoble Alpes.

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 myši 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 myši pro frontality 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 přestláním 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 přestlání 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 „misce“ 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 Ulfake 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. Buguggiate, 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.

8 Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1.1: Schéma bariérového systému zjednodušeně popisuje prostorovou organizaci chovu, se schematicky znázorněnými vstupy a výstupy pro personál, chovaná zvířata, vodu, vzduch, krmení a stelivo (převzato a upraveno z Charles River Laboratories Inc.) | 15 |
| Obrázek 1.2: Otevřená chovná nádoba (zdroj: Tecniplast S.p.A)..... | 17 |
| Obrázek 1.3: Statický mikroizolátor (zdroj: Tecniplast S.p.A). | 18 |
| Obrázek 1.4: Izolátor (zdroj: Class Biologically Clean Ltd). | 19 |
| Obrázek 1.5: Individuálně ventilovaná chovná nádoba typ GM500 (zdroj: Tecniplast S.p.A). | 21 |
| Obrázek 1.6: Pozice pro chovnou nádobu v DVC stojanu s deskou na monitoring aktivity zvířat a vlhkosti podestýlky a postranními elektrodami (zdroj Tecniplast S.p.A). | 22 |
| Obrázek 3.1: Umístění chovných nádob dle pohlaví do stojanu DVC a jejich rotace při každém přestýlání (zdroj Ulfhake, Honetschläger et al., 2022)..... | 36 |
| Obrázek 3.2: Rozmístění elektrod v DVC desce a jejich příslušnost k přední (front area) a zadní (rear area) části chovné plochy (zdroj Ulfhake, Honetschläger et al., 2022). | 37 |

9 Seznam grafů

| | |
|---|----|
| Graf 4.1: Porovnání délky intervalů přestýlání chovných nádob v první a druhé fázi pokusu | 40 |
| Graf 4.2: Porovnání délky intervalů přestýlání chovných nádob v první a třetí fázi pokusu | 41 |
| Graf 4.3: Porovnání procentuální změny délky intervalů ve druhé a třetí fázi pokusu | 42 |
| Graf 4.4: Porovnání délky intervalů první, druhé a třetí fáze v nádobách s rodičovskými chovnými zvířaty..... | 44 |
| Graf 4.5: Porovnání procentuální změny délky intervalů ve druhé a třetí fázi v nádobách s rodičovskými chovnými zvířaty..... | 45 |
| Graf 4.6: Redukce počtu přestlání všech chovných nádob ve druhé a třetí fázi pokusu | 46 |
| Graf 4.7: Redukce počtu přestlání ve druhé a třetí fázi v nádobách s chovnými zvířaty | 47 |
| Graf 4.8: Intervaly přestýlání chovných nádob během sledování welfare zvířat..... | 48 |
| Graf 4.9: Průměrná aktivita zvířat za 24 hodin naměřena uprostřed přestýlacího cyklu 1 x za 7 dní | 49 |
| Graf 4.10: Průměrná aktivita zvířat za 24 hodin naměřena uprostřed přestýlacího cyklu 1 x za 14 dní | 50 |
| Graf 4.11: Průměrná aktivita zvířat za 24 hodin naměřena uprostřed přestýlacího cyklu doporučeného dle DVC..... | 50 |
| Graf 4.12: Porovnání průměrné aktivity zvířat za 24 hodin v chovných nádobách se dvěma zvířaty a různým intervalem přestýlání | 51 |
| Graf 4.13: Porovnání průměrné aktivity zvířat za 24 hodin v chovných nádobách se třemi zvířaty a různým intervalem přestýlání | 52 |
| Graf 4.14: Porovnání průměrné aktivity zvířat za 24 hodin v chovných nádobách se čtyřmi zvířaty a různým intervalem přestýlání | 52 |
| Graf 4.15: Porovnání průměrné aktivity obou pohlaví za 24 hodin a mezi partnerskými institucemi | 53 |
| Graf 4.16: a) Průměrná aktivita obou pohlaví za 24 hodin v rámci 5 přestlání podestýlky; b) relativní vliv pohlaví na aktivitu zvířat | 54 |
| Graf 4.17: Aktivita zvířat 1 hodinu po přestlání chovné nádoby | 55 |

| | |
|---|----|
| Graf 4.18: Porovnání aktivity zvířat po přestlání chovné nádoby ve skupině 2 myši | 56 |
| Graf 4.19: Porovnání aktivity zvířat po přestlání chovné nádoby ve skupině 3 myši | 57 |
| Graf 4.20: Porovnání aktivity zvířat po přestlání chovné nádoby ve skupině 4 myši | 57 |
| Graf 4.21: Porovnání průměrné aktivity samic a samců v 5 po sobě jdoucích přestýlacích cyklech | 58 |
| Graf 4.22: Aktivita zvířat den před zjištěním zranění zad | 60 |
| Graf 4.23: Aktivita zvířat den před zjištěním zranění zad a penisu | 60 |
| Graf 4.24: Porovnání průměrné aktivity zvířat uprostřed přestýlacího cyklu s průměrnou aktivitou 1 den před úhynem v chovné nádobě se čtyřmi zvířaty ve skupině DVC | 61 |
| Graf 4.25: Pozice toalety. a) procentuální vyjádření případů beze změny lokality toalety po přestlání. b) procentuální vyjádření umístění toalety v přední (front latrine) nebo zadní části (rear latrine) chovné nádoby | 62 |
| Graf 4.26: a) Frontalita ve vztahu k pozici toalety v průběhu 14 dnů po přestlání chovné nádoby pro obě pohlaví. b) Relativní výsledek frontality mezi pohlavími a pozicí toalety, kdy bílé pozadí značí toaletu umístěnou v přední části chovné nádoby | 63 |

10 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 3.1: Rozdělení zvířat do skupin pro vytvoření algoritmu. | 33 |
| Tabulka 3.2: Rozdělení skupin a počtů zvířat | 34 |
| Tabulka 3.3: Měřené parametry | 35 |
| Tabulka 4.1: Zranění a úhyny v průběhu sledování zvířat..... | 59 |

11 Seznam použitých zkratk

| | | |
|-------|-------|---|
| DVC | | digitálně ventilovaná chovná nádoba |
| EMP | | elektromagnetické pole |
| IMG | | Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i. |
| IVC | | individuálně ventilovaná chovná nádoba |
| KI | | Karolinska Institute, Švédsko |
| LUMC | | Leiden University Medical Center, Nizozemsko |
| SOPF | | specifických a oportunistických patogenů prostý |
| SPF | | specifických patogenů prostý |
| UGA | | Universite' de Grenoble Alpes, Francie |
| UV | | ultrafialové |
| resp. | | respektive |
| tzn. | | to znamená |

12 Příloha - publikace

RESEARCH ARTICLE

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

B. Ulfhake^{1*}, H. Lerat², J. Honetschlager³, K. Pernold¹, M. Rynekrová³, K. Escot², C. Recordati^{4,5}, R. V. Kuiper^{6,7}, G. Rosati⁸, M. Rigamonti⁸, S. Zordan⁸, J.-B. Prins^{9,10}

1 Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, **2** Université Grenoble-Alpes, UMS hTAG Inserm US046 CNRS UAR2019, Grenoble, France, **3** Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic, **4** Department of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of Milan, Lodi, Italy, **5** Mouse and Animal Pathology Laboratory, Fondazione Unimi, Milano, Italy, **6** Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden, **7** Norwegian Veterinary Institute, Section Aquatic Biosecurity Research, Oslo, Norway, **8** Tecniplast SpA, Buguggiate (Va), Italy, **9** Central Animal Facility, PDC, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands, **10** The Francis Crick Institute, London, United Kingdom

* brun.ulfhake@ki.se



OPEN ACCESS

Citation: Ulfhake B, Lerat H, Honetschlager J, Pernold K, Rynekrová M, Escot K, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281>

Editor: Gregg Roman, University of Mississippi, UNITED STATES

Received: September 8, 2021

Accepted: April 5, 2022

Published: May 25, 2022

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281>

Copyright: © 2022 Ulfhake et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The data relevant to this study are available from the Dryad repository at DOI: [10.5061/dryad.ksn02v75q](https://doi.org/10.5061/dryad.ksn02v75q).

Abstract

Mice respond to a cage change (CC) with altered activity, disrupted sleep and increased anxiety. A bi-weekly cage change is, therefore, preferred over a shorter CC interval and is currently the prevailing routine for Individually ventilated cages (IVCs). However, the build-up of ammonia (NH₃) during this period is a potential threat to the animal health and the literature holds conflicting reports leaving this issue unresolved. We have therefore examined longitudinally in-cage activity, animal health and the build-up of ammonia across the cage floor with female and male C57BL/6 mice housed four per IVC changed every other week. We used a multicentre design with a standardised husbandry enabling us to tease-out features that replicated across sites from those that were site-specific. CC induce a marked increase in activity, especially during daytime (~50%) when the animals rest. A reduction in density from four to two mice did not alter this response. This burst was followed by a gradual decrease till the next cage change. Female but not male mice preferred to have the latrine in the front of the cage. Male mice allocate more of the activity to the latrine free part of the cage floor already the day after a CC. A behaviour that progressed through the CC cycle but was not impacted by the type of bedding used. Reducing housing density to two mice abolished this behaviour. Female mice used the entire cage floor the first week while during the second week activity in the latrine area decreased. Measurement of NH₃ ppm across the cage floor revealed x3 higher values for the latrine area compared with the opposite area. NH₃ ppm increases from 0–1 ppm to reach ≤25 ppm in the latrine free area and 50–100 ppm in the latrine area at the end of a cycle. As expected in-cage bacterial load covaried with in-cage NH₃ ppm. Histopathological analysis revealed no changes to the upper airways covarying with recorded NH₃ ppm or bacterial load. We conclude that housing

Funding: The work at IMG was funded by IMG. The work at UGA was funded by UGA. The work at KI was funded by Karolinska Institutet and the Swedish National Research Council (Grant 2020-02009-3). The work at LUMC was funded by the LUMC. DVC[®] equipment at LUMC and UGA was made available by Tecniplast SpA. S. Zordan, M. Rigamonti and G. Rosati were employed by Tecniplast SpA, which provided support in the form of salaries. Tecniplast SpA and the other funding bodies did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of the authors are articulated in the 'author contributions' section.

Competing interests: The authors declare no conflict of interest. Tecniplast SpA (Via I Maggio 6, 21020 Buguggiate (Va), Italy) is a commercial company selling the DVC[®] system. However, this does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials. We have read the journal's policy and the authors of this manuscript have no competing interests. The data recorded at each site remains the intellectual property of respective site.

of four (or equivalent biomass) C57BL/6J mice for 10 weeks under the described conditions does not cause any overt discomfort to the animals.

Introduction

The mouse (*Mus musculus*) is the species most used in biomedical research. The cage environment and husbandry procedures are designed to ensure welfare and health of the animals, which in their turn impact experimental outcome and reproducibility and may introduce confounding effects [1–6]. In the care of small rodents, the recurring cage change is a routine procedure to prevent over soiling of the internal cage milieu. The interval between subsequent cage changes is the subject of a large body of studies considering different types of housing systems [7–24], housing density [7, 13, 19, 20, 24–26], strain, age and sex of the animals [13, 14, 19, 20, 24, 25, 27], and bedding materials used [16, 17, 23, 25, 28–31]. In several studies, the build-up of ammonia (NH₃) during the period between cage changes has been reported as a critical parameter [9, 10, 13, 14, 16, 17, 19–21, 23–25, 27, 28, 31–34], because of its potential threat to animal health [7, 9, 13, 16, 20, 21, 24, 25, 35–38] (see also Toxicological Review of Ammonia Noncancer Inhalation [CASRN 7664-41-7] Supplemental Information, September 2016).

However, the issue of the extent of that threat remains unresolved. The outcomes reported from facility studies with similar type of holding systems (e.g. different types of individually ventilated caging systems, IVCs) are not consistent except for static microisolators where the reports are in general agreement [16, 17, 21, 24, 33]. Some studies report low NH₃ values for IVC systems even with a prolonged cage-change interval of 2, 3 or even 4 weeks, while others observed higher NH₃ values even with weekly changes [7, 9, 11, 13–17, 19, 20, 22, 23, 39]. A separate issue is the question of the safe exposure limit for small rodents [11, 13, 21, 22], and if the commonly adopted human work-place exposure limit is relevant for mice (25 ppm on average across 8h with accepted peak values of 50ppm; see EPAs Toxicological Review of Ammonia Noncancer Inhalation [CASRN 7664-41-7] Supplemental Information, September 2016)? Studies looking into in-cage microenvironment and reporting histopathological analysis of the animals are inconsistent and across studies histopathological observations do not seem to correlate with observed in-cage NH₃ ppm (c.f. [7, 16, 20, 24, 33, 40]). As reviewed elsewhere, the different techniques used for assessing in-cage NH₃ ppm may explain some of these differences [41]. Questions remain to what extent the recorded NH₃ ppm:s correspond to the real exposure of the animals and if the histological stigmata observed can be ascribed to environmental NH₃ exposure with certainty [33]. In the facility studies cited above, the NH₃ ppm was most often obtained with a probe inserted through a passage in the cage wall taking a point measurement at a level 1–3 cm above the bedding (*idem*). The sampling was then repeated on a daily, weekly or once per cage change basis and used as a proxy for the real exposure of the animals (*idem*). A single point in-cage NH₃ measurement may not be sufficient considering the variance in NH₃ ppm across the cage floor [16, 42] and combined with the different NH₃ detection technique used, help to explain the lack of consistency between studies as well as the disagreement with histopathological observations of the airways in small rodents after controlled acute and chronic exposure to NH₃ (nose-only or chamber with clamped NH₃ ppm [33, 38, 40]).

Although most facility studies on in-cage microenvironment including those with extended cage-change period report different health outcomes, data on the spontaneous in-cage pattern

of rest and physical activity is missing. We recently published cumulative records of the spontaneous in-cage activity of female C57BL/6J subjected to a weekly cage-change, including the impact of cage-change and other husbandry routines [2]. Although the cage change results in a decrease of the in-cage load of mould and bacteria, hence NH₃ concentration (ppm), and an increase of soil-free cage floor space [43, 44], the animals react with altered behaviours and responses, increased heart rate and mean arterial blood pressure, disrupted sleep patterns, and increased levels of stress hormones [1, 2, 9, 45–51].

We report here on a multicentre study where we recorded and analysed cumulative records of spontaneous in-cage activity and NH₃ ppm across the cage floor during five consecutive bi-weekly cage-change cycles. The four participating centres used identical husbandry protocols, and both male and female C57BL/6J mice were kept in digital ventilated cages, i.e. IVCs complemented with an external sensor-board enabling collection of in-cage activity data 24/7 (DVC[®]; Tecniplast S.p.A.) [2, 52]. Three times a week, ammonia concentrations were measured under flow conditions across the front, middle, and rear of each cage. At one centre, additional experiments were performed assessing in-cage bacterial load, varying cage-change intervals, bedding materials, and numbers of animals per cage. At the end of the experiment, tissues of the upper airways from one randomly chosen animal from each cage was analysed for histopathological changes (n = 20). As a reference served germ-free (GF) animals of the same strain, sex and age, as GF mice are known to have lower endogenous levels of NH₃ and are devoid of bacteria responsible for generating NH₃ from urea in the cage environment [53–55].

Materials and methods

International centres

This study was conducted at four European centres during summer-early autumn 2018: Karolinska Institute, Sweden (KI site), Leiden University Medical Center, The Netherlands (LUMC site), Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic (IMG site), Université de Grenoble Alpes, France (UGA site). Three centres (KI site, LUMC site and UGA site) recorded animal locomotion data and performed ammonia measurements while IMG site recorded in-cage activity only.

Ethical considerations

The care and use of all mice in this study were under national animal protection regulations in accordance with EU Directive 2010/63/EU. They were approved by the respective institutional Animal Welfare Committees (AWB).

License no. KI: by the Regional Ethics Council (Stockholms Djurförsöksetiska nämnd) project license N116-15

License no. LUMC: the study plan 'Ammonia detection in IVC cages in a DVC[®] rack with mice under flow conditions during normal husbandry and care procedures' was approved by the LUMC Animal Welfare Body

License no. IMG: 66866/2015-MZE-17214 from the Ministry of Agriculture

License no. UGA: C 38 516 10 006, from Direction Départementale de la Protection des Populations.

Animals and husbandry

In this study, all centres used specific pathogen-free (SPF) C57BL/6J mice (*Mus musculus*) of both sexes, delivered by commercial breeders at the age of 6–8 weeks (Table 1). The SPF status

Table 1. Husbandry routines.

| | <i>IMG</i> | <i>KI</i> | <i>LUMC</i> | <i>UGA</i> |
|---|--|--|--|--|
| Start of the Project | 14th August 2018 | 20th June 2018 | 20th July 2018 | 11th September 2018 |
| Animal strain | C57BL/6J OlaHsd (Envigo, Italy) | C57BL/6J (Charles River, Germany) | C57BL/6J (Charles River, Germany) | C57BL/6JRj (Janvier Labs, France) |
| Animal identification | Ear tag (National Band & Tag Co) | Ear punch | Ear punch | Ear punch |
| Nesting | Bed-r'Nest (Datesand) | Bed-r'Nest (Datesand) | Bed-r'Nest (Datesand) | Bed-r'Nest (Datesand) |
| Bedding | Aspen 5x5x1mm– 100g (Tapvei) | Aspen 5x5x1mm– 100g (Tapvei) | Aspen 5x5x1mm– 100g (Tapvei) | Aspen 5x5x1mm– 100g (Tapvei) |
| Cage Change method | Tail | Forceps prevailing or hand | Tail | Forceps |
| PPE | Gloves, face covering, hair cover, gown | Gloves, no face covering, hair cover, gown | Gloves, face covering, hair cover, gown | Gloves, face covering, hair cover, gown |
| Rotation of cages after cage change | Yes | Yes | Yes | Yes |
| Diet | SDS R3 (irradiated) | SDS R3 (irradiated) | SDS R3 (irradiated) | SDS R3 (irradiated) |
| Water | RO chlorinated water in bottles. Water bottle changed every week | Weakly chlorinated tap water. Water bottle changed every week | Autoclaved, non-chlorinated tap water. Water bottle changed every week | RO ¹ water filtered (0.3µ). Water bottle changed every week |
| Dark-Light Cycle hours | Dark period 4:00 pm—4:00 am with 10min of dawn and dusk | Dark period 4:00 pm—4:00 am without dawn and dusk | Dark period 7:00 pm—7:00 am with 30min of dawn and dusk | Dark period 7:30 pm—7:30 am without dawn and dusk |
| Light Levels [lux] mean (1st-3rd quartiles)(min-max) | A rack column: 66(58–68)(57–78) F rack column 45(42–46)(39–54) ² | A rack column: 32 (21–40) (17–57) ² F rack column: 33 (23–42) (16–59) ² | A rack column: 11(8–11)(7–21) ² F rack column: 11(8–11)(7–21) ² | Only F rack column: 20(14–28)(12–34) ² |
| Room T and R.H. [°C] [%] | T within 22–24 °C | T = 20.2 (20.1–20.4)(19.3–22.6) ² | T = 21.0 (21.0–21.1)(19.7–22.5) ² | T = 21.7 (21.2–22.2)(19.5–23.5) ² |
| Mean(1st-3rd quartiles)(min-max) | R.H. within 40–60% | R.H. = 59 (52–63)(44–75) ² | R.H. = 47 (42–56)(38–64) ² | R.H. = 40 (31–50)(17–64) ² |

¹ Reverse osmosis.

² Order of values: mean (1st–3rd quartile)(minimum—maximum values).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.t001>

at all four institutes was defined as to exclude all the recommended infectious agents to monitor for laboratory mice listed by the FELASA recommendations for health monitoring [5, 6].

Mice were observed daily by the animal care staff for signs of ill-health and compromised wellbeing according to local requirements by national regulations under the EU Directive 2010/63/EU [56]. Animals were weighed every other week at the time of the cage-change.

According to the centre's standard routine, the animals were marked by ear punch or ear tag upon arrival. Separated by sex, the animals were randomised (for details see S1 File, Randomisation) to different groups and housed 4 mice per cage on a single rack (DVC[®] rack, Tecniplast). The mice were kept in modified (see in the DVC[®] equipment section for further details) Individually Ventilated Cages (IVC GM500, Tecniplast SpA), equipped with DVC[®] boards positioned underneath the cage and fixed to the rack.

All cages were prepared with 100g of autoclaved aspen chip (AC) bedding (Tapvei, 5x5x1mm) and provided with one puck of Bed-r'Nest as nesting material (Datesand). The bedding quantity was based on the target volume consistent with Tecniplast's standard requirement practice. These requirements are defined as to reach the best compromise between air ventilation efficiency based on GM500 air-flow dynamics, sufficient bedding depth to provide



Fig 1. a) Modified IVC GM500 cage with holes drilled in the long side, sealed with screws and nuts inserted into the DVC[®] rack. b) Lateral view of the modified IVC GM500 cage with the NH₃ detector probe inserted across the width of the cage to perform the ammonia measurement. c) Dräger X-am[®] 8000 device with a 40 cm long rubber tube, dust filter and copper probe.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g001>

the animals with the opportunity to perform digging activities, and to reduce bacterial growth as much as possible under animal holding room conditions as per Annex 3 of 2010/63/EU. Likewise, based on the manufacturer's advice the amount of corn cob (CC) used as alternative bedding at KI (Bed-o'Cobs ¼" from Datesand) was set at 200gms per cage.

All animals were fed *ad libitum* with irradiated diet (Standard Diet RM3, Special Diet Service), and had *ad libitum* access to Reverse Osmosis (RO) chlorinated water, weakly chlorinated tap water or autoclaved tap water depending on the centre. At all centres, the holding room temperature (T) and relative humidity (RH) were set to keep relative humidity and temperature within the legally defined ranges as per Annex 3 of 2010/63/EU (Table 1). Mice were kept in a 12h light/dark cycle, with or without dawn and dusk dependent on the holding room standard of the centre (Table 1). The cage change procedure was performed every second week and carried out by forceps or tail handling depending on the centre's routine. All the relevant husbandry information is reported in Table 1. Recorded time of day of the five cage changes at the different sites is shown in Fig 1 of S1 File.

DVC[®] equipment

All centres were equipped with the same type of DVC[®] rack (Tecniplast SpA) with 60 cage-positions. The equipment is a standard IVC rack with electronic boards in all cage positions. It enables automated, nonintrusive 24/7 recording of spontaneous in-cage floor (500 cm²) activity [2, 52].

All cages were individually ventilated by an Air Handling Unit (SmartFlow blowers, Tecniplast SpA), providing HEPA-14 filtered air to all inserted cage at 75 air changes per hour (ACH) and negative pressure inside the cage (-20%, negative mode).

All centres were provided with modified IVC cages with three holes drilled 1.5 cm above the bedding level along the cage's lateral wall corresponding to the rear, middle, and front area of the cage floor. When not in use, each hole was sealed by a screw and a nut (Fig 1a).

Ammonia (NH₃) concentration (ppm) measurements

The recording of ammonia levels, i.e. NH₃ ppm values, from every cage while inserted in the rack under airflow conditions, was carried out using an industrial ammonia detector device (Dräger X-am[®] 8000, Dräger) with an electrochemical sensor connected via a dust filter and a 40 cm long rubber tube to the open end of a copper probe with multiple perforations at equal distance along its axial dimension. The copper probe's length was designed to extend across the full length of the cage's shorter planar dimension when introduced from the side of the

modified cage (see Fig 1b and 1c). According to the supplier datasheet, the Dräger X-am[®] 8000 has a dynamic range spanning from 0 to 300 ppm of NH₃. All detectors were calibrated by Dräger immediately before the start of the experiment. Methods and technology used to measure intracage NH₃ levels have been reviewed by Morrow et al. [41]

Experimental protocol

On the day of arrival, animals were randomly assigned to IVC cages to form 10 groups of 4 male mice each and 10 groups of 4 female mice each (for details see above). The 10 cages with male animals and the 10 cages with female animals were inserted in alternating rows of the lateral (A and F) columns of the DVC[®] rack (Fig 2). This lateral placement was needed to allow insertion of the ammonia detector probe from the cage's lateral side to perform each NH₃ measurement under flow condition. The central (B-E) columns were filled with cages without animals, but with bedding and enrichment similar to the cages with animals. The animals were allowed to acclimatise to their new environment for 14 days.

Full cage changes (cage body plus cage top) were performed every 14 days for five consecutive cycles resulting in a total of ten weeks. Neither dirty bedding nor part of the used enrichment was transferred from the dirty to the clean cage. Between two cage changes, operators took ammonia measurements inside the cages at six instances for LUMC site (days 2, 4, 6, 8, 11, 13 just before the next cage change procedure) and five for the others (days 2, 5, 7, 9, 13). For a detailed protocol of NH₃ measurements see S1 File.

During each cage change procedure, animals were weighed as one aspect of animal welfare surveillance.

To mitigate possible effects due to different light levels along the vertical axis of the rack columns used, each cage was moved two positions down at each cage-change. The bottom two cages on each side of the rack were moved to the top two positions (see Fig 2b).

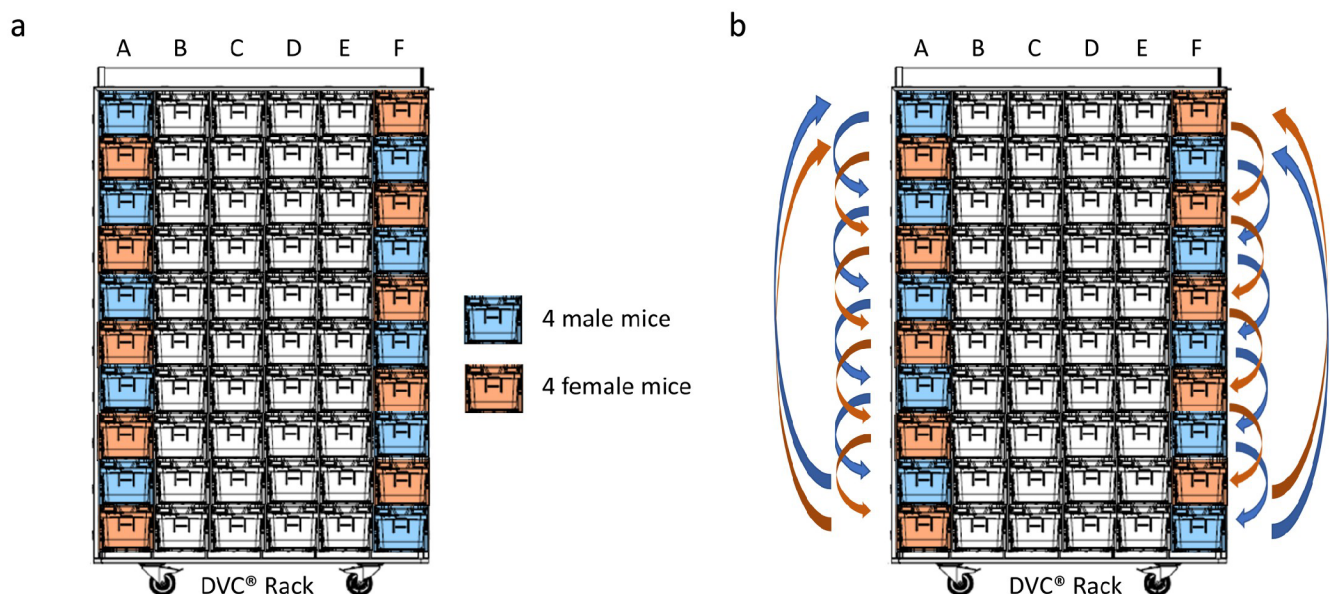


Fig 2. a) Lateral DVC[®] rack columns were alternately filled with cages with female (orange) and the cages with male mice (light blue). The central (B-E) columns were filled with empty cages (white). b) Cage movement scheme at each cage change.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g002>

In-cage bacterial growth in-between cage-changes and tissue harvesting for post hoc histopathological examination

At the KI site, all cages were swabbed for bacterial load assessment. Swabbing was done at the end of the five bi-weekly cage-change cycles, at the end of the two cycles of weekly cage change and at the end of the second cycle, each cage was swabbed once more. Swabbing included all four walls and corners at the level of the bedding material. After swabbing, each swab was stored in media from the service provider Eurofins (Swedish branch). According to instructions from the service provider, the swabs in media were shipped to Eurofins for analysis of aerobic microorganisms at 30°C (LPP0C-1, UM4PK-1) according to AFNORM (Certificate no 3M 01/01-09/89; by Eurofin Food and feed Testing, Sweden) within 24 h at ambient temperature. Results are in colony-forming units (CFU) and analysed after log conversion to normalise the data.

Twenty animals (ten males and ten females), one from each cage, were randomly selected, and euthanised, followed by dissection of the upper airways for histopathological analysis. Briefly, the animals were decapitated under isoflurane anaesthesia. Skull and brain together with lower jaw were removed, and the remaining specimen was irrigated with 4% buffered (pH 7) paraformaldehyde (PFA) [24, 57]. The tissue was kept in 4% PFA for 24 hours at 4°C and then transferred to 70% ethanol and stored at 4°C until decalcification in 85% formic acid/citrate (pH 2.2) until soft. Coronal sections of the nasal cavities at different levels were dissected and embedded in paraffin. Paraffin blocks were cut in 4 µm sections on a rotary microtome. Sections were mounted on coded slides, and stained with haematoxylin and eosin (HE) for analysis by light microscopy. Histopathological analysis was performed in compliance with previously published protocols [13, 24, 57] and executed blinded and independently by two histopathologists (CR and RK).

As a reference of mice with a facultative low exposure to NH₃ [58, 59] served twenty, age and sex-matched C57BL/6J mice raised, maintained and shipped as germfree (GF) (Animal Research Center, Ulm University, Oberberghof, Ulm, Germany). See (S1 File, Germ free mice) for details on the generation and maintenance of the GF colony at the Ulm center. GF mice have been shown to produce less NH₃ in their intestines and to have lower serum levels than mice with microbiota [53]. Importantly, urea excreted with the urine deposits will not be catalyzed to NH₃ in a germ-free environment [54, 55]. Upon arrival in Stockholm, Sweden, the animals were immediately euthanised by decapitation while under isoflurane anaesthesia, dissected and the tissue processed as described above. Upon breaking the cylinder seals, materials from each transport cylinder was secured by aseptical technique and sent back to the service provider for analysis to confirm the germ free status upon arrival at KI.

Seven different histopathological entities (Table 2) were ranked on a scale from not present (0) to severe (5). From each animal, one serial section (n = 40) was immunostained with cleaved-Caspase 3 (asp175) (cat. No. 9661, Cell Signaling Technologies) for the assessment of apoptosis [60]. The number of cleaved-Caspase-3 positive cells were counted in the olfactory and respiratory epithelium in the half upper portion of the nasal cavities, and their number was normalised for the length of the evaluated epithelium. In total, nine variables were included in the analysis (Table 2).

Impact of bedding material and housing density on in-cage activity and NH₃ levels

At the KI site, additional experiments using different bedding material and different housing density were carried out during late autumn and winter 2018/2019. Specifically, two groups of ten cages with four male mice in each (same strain, breeder, and age as in the main study

Table 2. Histopathological variables and anatomical location.

| Location | Stigmata | Reporting | Interpretation |
|---|------------------------------|---|------------------------------------|
| Nasal septum | Accumulation of “amyloid” | Background, common spontaneous nasal lesion, age-related [13] | Chronic; not reversible? |
| Respiratory epithelium (RE)(Septum, turbinates) | Hyalinosis | | Chronic; reversible |
| Olfactory epithelium (OE)(dorsal meatus) | Hyalinosis | Spontaneous change, age-related [13] | Chronic; reversible |
| | Apoptotic cells | Possibly pathological | Acute; not reversible |
| | Inflammatory cell infiltrate | [13, 24] | Acute/subacute/chronic; reversible |
| Other | Nasal gland cysts | [13] | Acute/subacute; reversible |

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.t002>

described above) were housed on either aspen chip (AC) bedding or corn cob (CC) bedding (200g of Bed-o’Cobs ¼” from Datesand). Cages with AC and CC, respectively, were inserted in every other slot of the lateral columns of the DVC[®] rack. These 20 cages underwent the same procedures explained in the previous section, but this time only for three consecutive cycles of bi-weekly cage-change. During the cage change at the end of the third cycle, the housing density was lowered to two animals per cage. Another two complete cycles were performed to collect animal activity and NH₃ measurements during the bi-weekly regime.

DVC[®] data processing, data computations, and statistical analyses

DVC[®] metrics. We used activation density metric to measure animal activity in the home cage [52]. Data (raw data resolution is one sample per 250 msec) were aggregated in bins of one minute. We considered day time activity (average of all one minute bins within the lights-on period of each day), night time activity (average within the lights-off period) and, as previously reported [2], diurnality, which is the percentage of daily activity performed during lights-on over the total activity during the 24 hours day (considered as the sum of lights on and lights off activity). Nocturnal species like *Mus musculus* typically display a reversed circadian rhythm [2]. We then analysed activity in the rear (by averaging activity measured by electrodes 1-2-3-4-5-6) and in the front (electrodes 7-8-9-10-11-12) areas (250 cm² each) of the cage separately (Fig 3). We decided to divide the cage floor into two parts and not in multiple minor areas, based on the records of latrine position (see below and the Results section). This allowed us to calculate Frontality, which is the percentage of activity performed in the front part of the cage over the total activity performed across the cage’s entire floor. We used this metric to assess the spatial distribution of activity over time in relation to NH₃ measurements and latrine position.

Since raw DVC[®] capacitance readings are affected by the presence of water and therefore urine [52], we used the DVC[®] technology to identify the position of the latrine inside the cage. We determined the latrine position as the area with the highest difference between the average of capacitance readings of the last night of the cycle and the average over the first night of the cycle (for further information see Fig 5 in S1 File). This procedure was validated towards measured ppm NH₃ and the standard routine where latrine position is determined by visual inspection at cage-change.

It should be noted that since the animals were group housed, all activity data presented in this study are the collective floor activity of all mice in the cage.

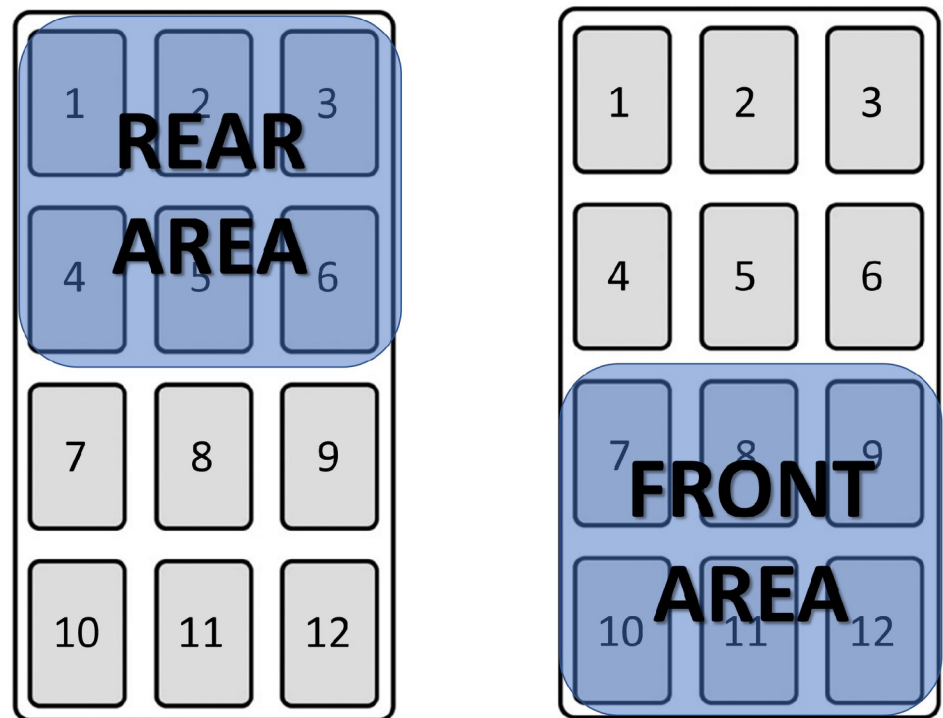


Fig 3. DVC[®] board with 12 electrodes. The rear half of the cage (Rear Area) is covered by electrodes 1-2-3-4-5-6. The front half of the cage (Front Area) is covered by electrodes 7-8-9-10-11-12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g003>

Statistical analysis

To test differences across sites or sexes, cage-change cycles, and days, we performed repeated measures analysis, using the rank-based analysis of variance-type statistic (ATS), as implemented in the nparLD R Software package [61, 62]. We chose a non-parametric test instead of Repeated Measures ANOVA because normality assumptions were violated in some cases. We considered cages as subjects; time, event, and observation-order as within-subject factors (“sub-plot” repeated factors), and sex and site as between-subject factors (“whole-plot” factor). According to authors’ terminology [55], we used either F2-LD-F1 (sex and site as whole plot factors and observation order as the repeated factor) or F1-LD-F2 (sex as the whole-plot factor and event and observation order as the repeated ones), and F1-LD-F1 or LD-F1 when only observation order was used as subplot factor. The statistical analysis of time-series with nparLD is based on rank-order of the observed data, with the relative effect size (p_s) as effect size measure [62]. The difference towards parametric tests being that instead of the mean difference between observations, the rank-order is used to assess the probability that two sets of observations differ ($p_s = 0.5$ means that there is no difference in rank-order), and with longitudinal data if the relative effect size varies across the time-series within the sets of observations.

Comparison of two independent samples, and paired samples, were conducted using non-parametric Mann-Whitney U statistics (U-test and Wilcoxon’s test for matched pairs). In these instances we used the common language (CL) effect size statistics [63–66]. The CL effect size is based on the rank-order (rank sum) of the observed values, and indicates the relative frequency with which the rank sum from one set of observations will be larger than the rank sum of a second set of observations.

Correlation was conducted with the nonparametric Spearman rank correlation. The Spearman correlation coefficient (r_s) indicates the effect size with a range from a perfect inverse covariation ($r_s = -1$), through no covariation ($r_s = 0$) to a perfect positive covariation ($r_s = 1$) of the ranks for two parameters.

We used Python to process and visualize data and R to run the statistical tests.

Histopathological analysis by two independent specialists of coded slides from 20 animals (10 of each sex) and 20 germfree animals (same age, both sexes) of the nostril region, middle and rear part of the upper airways included ranking the prevalence (from 0 = negative to 5 = prevailing) of a range of parameters in each of the three regions (see Table 2). This set of ordinal data from each of the three regions was first analysed using multiple covariance analysis (MCA) [67] controlling for sex and axenic status, and subsequently, run against the in-cage NH_3 ppm and bacterial load records (continuous data) using a mixed model principle component analysis (mixPCA) [68, 69].

Results

Animal health and body weight

During the study, no animal was lost at any of the sites due to unexpected death or removal because of ill-health. Bodyweight time series (Fig 4) showed growth rates of both males and females comparable between sites and to those published for C57BL/6J.

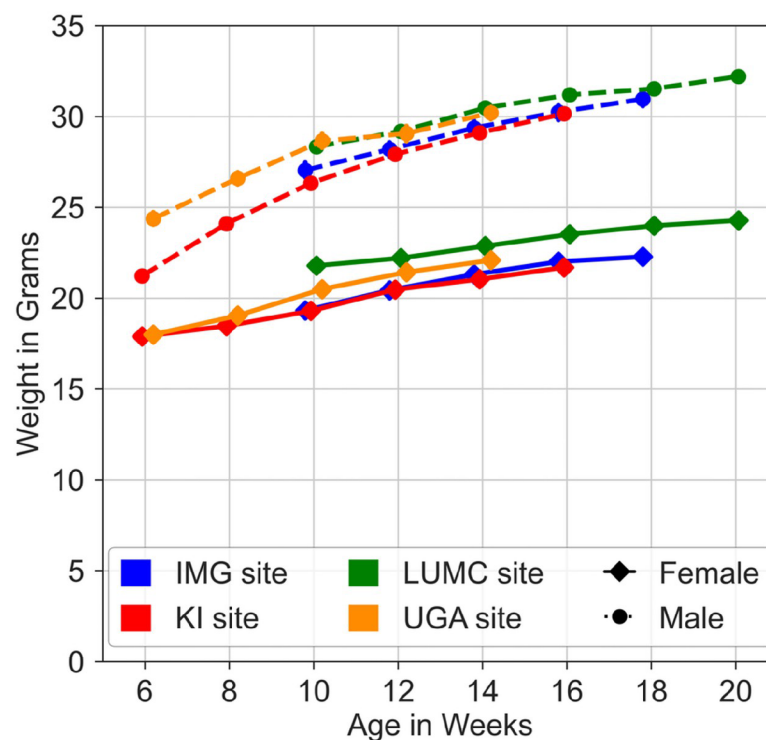


Fig 4. Body weight time series for male and female C57BL/6J mice at the four sites. The different sites have been indicated by colour (see the key to symbols), male data are represented by stippled lines while female data are represented by continuous lines. Data (dots) are mean values \pm SEM for each sex and site.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g004>

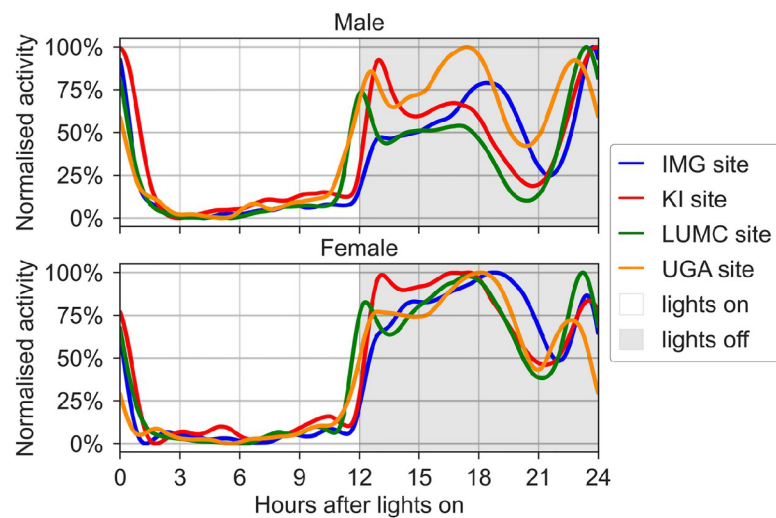


Fig 5. Circadian rhythmicity of in-cage activity of male (upper panel) and female (lower panel) mice at the four sites. The panels show the relative distribution of activity for male (upper panel) and female (lower panel) mice during lights on (ZT 0–12, day) and light off (ZT 12–24, night) (ordinate is % of maximum activity at each site across all cages and cage-change cycles). In greater detail, the graphs represent the average activity pattern across the 24 hours by considering the activity time series (1,440 minutes) for each cage and day (except the day of cage-change), smoothing it with a moving average of 60 minutes and normalising to peak activity [2].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g005>

Circadian rhythmicity of activity during lights-off and lights-on

Most laboratory mice strains like C57BL/6J are nocturnally active and rest during the lights-on phase [70, 71]. C57BL/6J mice show a characteristic and reproducible circadian rhythm to lights-on (zeitgeber time (ZT) 0–12, day time) and lights-off (ZT 12–24, night time) (Fig 5A and 5B; for a corresponding raw data plot see Fig 2 in S1 File). This pattern reproduced well across the four sites and confirm the previous observations [2]. The only minor deviation was the rather slow increase in activity among male mice following lights off at the IMG site.

Across the participating sites, the cumulative night time activity was about x3 that observed for day time and the diurnality appears to be different between sexes. In Fig 6, box plots show the metrics for the average day and night time activity and the relative effect of sex at the four sites (Fig 6a and 6b; see also Fig 3a, 3b in S1 File). Day time activity (Fig 6a and 6b) did not differ significantly between sexes ($P = 0.481$) but between facilities ($p = 1.2E-34$) and across cage-change cycles ($p = 6.2E-10$). During the active period with lights off there was a highly significant difference between males and females ($p = 1.3E-16$) and also some difference between sites ($p = 1.1E-3$) with a significant interaction between site and sex ($p = 3E-6$) (Fig 6a and 6b).

Consistent with this, the fraction of daily activity occurring during lights on, showed a significant difference between sexes ($p = 4.7E-14$) and sites ($p = 1.4E-10$) and also across cage-change cycles ($p = 5.8E-20$) (Fig 3a, 3b in S1 File).

Spontaneous home-cage activity across a cage-change cycle by sex and site

A key rationale of this study is our previous observation that cage-change brings about a major alteration in spontaneous home-cage activity [2]. In order to compare the change of activity over days, irrespective of the total amount of activity, we normalised the activity of each day by the peak of activity during that cage change cycle.

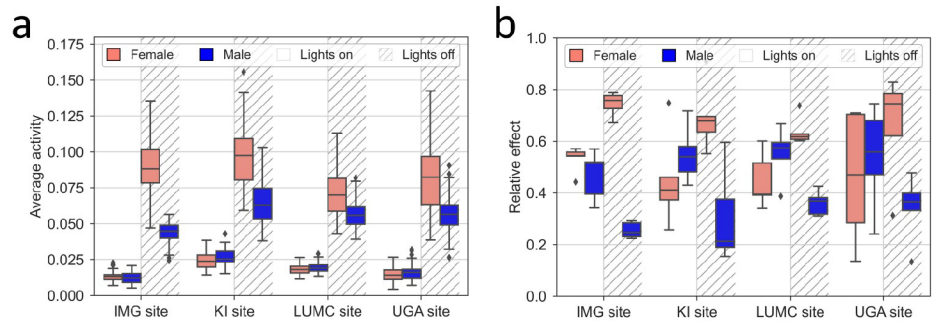


Fig 6. (a) Average activity during day and night time for male and female mice at the four sites. A) Boxplots (with median, 25% and 75% percentiles) show the average activity across the five cage-change cycles, for male (blue) and female (pink) mice at the four sites during lights on and lights off (grey stripes). Note the higher activity among female vs. male mice during lights off. (b) Box plots of the relative effect size of sex during lights on (clear background) and lights off (hatched background) for each site (see [Material and methods](#)). Male (blue) and female (pink). For raw data analysis see Fig 4 in [S1 File](#).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g006>

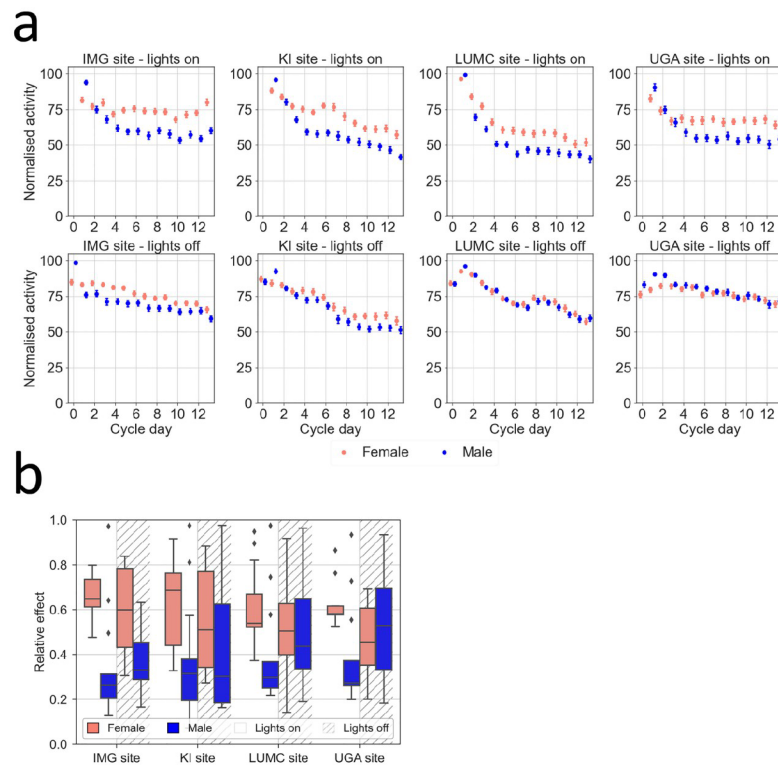


Fig 7. (a) Activity normalised to peak activity (%) during each day (upper row panels) and night (lower row panels) following a cage change. Both daily day and night time activity for each cage was normalised to the peak day/night activity of the cage over the respective cage change cycle. Average normalised activity \pm SEM, for all male (blue) and female (pink) cages, for each day (abscissa) of the period across the five cage change cycles at each site (columns of panels). For day time, day 1 is the day that follows upon a cage change day while for night time day 0 is the night following the cage-change that took place during the preceding day time. Data was plotted separately by day and night for a better visualisation, but the light factor was tested as a repeated factor (subplot factor in nparLD testing). (b) Box plots of the relative effect size of sex during lights on (clear background) and lights off (hatched background) across cage-change cycles for each site (see [Material and methods](#)). Male (blue) and female (pink). For raw data analysis see Fig 4 in [S1 File](#).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g007>

As evidenced by the data presented in Fig 7a, the highest in-cage activity was recorded immediately after cage change (at day 0–1 for lights off and day 1 for lights on; Fig 7) for both male and female mice followed by a gradual decrease in activity by 25%–50% (normalised data, $p = 4\text{E-}129$ to $p = 6\text{E-}20$; non-normalised data, $p = 4.3\text{E-}14$ and $p = 7.3\text{E-}97$; see Fig 3 in S1 File) and a difference between the day time and night time responses indicating that the most marked impact occurs during day time when the animals normally rest (Fig 7b; light as a sub-plot factor, normalised data, $p = 5\text{E-}37$ to $p = 2\text{E-}2$; non-normalised data $p = 0$ and $p = 3.1\text{E-}87$; see Fig 4 in S1 File). An effect by sex on this response was statistically significant only at the IMG and KI sites (Fig 7b; normalised data, $p = 2\text{E-}8$ and $p = 6\text{E-}7$, respectively; non-normalised data, $p = 1.2\text{E-}4$ and $p = 3.2\text{E-}3$, see Fig 4 in S1 File).

Impact by housing density and bedding material on in-cage activity

Both cage housing density and the suitability of different types of bedding materials are currently subject of multiple studies (for references see Introduction). At the KI site, we compared in-cage activity using aspen chips (AC) with corn cob (CC) and different mouse holding densities (Fig 8; for experimental details see Material and methods).

Irrespective of the bedding material used and the housing density, the activity declined to the same extent and with a similar progression post cage change as in the multicenter study reported above (Fig 8a; $p = 6.6\text{E-}69$, 4 mice per cage; $p = 7.4\text{E-}36$, 2 mice per cage). There was a small but significant difference in activity decrease between housing on AC and CC with four mice per cage but not with two mice per cage (Fig 8a and 8b; $p = 1.5\text{E-}4$, 4 mice per cage; $p = 0.41$, 2 mice per cage).

Use of cage-floor and position of latrine

The in-cage life of mice shows a clear organisation with a hierarchy of the standing of the individuals in the group, the building of nest(s) and the assignment of one or more areas as latrine (s). To a large extent, this cage life order is disturbed when we perform a cage-change.

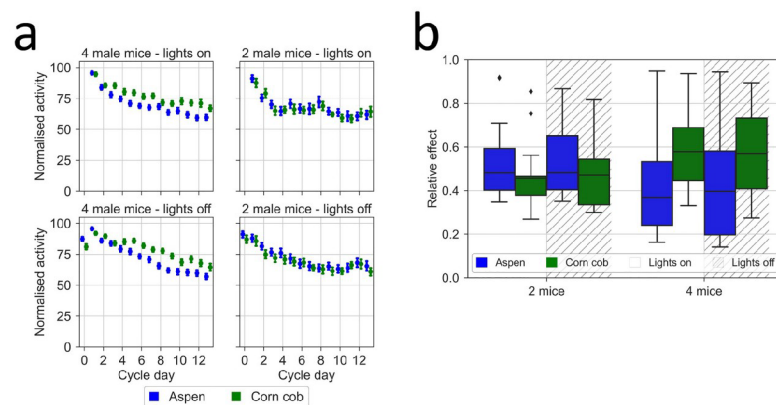


Fig 8. (a) Activity normalised to peak activity (%) during the light (upper panels) and dark (lower panels) periods, for $n = 4$ (left two panels) and $n = 2$ (right two panels) mice per cage, housed on aspen chips and corn cob (see the key to symbols). Data are average normalised activity values \pm SEM. For day time, day 1 is the day that follows upon a cage change day while for night time day 0 is the night that follows upon the cage-change which took place during the preceding day time (day 0) (for a corresponding plot of non-normalised data see Fig 5 in S1 File). (b) Box plots of the relative effect size of type of bedding material on changes in activity during lights on (clear background) and lights off (hatches background) across the cage-change cycle for each housing density shown in (a) (see Material and methods). Aspen chips (blue) and corn cob (green).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g008>

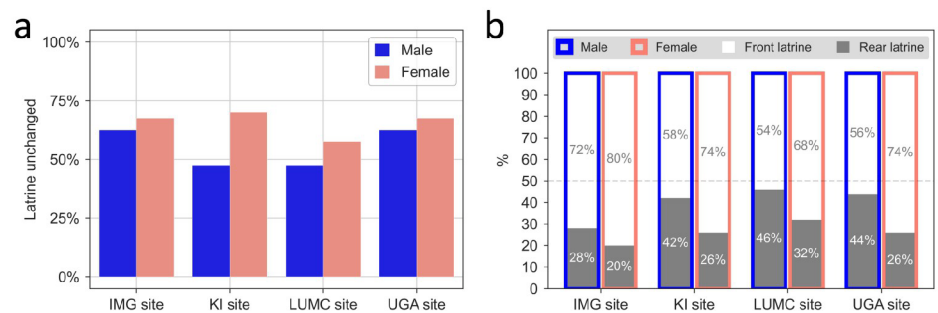


Fig 9. Position of latrine(s). a) Percentage of instances where latrine(s) position was not changed between two consecutive cage-changes by sex and site. b) Bar charts showing the percentage (all cages times cage-change cycles) of front and rear position of the latrine(s) in the cages with male (blue) and female (pink) mice at the four sites.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g009>

As described in Materials and methods (see details in, Fig 6 in *S1 File*), the positions of latrines were defined by the recorded drop in capacitance across the cage-change cycle due to the wetting of the bedding in and around the latrine. We found that the latrine predicted by DVC[®] agreed in 85% cases with the area with the highest ammonia concentration and that the placement of the latrine(s) varied between cage-cycles in all cages. The latrine was re-assigned to the same area of the cage in less than about 2/3rd of the cases, with males being more prone to shift localisation than females (Fig 9a). As depicted in Fig 9b, female mice tended to create the latrine(s) in the front of the cage, while male mice showed no clear preference for front vs rear position of latrines at the UGA, LUMC and KI sites. At the IMG site, males showed a similar preference as the females for having the latrine in the front.

The decision on the placement of the latrine(s) by the mice occurred shortly after cage-change. As shown in the heat map of the Frontality of activity (i.e. the percentage of activity that occurred in the frontal section of the cage floor) vs. latrine position across cage-change cycles (Fig 10 showing an example from the UGA site; examples from other sites are shown in Figs 7–9 in *S1 File*), male mice are more active in the regions of the cage floor being devoid of the latrine(s) already the day after a cage change. A trend that continued till the end of the cage-change cycle at each of the sites (see below).

Expanding on the in-cage activity (Figs 6–8 and 10) and latrine position data presented above (Fig 9), we deepened the analyses of Frontality (Fig 11) for each day of the cage-change cycle in relation to the locations of the latrines across all five cycles at each site. The data plotted for each site illustrate that the percentage of daily activity recorded from the frontal half of the cage-floor increases over time when the latrine is positioned in the rear, while it decreases when the latrine is in the front. This was significant at all sites (interaction between day and latrine position, $p = 9E-34$ to $p = 1.2E-04$).

Male and female C57BL/6J mice appear to differ in the evolution of Frontality over time, female mice tend to reduce activity by 5-to-10% in the latrine area and this occurs during the 2nd week of the cage change (lower panels) while males disclose a much more robust (~25%) shift of the activity to the latrine free area already on day one at the IMG, KI and UGA sites and on day two at the LUMC site (Fig 11a). This shift in activity was significant at the UGA and LUMC sites but not at the other sites (Fig 11b; interaction between sex, day and latrine position, $p = 2.7E-02$ and $p = 1.1E-02$ respectively; while $p = 4.4E-01$ at IMG and $p = 8.3E-02$ at KI). Thus, latrine position had no statistically significant effect on female mice preference for frontality at the IMG and KI sites across the full cage-change cycle (Fig 11b).

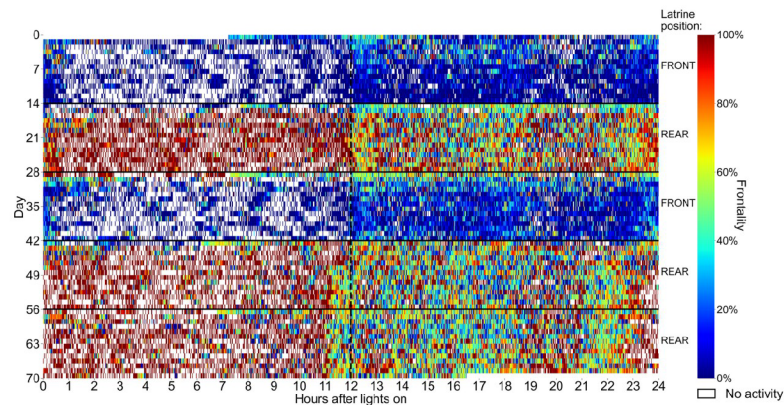


Fig 10. Minute-based frontality and latrine positions day-by-day across cage-change cycles. Heatmap showing the Frontality for each minute of one male example cage at the UGA site for the five cage-change cycles (for corresponding information of the three other sites see Figs 7–9 in *S1 File*). Frontality is the percentage of activity performed in the front-half of the cage-floor over the total activity performed on the entire cage floor, therefore red indicates that activity min^{-1} is performed mostly in the front half of the cage, while blue indicates that activity is performed mostly in the rear. White denotes the absence of activity. Lights on at ZT 12 has been indicated by a dashed black vertical lines so that the period with lights on is on the left part of the figure and the period with lights-off is on the right part. The position of the latrine(s) during each cycle is indicated at the right of the heatmap. Note the switch from summertime to wintertime week 47 (to 70).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g010>

In the separate experiment performed at the KI site, animals housed 4 to a cage tended to be less and less active in the region of the latrine (Fig 12; latrine factor, $p = 2\text{E-}62$; interaction between latrine and day, $p = 2.8\text{E-}92$), irrespective of the type of bedding materials used (bedding type factor, $p = 0.61$). In contrast, animals housed two per cage didn't shift their activity span resulting in no impact on frontality by latrine position irrespective of the type of bedding materials used (latrine factor, $p = 0.32$; bedding type factor, $p = 0.11$).

Intra-cage NH_3 levels across cage-change cycles

NH_3 levels (ppm) were measured repeatedly between successive cage changes across the front, the middle and the rear area of each cage floor under flow conditions at KI, LUMC and UGA (see *Material and methods*). Fig 13 shows the average NH_3 ppm calculated for each cage area (latrine area, and area opposite, which can be front or rear, and middle) at the end of the 14-days cycle, for each sex and site.

In Figs 10–12 we show that with days passing between cage changes the mice allotted more and more of their activity to the latrine free part of the floor. For this reason and also the observation that the latrine was never found to be in the middle portion of the cage, we deepened the analysis of NH_3 levels by analysing the NH_3 in the latrine area of the floor vs the opposite latrine free floor area (Fig 14). As evident from the plots, there is an increase in NH_3 ppm with more days post cage change (KI $p = 6.6\text{E-}51$, LUMC $p = 2.2\text{E-}77$, and UGA: $p = 1.7\text{E-}90$) with significant differences between the latrine area and the opposite latrine free area (KI $p = 3.7\text{E-}6$, LUMC $p = 7.1\text{E-}11$, and UGA: $p = 5.1\text{E-}43$) and between sexes (KI $p = 4.1\text{E-}03$, LUMC $p = 1.8\text{E-}2$, and UGA: $p = 3\text{E-}8$). In the latrine area, the NH_3 ppm remained at 0 on day 2 at both LUMC and UGA, and was slightly above 0 at KI. For males, it then increased and exceeded 25 ppm on day 5–6 and at KI and UGA exceeded 50–75 ppm, towards the end of the cycle (Fig 14). At LUMC, the progression was delayed during the first week, but then accelerated to ≥ 75 ppm towards the end of the cycle. In cages with females, ammonia levels in the

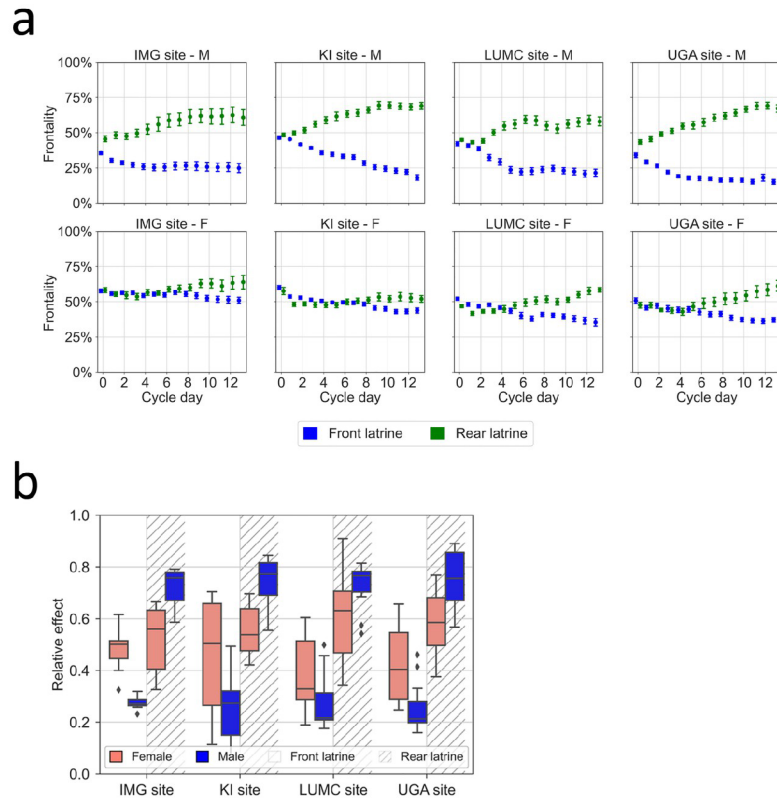


Fig 11. (a) Frontality of activity in relation to latrine position during the 14 days after cage-change. Plots show average \pm SEM of daily (24 hours) Frontality across the five cage-change cycles, which is the percentage of daily activity performed in the front-half of the cage-floor over the total activity performed on the entire cage floor during the 24 hours of a day. Frontality is displayed for cages with the latrine in the front (blue line) or the rear (green line), for males (upper panels) and females (lower panels), for each IMG, KI, LUMC and UGA respectively. (b) Box plots of the relative effect size of sex on Frontality in the latrine and latrine-free area of the cage floor across the cage-change cycle for each site shown in (a). Males (blue) and female (pink); clear background frontal placement of latrine, hatched background with latrine in the rear.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g011>

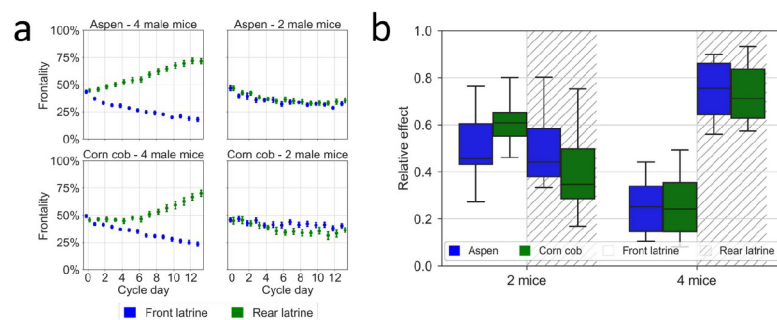


Fig 12. (a) Frontality of activity (%; ordinate) and position of latrine(s) days after cage-change (abscissa) with different bedding material (aspen chips top panels, corn cob lower panels) and four (left two panels) vs two (right two panels) male mice per cage at KI. Plots showing average \pm SEM of daily (24 hours) Frontality, which is the percentage of daily activity performed in the front-half of the cage-floor over the total activity performed on the entire cage floor during the 24 hours of a day. Frontality is displayed for cages with the latrine in the front (blue symbols) or the rear (green symbols). (b) Box plots of the relative effect size (see [Material and methods](#)) of bedding material with frontal (clear background) and rear (hatched background) latrine position across the cage-change cycle for each housing density shown in (a). Aspen chips (blue) and corn cob (green).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g012>

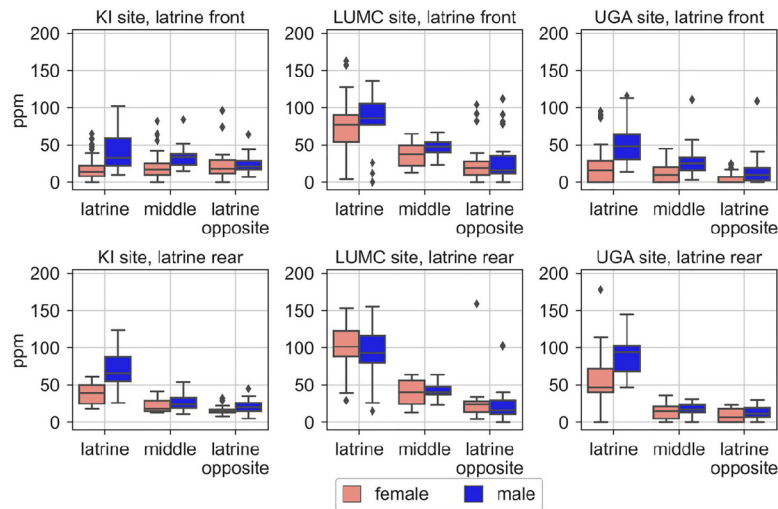


Fig 13. Ammonia (NH₃) measurement (ppm) on the last day of a cage-change cycle in the front, middle and rear of the cage, for each site and sex. Box plots with median, 25% and 75% quartiles of the three floor areas across cage-change cycles for the three sites (column of panels) separated by sex (see colour code key for sex).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g013>

latrine zone at KI and UGA remained below or touched 50 ppm across the whole cycle while during the second week NH₃ ppm increased rapidly to reach the same end values as for males at LUMC. The floor area opposite the latrine showed only small differences between sexes, progressed more slowly and remained below or was about 25 ppm as end values at all three sites. As expected based on the ventilation dynamics of the IVC cages, the ammonia levels across the cage-change cycle were higher in the latrine area when this was located in the rear compared to the front area (Fig 14). There was a correlation between NH₃ ppm measured in

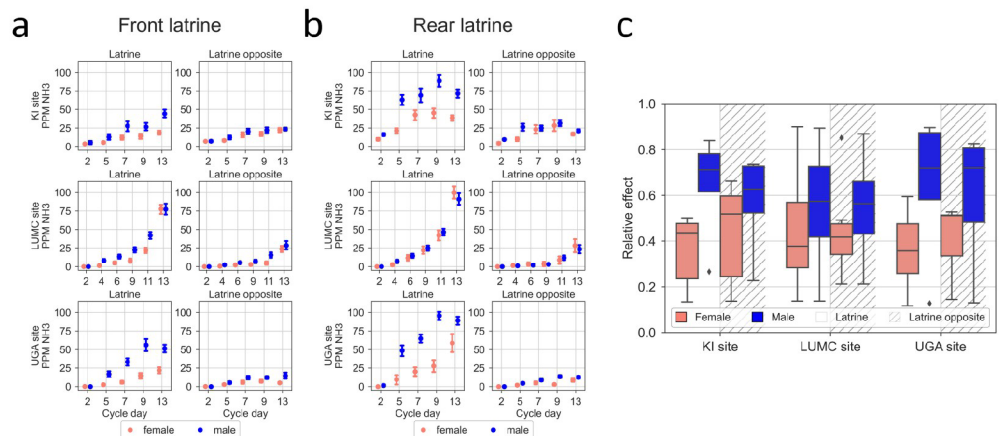


Fig 14. (a) NH₃ measurements in relation to latrine position across days after cage-change. Plots show the average \pm SEM of NH₃ ppm, measured over the latrine and the opposite area for when the latrine was in the front (left six panels) and when the latrine was in the rear (right six panels), for males (blue line) and females (pink line) for KI (top four panels), LUMC (middle four panels), and UGA (bottom four panels) respectively (b) Boxplots showing the relative effect of sex (males in blue, females in pink) on recorded ppm NH₃ in the latrine and latrine-free cage-floor area (latrine area = clear; latrine-free area = hatched), respectively, across the cage-change cycle at each site. Males in blue and females in pink.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g014>

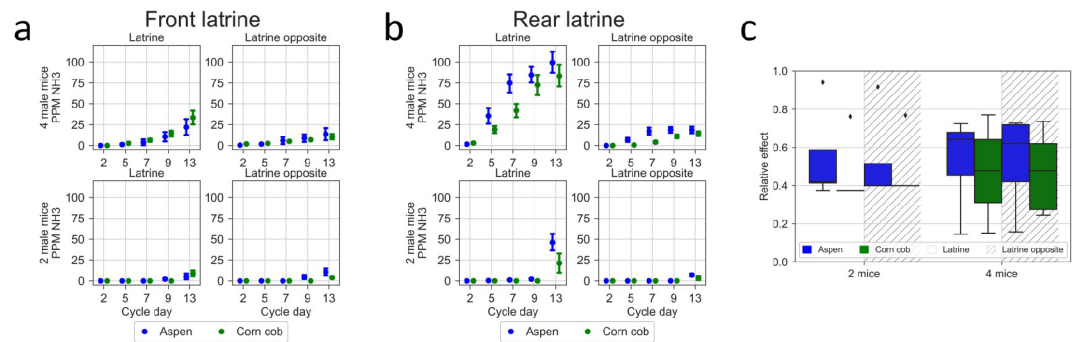


Fig 15. NH_3 measurements in relation to latrine position on different days post cage-change with aspen chips and corn cob, and either 4 or 2 animals per cage at KI. Plots show the average \pm SEM of NH_3 ppm in the latrine and opposite area of the cage floor for latrine in the front (left four panels) and latrine in the rear (right four panels) of cages with mice on either corn cob (green) or aspen chips (blue) bedding and with a housing density of four (upper two panels) or two (lower panels) animals per cage at the KI site. (b) Boxplots showing the relative effect of bedding material (aspen chips in blue, corn cob in green) on recorded ppm NH_3 across the cage-change cycle in the latrine and latrine-free (latrine area = clear; latrine-free area = hatched) cage-floor areas, respectively, at the housing density of two and four mice.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g015>

the latrine area and in the opposite latrine free area at the three sites (Spearman rank correlation; cages males $r_s = 0.72$, $p = 1.8\text{E}-17$ down to $r_s = 0.48$, $p = 3.7\text{E}-9$, when the latrine is in the rear; $r_s = 0.87$, $p = 2.2\text{E}-44$ down to $r_s = 0.31$, $5.9\text{E}-5$ when the latrine is in the front; female cages $r_s = 0.82$, $p = 2.4\text{E}-16$ down to $r_s = 0.62$, $1\text{E}-11$ when the latrine is in the rear, $r_s = 0.82$, $p = 8\text{E}-45$ down to $r_s = 0.59$, $p = 1.1\text{E}-20$ when the latrine is in the front) suggesting a gradient of NH_3 ppm across the cage floor (see also Fig 13 and [42]).

Housing density, latrine position and bedding material impact on in-cage activity and NH_3 levels

At the KI site, animals were also kept on CC and housed at a reduced density (Fig 15a and 15b). With four animals, the small difference in average NH_3 ppm values between beddings was not statistically significant (15b, $p = 0.47$). The ammonia levels increased with both beddings types (Fig 15a; $p = 2.8\text{E}-35$) as time progressed post-cage-change and there was a significant difference between the latrine area and the opposite latrine free area ($p = 1.2\text{E}-8$). These results are consistent with the multicenter study reported above. With a housing density of two animals per cage, the levels of NH_3 ppm remained very low throughout the cage-change cycle albeit with a small difference ($p = 1\text{E}-4$) between AC and CC (Fig 15a and 15b). Also in these sets of cages, there was a significant covariation of NH_3 ppm measured in the latrine and latrine-free cage-floor area (Spearman rank correlation, four mice on CC $r = 0.85$, $p = 5.2\text{E}-31$ and 0.60 , $p = 4.3\text{E}-18$, with latrine in the rear and in the front, respectively; four mice on AC $r = 0.90$, $p = 6.8\text{E}-53$ and $r = 0.71$, $p = 6.1\text{E}-22$; two mice per cage on CC $r = 0.90$, $p = 8.3\text{E}-39$ and $r = 0.74$, $p = 4\text{E}-26$; two mice on AC $r = 0.84$, $2.2\text{E}-23$ and $r = 0.75$, $p = 1.2\text{E}-15$).

Number of animals, biomass and in-cage NH_3 ppm

A direct comparison of NH_3 ppm in cages with male mice and that in cages with female mice at all three sites revealed a statistically significant difference with higher NH_3 ppm in cages with male compared to those with female mice (Fig 16). Since the excretion of urea, a key component of nitrogen homeostasis, is to some degree proportional to the biomass of the organism, we used the collective body mass of each cage to compute average NH_3 ppm per gram

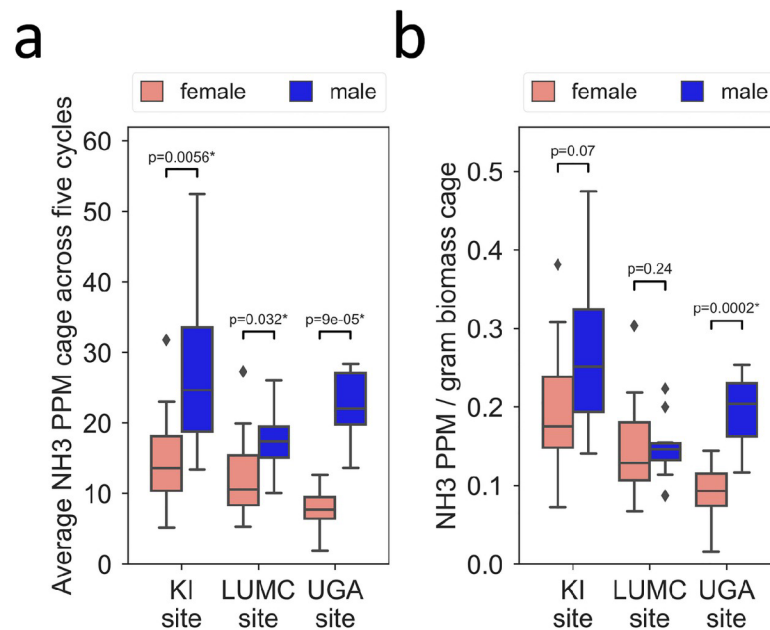


Fig 16. Boxplots of average NH₃ ppm in cages with four female or four male mice (see key for male and female) across five cage changing cycles at KI, LUMC and UGA. Left panel (a): A direct comparison of NH₃ ppm in cages with male mice and that in cages with female mice (left panel). Effect size by sex was large at each site (CL_{EE} : 0.84, 0.75 and 1.0, respectively; see material and method). Right panel (b): NH₃ ppm per gram biomass in cages with male mice and in cages with female mice (p values for Mann-Whitney U-test have been indicated). With NH₃ ppm normalized to in-cage biomass, the effect by sex was still high (CL_{EE} : 0.98) and statistically significant at UGA but lower and did not reach statistical significance at KI (CL_{EE} : 0.7) and LUMC (CL_{EE} : 0.6).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g016>

biomass. We then found that the difference in NH₃ level between sexes across cycles did not reach significance at KI and LUMC but remained significant at the UGA site (Fig 16b).

Vertical slot position, light level, NH₃ ppm, and in-cage activity

As detailed in the Materials and methods section, we rotated each cage at every cage change to mitigate an impact by light level or potential non-uniformity of the ventilation. Post hoc analyses of the activity and NH₃ ppm data collected from each slot (covering ten different cages each inserted for two weeks) revealed no gradient of either activity or NH₃ ppm with slot position (see Figs 10–14 in S1 File).

Intra-cage bacterial growth and NH₃ levels during bi-weekly and weekly cage-changes, and post hoc histopathological examination of the upper airways

At the KI site, bacterial load (CFU) inside the cages was assessed ($n = 20$) through swabbing at the end of the five cycles of bi-weekly cage-change (see Material and methods). The cage-change routine was then shifted to weekly cage change for two rounds and at the end of the second round all cages were swabbed again for assessment of CFUs. Pair-wise analysis of bacterial load with bi-weekly and weekly cage changes, respectively, revealed only small difference in CFU between the cage change intervals ($p = 0.095$; Fig 17).

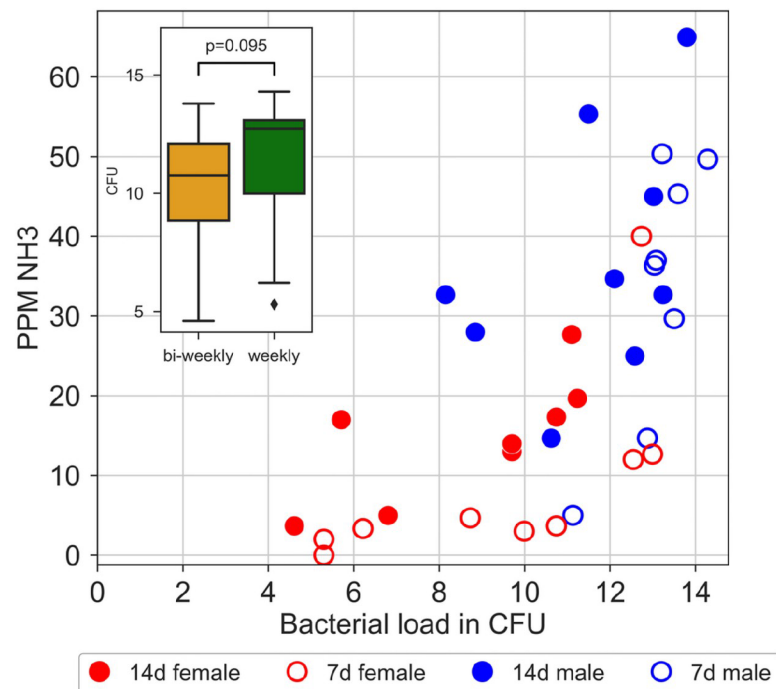


Fig 17. Bacterial growth load (CFUs) and average of NH₃ ppm across the cage-change cycle in cages changed bi-weekly (filled circles) vs. weekly (open circles). Data from male and female cages are colour coded, see key in diagram. Inserted in the diagram is a box plot of bacterial load for both samples and the obtained p-value for the statistical pair-test (Wilcoxon matched pair).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g017>

Measurements of NH₃ ppm was continued during the two weekly cage-changes to allow us to assess covariation between CFU and in-cage NH₃ ppm. In both the weekly and bi-weekly data sets of NH₃ ppm and CFUs there was a significant correlation between the two metrics (Spearman rank correlation, weekly: $r = 0.88$; bi-weekly: $r = 0.76$; Fig 17, see also Fig 15 in S1 File).

At the end of the five cycles of bi-weekly cage changes and the two final cycles with weekly cage-change, one animal per cage was randomly selected for histopathological analysis [13, 24, 57] of the upper airways to assess acute and cumulative impacts by in-cage bacterial load and ammonia (SPF group; Fig 18a). Mice of the same strain, sex and age but bred and housed under germ-free (axenic) conditions served as reference group with no lifetime exposure to NH₃ (GF group, Fig 18a). The tissue section analyses were conducted blinded on coded slides by two histopathologists ranking (0–5) the presence (>0) and extent (1–5) of each of the seven parameters (Fig 18a). The concordance between assessors was high (>90%; Fig 18a). In addition, the number of Caspase-3 positive cells mm⁻¹ was counted in the respiratory (RE) and olfactory (OE) epithelium, respectively. There were no signs of tissue necrosis or scarring while seven of the nine morphological features assessed (Table 2) were encountered in both SPF and GF animals. Inflammatory cell infiltrate in the vomeronasal organ was more prevalent in GF mice while hyalinosis in both the olfactory and respiratory epithelium, and Caspase-3 + cells in the RE were more frequent in SPF animals. The remaining five histological hallmarks present in both groups showed no difference between groups (Fig 18b). Thus all-in-all 4 parameters were either exclusively present in SPF animals or at least significantly more

a

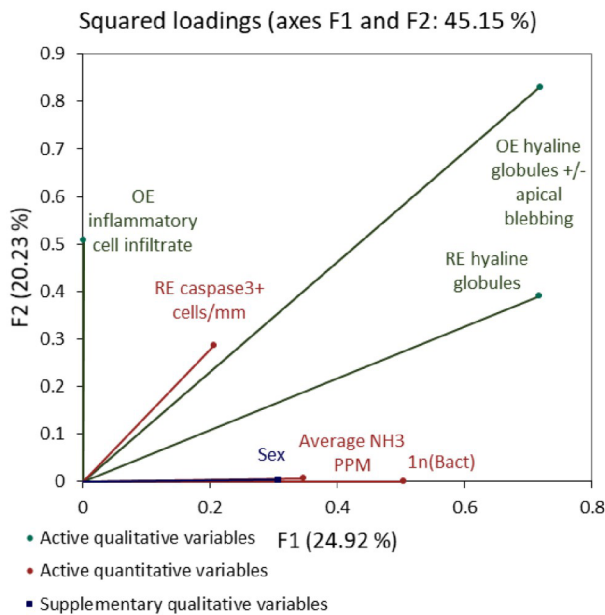
| Region | Observation | GF n=20 | | SPF n=20 | | MannW U | | CL |
|---|-------------------------------------|---------|-------|----------|-------|----------|----|-------------|
| | | median | range | median | range | p | n | Effect size |
| Nasal septum | NS Accumulation of "amyloid" | 2 | 1---3 | 2 | --- | 0.1068 | 40 | 0.60 |
| Respiratory epithelium (RE)(septum, turbinates) | RE hyalinosi | 0 | 0---2 | 1 | 0---3 | 0.0047 | 40 | 0.74 |
| | RE goblet (mucous) cell hyperplasia | 0 | 0---2 | 0 | 0---2 | 0.4196 | 40 | 0.57 |
| | RE caspase3+ cells* | 0.03 | ±0.04 | 0.75 | ±0.76 | <0.0001 | 39 | 0.88 |
| | RE inflammatory cell infiltrate | 0 | 0---2 | 1 | 0---2 | 0.0927 | 40 | 0.64 |
| Olfactory epithelium (OE)(dorsal meatus) | OE hyalinosi | 0 | --- | 0 | 0---3 | 0.0012 | 40 | 0.73 |
| | OE caspase3+ cells* | 0.75 | ±0.27 | 0.94 | ±0.69 | 0.687015 | 39 | 0.54 |
| | OE inflammatory cell infiltrate | 0 | --- | 0 | 0---1 | <0.0001 | 40 | 0.95** |
| Other | Nasal gland cysts | 0 | 0---2 | 0 | 0---2 | 0.4696 | 40 | 0.55 |

Each observation was ranked by two specialists from 0 to 5; with 0 -not present, 3 -medium engagement and 5 - severe engagement) Agreement between assessors: 98%±0.03 Agreement between assessors: 93%±0.08

*mean±SD mm⁻¹

**Not observed in GF, large number of ties

b



c

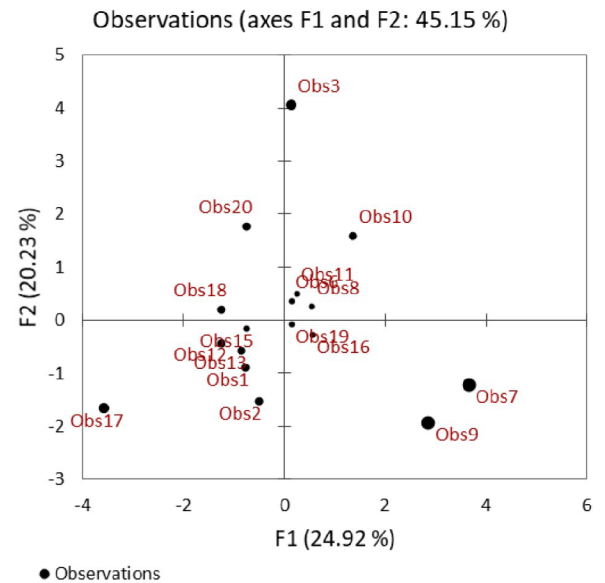


Fig 18. (a) is a tabulation of the ranks for the nine included variables (see [Material and methods](#)) with univariate statistics (Mann-Whitney U) of differences between the GF and the SPF groups and the common language (CL) effect size of the difference between groups. (b) shows the loading of qualitative and quantitative, and supplementary qualitative variables on F1 and F2 in the mixed PCA. The SPF mice separated by sex on F1. (c) shows the contribution by each observation, numbers ≤10 are males while >10 are females.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267281.g018>

prevalent in this group. These four histological hallmarks (qualitative variables) were included in a mixed model PCA to assess covariation with CFUs and NH₃ levels (quantitative variables) while controlling for sex (Fig 18c). The covariation of qualitative and quantitative variables was low (F1 plus F2 ~45%). NH₃ ppm and CFUs contributed mainly to F1 while inflammatory cell infiltrate in the OE contributed to F2. SPF animals were well-separated by sex along F1 (Fig 18b and 18c).

Discussion

Here we report the results of a multicentre study at four research institutes in Europe conducted in 2018–2020. The rationale was to shed light on the in-cage activity of a commonly used laboratory mouse strain across a cage change cycle of two weeks and to what extent in-cage levels of NH₃ impacted animal activity, dynamics of the use of cage floor space relative to the location of the latrine, and health of the mice. Another objective was to analyse to what extent the data reproduced across facility sites. This is the first report of a study involving the measurement of in cage NH₃ concentrations, where in each cage measurements were taken at three positions across the cage floor covering the entire width of the cage at all three positions under IVC flow conditions. In-cage ammonia concentrations were measured at different time points between cage changes using a commercially available portable electrochemical sensor device [41]. Male and female mice of three different C57BL/6J substrains were housed in GM500 IVC cages. Cages were changed every other week. Spontaneous activity on the cage-floor was recorded 24/7 with DVC[®] technology [2]. Novel to this study is that we used the DVC[®] electrode capacitance readings to decide on the location of in-cage latrine(s), enabling us to relate both NH₃ ppm and activity to the position of the latrine(s). At the KI site, bacterial load was measured and the airway histology of the SPF mice was compared to that of a separate cohort of germ free C57BL/6J mice. At none of the sites, animals were lost or had to be removed from the study prematurely. At the four sites, all animals exhibited weight increases similar to what is considered normal for C57BL/6J mice during the study period of 10 weeks and the additional 2 weeks at the KI site. In addition, the effects of reduced cage occupancy, two versus four animals, and different bedding types, corncob versus aspen chip, on the increase in NH₃ concentrations and on the spontaneous activity of the animals were investigated at the KI site only.

Although housing conditions were standardised as much as possible there were differences between sites with respect to the timing of lights on and lights off and the presence of a dawn and dusk period. At two centres, animals were handled with forceps while the two other centres used tail handling. Obviously, the caretakers differed between sites. It has been reported that the sex of the experimenter can affect apparent baseline responses in behavioural testing [72]. At the LUMC, all staff members involved in the experiments were male, while at the other sites the team consisted of male and female caretakers. Since all animals were housed in IVC cages and cages were only opened under laminar flow conditions in downflow cage changing stations, the effect of the sex of the experimenter on experimental outcomes is thought to be minimal.

In-cage activity and impact by position of latrine(s)

Our cumulative records show a distinct circadian rhythmicity of in-cage activity. The data replicated well across sites and confirm previous observations [2]. The only notable difference was the rather slow onset of activity increase following lights off at the IMG site. This deviation could not be explained by light off being sudden or through a passage in dusk since two sites had no dawn and dusk period and two sites did of 10 and 30 minutes respectively. Also the

timing of the lights on and off could not explain the difference, since both IMG and KI had set lights off at 4:00 pm and lights on at 4:00 am. The onset of activity increase following lights off at KI was rather similar to the other two centres (UGA and LUMC) with lights off set at 7:30pm.

Our results confirm that female C57BL/6J mice are more active than age-matched male mice [2]. However, we found that the higher female activity appeared to be constrained to the dark phase. Hence, the difference between day and night time activity was greater in female than in male mice. In response to a cage change, male and female mice exhibited an instant increase of activity during both day and night time. The enhanced activity decreased during the first week at all participating sites and continued to decline at slower pace during the second week. This is in line with an earlier study with female C57BL/6J mice with weekly cage changes [2]. The amplitude of the increase after cage change and the following drop in activity varied between 25 and 50% during the first week depending on the site and the sex, levelling off during the second week (~10%). Similar results were found during the extended experiment at KI with different bedding types and only two animals per cage, showing that this reaction following a cage change event is extremely robust across sites, sexes, animal housing density and independent from bedding types. In relative terms, the impact of the cage change on in-cage activity was more marked during day time when the animals rest than during lights off when the animals are active. Our findings are in line with others reporting altered behaviours and responses, and disrupted sleep patterns [1, 9, 45–49, 73].

An alternative approach to a predetermined fixed time interval between cage changes is the cage change on demand or 'spot cleaning'. Under that regime, the technician decides when a cage needs changing most often based on an SOP with images representing different degrees of soiling. Our results confirm that a cage change impacts the activity and sleep patterns hence are likely to impact scientific results. It should, therefore, be considered an experimental variable and included when designing the experiment. This is easier with a fixed cage change frequency than with cage change on demand. A bi-weekly cage change is then preferred over a weekly cage change.

We used the drop in electrode capacitance that occurs with increasing water content of the bedding to estimate the location of the latrine(s) across the twelve electrodes covering the floor area [52]. Considering all sites, the latrine position identified by the DVC technology agreed in 85% of the cases with the area with the highest NH₃ concentrations measured. In the remaining 15% of the cases, NH₃ values were extremely low and comparable between front and rear positions and therefore less informative to assigning the actual latrine position. In all cases, the latrine position was determined by visual inspection as well.

Our data show that even though food and water were presented more towards the rear of the DVC[®] GM500 cage type used and the rear of the cage was the more shaded area of the cage, male mice showed no clear preference for creating the latrine in the front or rear of the cage while female mice showed a preference for the front of the cage. Only at IMG, both male and female mice had a preference for the front of the cage in spite of the higher light intensity measured across the front of the rack compared to the other centres. This finding could not be linked with a causing factor except that that rack was placed against a wall bordering a corridor albeit with low traffic intensity and no detectable transmission of sound in the audible range for humans.

Depending on the location of the latrine, mainly male mice exhibited increasingly more activity at the opposite site of the cage away from the latrine as the time between cage changes progressed. More in detail, independent from the latrine position, immediately after cage change (day 0) males are already more active in the area opposite from the latrine and this will become more pronounced during, in particular, the first week but progresses at a slower pace

during the second week at two (KI and UGA) of our four sites. Still at the end of the two weeks, 20%–25% of the daily activity across all sites is in the latrine part of the cage floor. Females show a different pattern of activity with no change in preference for the two floor areas during the first week, followed by a tendency (5–10%) to allocate more of the daily activity in the latrine free area. A tendency that became statistically significant at the LUMC and UGA sites only. These patterns are highly reproducible between sites also in the extended KI experiment with the two bedding types. However, this shift in activity span of male mice disappeared entirely when the cage occupancy was reduced to two animals per cage, implying that housing density can be a significant factor.

Whether the shift in activity span is accompanied by an increase in anxiety or stress levels will have to be confirmed in a subsequent study. The European Directive, 2010/63/EU, prescribes 330 cm² as the minimum enclosure size with defined floor area dimensions per animal depending on their body weight [74]. These minimum enclosure dimensions were set after the recommendations of the Council's Group of Experts on Rodents and Rabbits. The expert group concluded that figures for minimum cage sizes and maximum stocking densities can never be scientifically 'proven' for reason that the crucial point is the interaction between space, the structure of the cage, the animals and the type and quantity of enrichments provided [75] (see also [76]). In operant conditioning experiments, female C57BL/6 mice continued to exit the enriched cage and enter the empty one at all the costs imposed, but did not discriminate between the amounts of additional space offered [77, 78]. The author argued that the motivation to exit the enriched cage and enter the empty cage was due to monitoring, patrolling or information gathering, independent of any attraction or aversion to either of the cages. Based on these findings Gaskill et al. suggest that when considering space offered by larger cages, this may mean that mice will patrol the perimeter of the larger cage, but spend most of their time near the nest [79]. Determining the optimal combination of available floorspace and the floorspace area 'agreeable' to mice should be subject of future studies. These studies should incorporate measurements of physical and mental wellbeing parameters and consideration of the observed difference between sexes.

Ammonia (NH₃)

A likely explanation for the shift of activity away from the latrine is that the animals avoid the areas of the cage that are becoming soiled with increasing concentrations of chemicals associated with the latrine [15, 19, 26]. The reduction in housing density from four to two animals lead to lower NH₃ concentrations and less soiling suggesting that NH₃ may drive this behavioural response. However, controlled NH₃ exposure studies indicate that levels up to 100 ppm are not aversive (preference test with clamped chamber) to mice [32]. In a study of voluntary wheel running (Swiss strain) Tepper et al. [80] found no consistent impact on activity by exposing the mice to 100 ppm NH₃ for 2 days while exposure to 300 ppm NH₃ substantially reduced the spontaneous activity.

Consistent with studies examining both sexes [7, 21, 81], the measured levels of NH₃ were significantly higher in cages with male than with female mice (Fig 16a). A difference that can be explained in part by the larger biomass of the males (Fig 16b). Our conclusion is that strain information, number of animals and sex need to be complemented with biomass in order to safely control in-cage NH₃ levels. Notably, the difference in NH₃ levels between sexes was larger in the latrine area than in the latrine free area. In line with previous studies [13, 21], the increase in NH₃ showed some variability between cycles and within cycles. Variances within series of measurements of NH₃ may be generated by the in-cage activity preceding the

measurement, for example timing of the use of the latrine and activity at the latrine(s) which both may facilitate release of NH_3 from soaked bedding.

Since we measured NH_3 at the front, middle and rear of each cage, we could clearly demonstrate an NH_3 gradient with higher concentrations over the latrine area and lower NH_3 concentrations detected over the adjacent middle and opposing areas of the cage floor (see also [10, 16]). Overall, NH_3 concentrations in the front of the cage were lower than those in the rear of the cage irrespective of sex, housing density or bedding type. Possible explanations for this finding are the direction of the airflow from the rear top of the cage towards the front then down and back across part of the cage floor up to the rear top, and the spill of diet under the hopper situated closer to the rear of the cage creating favourable conditions for urease producing bacteria to grow (see also [10]).

For female mice the level of NH_3 across the five cage-change cycles were at, or below, 25 ppm in the latrine free area of the cage irrespective whether the latrine was in the front of the cage, upstream, or in the rear of the cage, downstream from the airflow. In the latrine area, the NH_3 concentration remained below 25 ppm until day 12 of the cage change cycle at the three sites where NH_3 was measured (KI, LUMC, and UGA).

With males, NH_3 exceeded 25 ppm on the final day before the cage change in the latrine free area while ammonia levels exceeded 25 ppm during the first week at KI and UGA but not until the middle of the second week at the LUMC. While NH_3 ppm continued to increase at the LUMC (up to 75 ppm) until the final day of the cage-change cycle, the corresponding progression levelled off at the two other sites (end values at ~50 ppm). This may be explained by a different dynamics of in-cage bacterial growth between sites as discussed below.

As demonstrated by Rosenbaum and co-workers [11] (see also [9, 15, 16, 28]) varying the air change rate or the amount of the bedding material can modify in-cage NH_3 levels. Here we used the seventy-five air changes per hour (ACH) and the amount of bedding material recommended by the vendor to optimise in-cage conditions (see [Material and methods](#)). Lower rates of ACH may compromise the in-cage environment with higher holding densities (> two animals) but higher ventilation rates may also have disadvantages since air turbulence and a strong laminar flow may compromise the wellbeing of the mice [8]. Rather than changing the ACH, choosing the right type and amount of bedding material is a better way to optimise the in cage microenvironment (see also below). Taterny et al. reported corn cob to show better NH_3 control than aspen chips already as early as 4 days after cage changing and throughout the 2-week measurement period [31]. Using a housing density of either 4 or 2 male mice, we could, however, not replicate these observations in the current study suggesting that this issue deserves further investigation.

Given the choice, data in the literature indicates that mice prefer aspen chips over corn cob [82]. However, consideration should also be given to the fact that both wood chips and corn cob are complex organic composites that contain a range of chemicals potentially posing a hazard to the animals' health and/or interference with experiments on the animals. In particular, corn cob and pine chips have been considered toxic or troublesome in a variety of contexts [83–87], but also other wood shavings like the widely used aspen chips have only been tested for a non-exhaustive library of chemicals and the users are left uninformed about potential interference or toxic components of this bedding. A leap forward in improving housing standards for small rodents would be to introduce a synthetic bedding material with a texture and composition meeting the animal's need, is tolerated well and reduces the risks for aversive chemical side-effects at the same time, including exposure to NH_3 . To our best knowledge there is only one such effort published to date [29].

Our results show that male mice decrease the amount of activity in the latrine zone of the cage floor already before NH_3 levels increased, indicating that other urine associated chemicals

and odours affect their behaviour. C57BL/6J is a highly inbred strain resulting in different male mice possessing the same chemo-signals in their urine associated with MUP and MHC peptides [88, 89]. This should act to prevent C57BL/6J males from discriminating odours of male mice of the same inbred strain, regardless of their age. Thus, it seems unlikely to be chemicals associated with the marking of territorial boundaries that repelled male mice from being active in the latrine zone. In contrast, C57BL/6J males did display discriminative deposition of urine marks toward outbred CD-1 males and toward adult C57BL/6 females [90]. Also, single housed C57BL/6J male mice marked more than pair-housed males. Hence, this issue certainly deserves further attention.

Bacterial load and ammonia levels

The low level of NH_3 across the first few days post cage-change is the results of the process by which NH_3 is generated and that we used autoclaved cage materials including bedding and irradiated food, thus the conditions in a new cage were close to sterile. The production of NH_3 from urea by bacteria-derived urease escalates as bacterial load increases overtime. The origin of these bacteria is the microbiota of the SPF animals and the accidental contamination with agents, like *Staphylococcus aureus*, by staff. This was also the rationale to include germ free mice of the same strain and age as a no NH_3 exposure reference group in this study [53–55]. Our data on bacterial load (CFU) are in agreement with previously published data [17]. Notably, the difference in CFUs between cages subjected to weekly and biweekly cage-change was small indicating that the colonisation became saturated towards the end of the first week. This could explain the levelling off of in-cage NH_3 build-up during the second week post cage change at KI and UGA. The slower increase of NH_3 ppm recorded at LUMC, may have been caused by a more protracted bacterial colonisation during the first days after cage change which caught up during the second week to generate NH_3 en-par with the other sites towards the end of the cycle. Differences between sites may well be caused by differences in microbiota with animals coming from different vendors. All three facilities maintained an SPF status considering the FELASA recommended list of agents to be tested for as exclusion list [5].

In both the bi-weekly and weekly data set there was a significant correlation between CFU and NH_3 concentration. However, while low levels of in cage NH_3 (<25 ppm) covary closely with CFUs, high ppm values (31–65 ppm) were more scattered especially in cages changed bi-weekly. The poorer covariation between high levels of NH_3 (>25 ppm) and CFUs may be explained by the shifting towards urease producing bacterial strains at the expense of other bacterial species as time progresses. Another not mutually exclusive explanation is that NH_3 being a sticky molecule may accumulate in the organic bedding material until the bedding becomes saturated after which the concentration of the gaseous NH_3 will increase.

Histopathology

NH_3 has attracted considerable attention as a significant micro-environmental factor in housing of small rodents because it may induce lesions in the upper airways compromising health and it is a potent irritant of sensory nerve endings of the nose and the eye [7, 9, 13, 16, 20, 21, 24, 25, 35–38, 40]. The levels of bacterial CFUs and in-cage NH_3 ppm recorded in this study induced no overt impact on the health of the animals. However, a number of studies have reported histopathological findings in the nasal cavity and/or lung following one to several weeks of in-cage NH_3 levels corresponding to those measured in our study [13, 20, 91]. Therefore, at the end of the last cage-change cycle, 10 male and 10 female animals were randomly selected from each cage at the KI site and their upper airways dissected for histopathological analysis (see [Material and methods](#)). These SPF mice were compared with a group of mice

raised and kept under axenic conditions (GF). No overt signs of tissue necrosis or scarring were observed in either group. In general the scoring of histopathological parameters (see Table 2 in Material & methods) was low and never exceeded three on a scale 0–5 in both groups. Where signs of tissue alterations were present in both SPF and GF mice (7 of 9 parameters), these may be driven by other environmental factors such as dust or chemicals deriving from the bedding material rather than exposure to bacteria or NH₃. The presence of hyalinosis and apoptotic cells (Caspase-3+) in the RE of SPF mice were significantly more prevalent than in the GF mice. Furthermore, hyalinosis and inflammatory cell infiltrates were exclusively encountered in the OE of the SPF animals. In spite of the significant difference between the observations made in SPF and GF mice, these parameters showed no, or a very low covariation (mixPCA) with NH₃ ppm and bacterial load (CFU) in the SPF group. The absence of marked histopathological alterations in the upper airways and the low degree of co-variation with NH₃ level and bacterial load is not surprising but rather expected against the results published [32, 33, 38, 40, 92–94] where exposure levels were well-controlled showing that weeks of exposure to >56 ppm NH₃ are needed to induce tissue alterations to the upper airways in mice and rats. Furthermore, our results are in line with several studies assessing histopathological changes and in-cage measurement of NH₃ levels (<100 ppm) under different mouse housing paradigms [7, 11, 14, 16, 21, 24, 42]. Given the results from controlled exposure studies (see above), the explanation of the discrepancy found in the literature (see above) concerning histopathological airway alterations in small rodents housed under similar in-cage NH₃ ppm (<56) may be due to measured NH₃ levels not corresponding closely to the individual animal's exposure to NH₃ and, in addition, that differences in NH₃ measuring technique used between studies may preclude closer comparisons of the results [41]. Another not mutually exclusive explanation is that histopathological changes to the upper airways were generated by other environmental chemicals and/or dust, not being NH₃. This may then explain that seven of the nine parameters examined were present also in the GF mice. Bolon et al. [33], compared nose histopathology after controlled exposure to 0 and 300 ppm NH₃ during 6 hours per day over 5 or 10 days, and observed that high NH₃ ppm was associated with anterior nasal lesions but not lesions of the olfactory epithelium (see [40]). This is consistent with the lack of correlation between observed in-cage NH₃ ppm and inflammatory cell infiltrate of the olfactory epithelium reported here.

Finally, as shown in this study the animals prefer spending more time away from the areas with the highest concentrations of NH₃ and that these areas overlap with the latrine area with limited spill over to adjacent areas. This is irrespective of the location of the latrine.

Exposure limits to NH₃ specific for mice are missing

From our results and those of others as reported above can be concluded that a consensus on an evidence based exposure limit for mice is missing but much warranted. To date most small rodent facilities use the work place NH₃ exposure limit for humans (see papers and guides cited above), being an average exposure of ≤25 ppm NH₃ with peaks of ≤50 ppm during eight hours per day. These thresholds were derived from field and laboratory studies with human subjects, using self-reported discomfort and objective assessment of pulmonary ventilation (static/dynamic spirometry) (for a detailed recent review see EPA's Toxicological Review of Ammonia Noncancer Inhalation [CASRN 7664-41-7] Supplemental Information, September 2016). The controlled exposures studies on small rodents (rats and mice) cited above indicate that ≤56 ppm (= 40 mg/m³) NH₃ does not inflict signs of discomfort, clinical symptoms or histopathological changes to the airways even at prolonged exposure. In contrast to humans, NH₃ appears not to be aversive or impact physical activity of mice even at constant exposure

levels of 100 ppm [33, 80]. Clinical symptoms as eye-blinking, and histopathological changes to the anterior compartment of the nose have been reported for controlled prolonged exposures in the range 100–150 ppm [40, 92]. Humans respond to high levels of NH_3 (500 ppm) with an increased pulmonary ventilation [95]. In contrast, rats and mice decrease their breathing rate (a 50% reduction at 300 ppm NH_3) seemingly protecting their airways from exposure to NH_3 [36, 37]. In summary, the existing literature of controlled exposure studies on small rodents seems to suggest an average NH_3 exposure of ≤ 56 ppm with peak values < 75 –100 ppm a rational exposure limit for mice based on current knowledge.

Concluding remarks

The objective of this study was to deepen our insights into the longitudinal changes of the cage microenvironment and the spontaneous in-cage activity of a widely used mouse strain housed in IVCs with a cage change cycle of two weeks. By gathering longitudinal data, it was possible to compare the first and second week of the cage-change cycle. By analysing repeated biweekly cage change cycles, variations across cycles could be assessed. Finally, the study was conducted in parallel at four sites in different countries within EU, enabling distinction of features which reproduced across sites from those that did not.

Cage change induced a marked increase in activity (~40%) being more pronounced during day time when the animals normally rest than during night time. The subsequent decline from this activity burst occurred mainly during the first week. Our data strongly support the notion that from the animal's perspective, bi-weekly cage change is to be preferred over weekly cage change. Irrespective of the cage change frequency, the impact of a cage change is such that it must be incorporated into the experimental design as a variable.

Following a cage change, the mice quickly assigned a location(s) for the latrine(s). Females but not males showed a clear preference for having the latrine(s) in the front of the cage. In cages with males, the mice more or less instantly preferred to be active in the latrine free part of the cage floor. A behaviour that progresses through the cage change cycle. This behaviour was equally detected on both AC and CC. Reducing housing density to two mice per cage abolished it. Female mice displayed a different pattern of in-cage activity, using the entire cage floor the first week while during the second week the amount of activity in the latrine area decreased by about 5–10%, a trend that was significant only at two out of the four sites.

Measurement of NH_3 ppm across the cage floor revealed a gradient with three times higher values for the latrine area than the opposite area. As expected, in-cage bacterial load covaried with in-cage NH_3 ppm. Across the cage change cycle, NH_3 ppm increased from 0–1 ppm to reach ~25 ppm in the latrine free area and 50–75 ppm in the latrine area at the end of the cycle. While the latter values exceed the exposure limits set for humans, the literature on the impact of controlled NH_3 exposures in small rodents suggest that these limits may be too restrictive for mice.

Post hoc histopathological analysis of the nose cavity revealed mild to moderate signs of abnormalities that did not covary with the recorded in-cage NH_3 ppm. Seven out of the nine stigmata were also present in the germ free reference group with no lifetime NH_3 exposure suggesting that these may be instigated by other in-cage components than NH_3 such as dust or chemicals from the bedding material. Further studies on bedding materials are needed. However, an optimal solution would be a nontoxic and dust free material with properties that considerably reduce the production of NH_3 while meeting the demands of the mice.

We conclude that housing of four (or equivalent biomass) C57BL/6J mice for 10 weeks under the described conditions does not cause any overt discomfort to the animals.

Supporting information

S1 File.
(PDF)

Acknowledgments

We thank Dr. Inken Beck and the Animal Research Center, Ulm University, Oberberghof, Ulm, Germany, for providing the germfree mice. Gianpaolo Milite (Scientific Consultant, Udine, Italy) for organising the germfree study and critically reviewing the manuscript, Martijn Bolderheij who performed the experiments at the LUMC, the animal facility staff and animal technicians at the four sites involved in the studies, and Tapvei for providing the bedding at all four sites.

Author Contributions

Conceptualization: B. Ulfhake, H. Lerat, J. Honetschlager, G. Rosati, J.-B. Prins.

Data curation: B. Ulfhake, K. Pernold, M. Rynkrová, K. Escot, C. Recordati, R. V. Kuiper, J.-B. Prins.

Formal analysis: B. Ulfhake, C. Recordati, R. V. Kuiper, G. Rosati, M. Rigamonti, S. Zordan.

Investigation: J.-B. Prins.

Methodology: B. Ulfhake, C. Recordati, G. Rosati, J.-B. Prins.

Project administration: K. Pernold, M. Rynkrová, K. Escot, G. Rosati, J.-B. Prins.

Resources: J.-B. Prins.

Supervision: B. Ulfhake, H. Lerat, J. Honetschlager, J.-B. Prins.

Validation: M. Rigamonti, S. Zordan.

Visualization: B. Ulfhake, M. Rigamonti, S. Zordan.

Writing – original draft: B. Ulfhake, H. Lerat, J.-B. Prins.

Writing – review & editing: B. Ulfhake, H. Lerat, J. Honetschlager, C. Recordati, R. V. Kuiper, G. Rosati, M. Rigamonti, S. Zordan, J.-B. Prins.

References

1. Gerdin AK, Igosheva N, Roberson LA, Ismail O, Karp N, Sanderson M, et al. Experimental and husbandry procedures as potential modifiers of the results of phenotyping tests. *Physiol Behav.* 2012; 106(5):602–11. Epub 2012/06/21. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.03.026> PMID: 22713295.
2. Pernold K, Iannello F, Low BE, Rigamonti M, Rosati G, Scavizzi F, et al. 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.* 2019; 14(2):e0211063. Epub 2019/02/05. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211063> PMID: 30716111.
3. Smith AJ, Lilley E. The Role of the Three Rs in Improving the Planning and Reproducibility of Animal Experiments. *Animals (Basel).* 2019; 9(11). Epub 2019/11/20. <https://doi.org/10.3390/ani9110975> PMID: 31739641.
4. Festing MFW. The "completely randomised" and the "randomised block" are the only experimental designs suitable for widespread use in pre-clinical research. *Sci Rep.* 2020; 10(1):17577. Epub 2020/10/18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74538-3> PMID: 33067494.
5. Mahler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim.* 2014; 48(3):178–92. Epub 2014/02/06. <https://doi.org/10.1177/0023677213516312> PMID: 24496575.

6. Erratum to "FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units". *Lab Anim.* 2015; 49(1):88. Epub 2014/09/04. <https://doi.org/10.1177/0023677214550970> PMID: 25181995.
7. Smith AL, Mabus SL, Stockwell JD, Muir C. Effects of housing density and cage floor space on C57BL/6J mice. *Comp Med.* 2004; 54(6):656–63. Epub 2005/02/01. PMID: 15679264.
8. Nicolaus ML, Bergdall VK, Davis IC, Hickman-Davis JM. Effect of Ventilated Caging on Water Intake and Loss in 4 Strains of Laboratory Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2016; 55(5):525–33. Epub 2016/09/24. PMID: 27657706.
9. Taylor JL, Noel P, Mickelsen M. Evaluation of a 16-week Change Cycle for Ventilated Mouse Cages. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2019; 58(4):443–9. Epub 2019/05/28. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000070> PMID: 31122312.
10. Silverman J, Bays DW, Cooper SF, Baker SP. Ammonia and carbon dioxide concentrations in disposable and reusable ventilated mouse cages. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2008; 47(2):57–62. Epub 2008/03/21. PMID: 18351723.
11. Rosenbaum MD, VandeWoude S, Johnson TE. Effects of cage-change frequency and bedding volume on mice and their microenvironment. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2009; 48(6):763–73. Epub 2009/11/26. PMID: 19930825.
12. Perkins SE, Lipman NS. Evaluation of microenvironmental conditions and noise generation in three individually ventilated rodent caging systems and static isolator cages. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 1996; 35(2):61–5. Epub 1996/03/01. PMID: 16457513.
13. Vogelweid CM, Zapfen KA, Honigford MJ, Li L, Li H, Marshall H. Effects of a 28-day cage-change interval on intracage ammonia levels, nasal histology, and perceived welfare of CD1 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011; 50(6):868–78. Epub 2012/02/15. PMID: 22330779.
14. Reeb-Whitaker CK, Paigen B, Beamer WG, Bronson RT, Churchill GA, Schweitzer IB, et al. The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. *Lab Anim.* 2001; 35(1):58–73. Epub 2001/02/24. <https://doi.org/10.1258/0023677011911381> PMID: 11201289.
15. Reeb C, Jones R, Bearg D, Bedigan H, Myers D, Paigen B. Microenvironment in Ventilated Animal Cages with Differing Ventilation Rates, Mice Populations, and Frequency of Bedding Changes. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 1998; 37(2):43–9. Epub 2002/11/29. PMID: 12456167.
16. Ferrecchia CE, Jensen K, Van Andel R. Intracage ammonia levels in static and individually ventilated cages housing C57BL/6 mice on 4 bedding substrates. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2014; 53(2):146–51. Epub 2014/03/08. PMID: 24602540.
17. Domer DA, Erickson RL, Petty JM, Bergdall VK, Hickman-Davis JM. Processing and Treatment of Corncob Bedding Affects Cage-Change Frequency for C57BL/6 Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* 2012; 51(2):162–9. PMID: 22776115
18. Horn MJ, Hudson SV, Bostrom LA, Cooper DM. Effects of cage density, sanitation frequency, and bedding type on animal wellbeing and health and cage environment in mice and rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2012; 51(6):781–8. Epub 2013/01/09. PMID: 23294884.
19. Nicholson A, Malcolm RD, Russ PL, Cough K, Touma C, Palme R, et al. The response of C57BL/6J and BALB/cJ mice to increased housing density. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* 2009; 48(6):740–53. PMID: 19930822
20. Carpenter KC, Thurston SE, Hoenerhoff MJ, Lofgren JL. Effects of Trio and Pair Breeding of Mice on Environmental Parameters and Nasal Pathology and Their Implications for Cage Change Frequency. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2020; 59(3):288–97. Epub 2020/03/01. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000074> PMID: 32111266.
21. Eichner M, Purcell JE, Fortman JD. Effects of Intracage Ammonia on Markers of Pulmonary Endothelial Integrity in Mice Housed in Static Microisolation Cages. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2018; 57(1):18–23. Epub 2018/02/07. PMID: 29402347.
22. Washington IM, Payton ME. Ammonia Levels and Urine-Spot Characteristics as Cage-Change Indicators for High-Density Individually Ventilated Mouse Cages. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2016; 55(3):260–7. Epub 2016/05/15. PMID: 27177558.
23. Koontz JM, Kumsher DM, Kelly R 3rd, Stallings JD. Effect of 2 Bedding Materials on Ammonia Levels in Individually Ventilated Cages. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2016; 55(1):25–8. Epub 2016/01/29. PMID: 26817976.
24. Mexas AM, Brice AK, Caro AC, Hillanbrand TS, Gaertner DJ. Nasal Histopathology and Intracage Ammonia Levels in Female Groups and Breeding Mice Housed in Static Isolation Cages. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015; 54(5):478–86. Epub 2015/10/02. PMID: 26424245.

25. Rathnayake CM, Metwali N, Baker Z, Jayarathne T, Kostle PA, Thorne PS, et al. Urban Enhancement of PM10 Bioaerosol Tracers Relative to Background Locations in the Midwestern United States. *J Geophys Res Atmos*. 2016; 121(9):5071–89. <https://doi.org/10.1002/2015JD024538> PMID: 27672535.
26. Toth LA, Trammell RA, Ilsley-Woods M. Interactions Between Housing Density and Ambient Temperature in the Cage Environment: Effects on Mouse Physiology and Behavior. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015; 54(6):708–17. Epub 2015/12/04. PMID: 26632780.
27. Zhou L, Gong Y, Sunq A, Hou J, Baker LA. Capturing Rare Conductance in Epithelia with Potentiometric-Scanning Ion Conductance Microscopy. *Anal Chem*. 2016; 88(19):9630–7. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02392> PMID: 27618532.
28. Rosenbaum MD, VandeWoude S, Volckens J, Johnson T. Disparities in ammonia, temperature, humidity, and airborne particulate matter between the micro-and macroenvironments of mice in individually ventilated caging. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010; 49(2):177–83. Epub 2010/04/01. PMID: 20353692.
29. Bellin MA, Reitnauer KJ, Gomez AM, Lee-Stubbs RB, Ruff AL. Evaluation of a Synthetic Bedding Substrate for Mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2019; 58(2):154–9. Epub 2019/02/26. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000075> PMID: 30803467.
30. Burn CC, Mason GJ. Absorbencies of six different rodent beddings: commercially advertised absorbencies are potentially misleading. *Lab Anim*. 2005; 39(1):68–74. Epub 2005/02/11. <https://doi.org/10.1258/0023677052886592> PMID: 15703126.
31. Tataryn NM, Buckmaster CA, Schwiebert RS, Swennes AG. Comparison of Four Beddings for Ammonia Control in Individually Ventilated Mouse Cages. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2020. Epub 2020/10/31. <https://doi.org/10.30802/aalas-jaalas-20-000051> PMID: 33121563.
32. Green AR, Wathes CM, Demmers TG, Clark JM, Xin H. Development and application of a novel environmental preference chamber for assessing responses of laboratory mice to atmospheric ammonia. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2008; 47(2):49–56. Epub 2008/03/21. PMID: 18351722.
33. Bolon B, Bonnefoi MS, Roberts KC, Marshall MW, Morgan KT. Toxic interactions in the rat nose: pollutants from soiled bedding and methyl bromide. *Toxicol Pathol*. 1991; 19(4 Pt 2):571–9. Epub 1991/01/01. <https://doi.org/10.1177/019262339101900402> PMID: 1824171.
34. White LA, Reebe M, Saarma M, Whitemore SR. Transcriptional regulation of neurofilament expression by protein kinase A. *Journal of Neuroscience Research*. 1997; 47(3):242–52. PMID: 9039646
35. Bolon DN, Baker D, Tawfik DS. Editorial. *Protein Sci*. 2016; 25(7):1164–7. <https://doi.org/10.1002/pro.2949> PMID: 27214768.
36. Pauluhn J. Acute inhalation toxicity of ammonia: revisiting the importance of RD50 and LCT01/50 relationships for setting emergency response guideline values. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013; 66(3):315–25. Epub 2013/05/28. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.05.008> PMID: 23707397.
37. Li WL, Pauluhn J. Comparative assessment of the sensory irritation potency in mice and rats nose-only exposed to ammonia in dry and humidified atmospheres. *Toxicology*. 2010; 276(2):135–42. Epub 2010/08/10. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.07.020> PMID: 20692317.
38. Zissu D. Histopathological changes in the respiratory tract of mice exposed to ten families of airborne chemicals. *J Appl Toxicol*. 1995; 15(3):207–13. Epub 1995/05/01. <https://doi.org/10.1002/jat.2550150311> PMID: 7560741.
39. Denlinger CS, Ligibel JA, Are M, Baker KS, Broderick G, Demark-Wahnefried W, et al. NCCN Guidelines Insights: Survivorship, Version 1.2016. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016; 14(6):715–24. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2016.0073> PMID: 27283164.
40. Broderick JR, Lindsey JR, Crawford JE. The role of environmental ammonia in respiratory mycoplasmosis of rats. *The American journal of pathology*. 1976; 85(1):115–30. Epub 1976/10/01. PMID: 970435.
41. Morrow RB, Wiler RJ. Ammonia Measurement in the IVC Microenvironment. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2019; 58(2):184–9. Epub 2019/02/02. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000006> PMID: 30704550.
42. Silverman J, Bays DW, Baker SP. Ammonia and carbon dioxide concentrations in disposable and reusable static mouse cages. *Lab Anim (NY)*. 2009; 38(1):16–23. Epub 2008/12/30. <https://doi.org/10.1038/labani0109-16> PMID: 19112446.
43. Godbey T, Gray G, Jeffery D. Cage-change interval preference in mice. *Lab Anim (NY)*. 2011; 40(7):225–30. Epub 2011/06/22. <https://doi.org/10.1038/labani0711-225> PMID: 21691297.
44. Boivin GP. Availability of feces-free areas in rodent shoebox cages. *Lab Anim (NY)*. 2013; 42(4):135–41. Epub 2013/03/21. <https://doi.org/10.1038/labani.187> PMID: 23511083.
45. McKenna JT, Gamble MC, Anderson-Chernishof MB, Shah SR, McCoy JG, Strecker RE. A rodent cage change insomnia model disrupts memory consolidation. *J Sleep Res*. 2019; 28(2):e12792. Epub 2018/11/22. <https://doi.org/10.1111/jsr.12792> PMID: 30461100.

46. Febinger HY, George A, Priestley J, Toth LA, Opp MR. Effects of housing condition and cage change on characteristics of sleep in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2014; 53(1):29–37. PMID: [24411777](#)
47. Tang X, Xiao J, Parris BS, Fang J, Sanford LD. Differential effects of two types of environmental novelty on activity and sleep in BALB/cJ and C57BL/6J mice. *Physiol Behav*. 2005; 85(4):419–29. Epub 2005/07/16. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.05.008> PMID: [16019041](#).
48. Rasmussen S, Miller MM, Filipinski SB, Tolwani RJ. Cage change influences serum corticosterone and anxiety-like behaviors in the mouse. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011; 50(4):479–83. Epub 2011/08/16. PMID: [21838975](#).
49. Sharp JL, Zammit TG, Azar TA, Lawson DM. Stress-like responses to common procedures in male rats housed alone or with other rats. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2002; 41(4):8–14. PMID: [12109891](#).
50. Sharp JL, Zammit TG, Lawson DM. Stress-like responses to common procedures in rats: effect of the estrous cycle. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2002; 41(4):15–22. Epub 2002/07/12. PMID: [12109892](#).
51. Pernold K, Rullman E, Ulfhake B. Major oscillations in spontaneous home-cage activity in C57BL/6 mice housed under constant conditions. *Sci Rep*. 2021; 11(1):4961. Epub 2021/03/04. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84141-9> PMID: [33654141](#).
52. Iannello F. Non-intrusive high throughput automated data collection from the home cage. *Heliyon*. 2019; 5(4):e01454. Epub 2019/04/19. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01454> PMID: [30997429](#).
53. Kang DJ, Betrapally NS, Ghosh SA, Sartor RB, Hylemon PB, Gillevet PM, et al. Gut microbiota drive the development of neuroinflammatory response in cirrhosis in mice. *Hepatology*. 2016; 64(4):1232–48. Epub 20160729. <https://doi.org/10.1002/hep.28696> PMID: [27339732](#).
54. Mobley HL, Hausinger RP. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev*. 1989; 53(1):85–108. <https://doi.org/10.1128/mr.53.1.85-108.1989> PMID: [2651866](#).
55. Dimski DS. Ammonia metabolism and the urea cycle: function and clinical implications. *J Vet Intern Med*. 1994; 8(2):73–8. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1994.tb03201.x> PMID: [8046679](#).
56. Commission European. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. 2010; L276(L276):33–79.
57. Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Morawietz G, Deslex P, Keenan C, Mahrt CR, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice—part 1. *Exp Toxicol Pathol*. 2003; 55(2–3):91–106. Epub 2003/11/19. PMID: [14620530](#).
58. Al-Asmakh M, Zadjali F. Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research. *J Microbiol Biotechnol*. 2015; 25(10):1583–8. Epub 2015/06/03. <https://doi.org/10.4014/jmb.1501.01039> PMID: [26032361](#).
59. Nicklas W, Keubler L, Bleich A. Maintaining and Monitoring the Defined Microbiota Status of Gnotobiotic Rodents. *ILAR Journal*. 2015; 56(2):241–9. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv029> PMID: [26323633](#)
60. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, et al. Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev*. 1998; 12(6):806–19. Epub 1998/04/29. <https://doi.org/10.1101/gad.12.6.806> PMID: [9512515](#).
61. Erceg-Hum DM, Mirosevich VM. Modern robust statistical methods: an easy way to maximize the accuracy and power of your research. *Am Psychol*. 2008; 63(7):591–601. <https://doi.org/10.1037/0003-066X.63.7.591> PMID: [18855490](#).
62. Noguchi K, Gel R. L., Brunner E., Konietzschke F. nparLD: An R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. *Journal of Statistical Software*. 2012; 50(12):1–23.
63. Cliff N. Dominance statistics: Ordinal analyses to answer ordinal questions. *Psychological Bulletin*. 1993; 114(3):494–509. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.114.3.494>
64. McGraw KO, Wong SP. A common language effect size statistic. *Psychological Bulletin*. 1992; 111(2):361–5. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.111.2.361>
65. Vargha A, Delaney HD. A Critique and Improvement of the "CL" Common Language Effect Size Statistics of McGraw and Wong. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*. 2000; 25(2):101–32. <https://doi.org/10.2307/1165329>
66. Grissom RJ, Kim JJ. Review of assumptions and problems in the appropriate conceptualization of effect size. *Psychol Methods*. 2001; 6(2):135–46. <https://doi.org/10.1037/1082-989x.6.2.135> PMID: [11411438](#).
67. Greenacre M. Correspondence analysis of the Spanish National Health Survey. *Gac Sanit*. 2002; 16(2):160–70. Epub 2002/04/18. [https://doi.org/10.1016/s0213-9111\(02\)71648-8](https://doi.org/10.1016/s0213-9111(02)71648-8) PMID: [11958753](#).

68. Chavent M., Kuentz V., Labenne A., Liquet B., and Saracco J. (2014). PCAmixdata: Multivariate Analysis of Mixed Data. R package version 2.2.
69. Hill MO, Smith AJE. Principal Component Analysis of Taxonomic Data with Multi-State Discrete Characters. *Taxon*. 1976; 25(2/3):249–55. <https://doi.org/10.2307/1219449>
70. Challet E. Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology*. 2007; 148(12):5648–55. Epub 2007/09/29. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0804> PMID: 17901231.
71. Refinetti R. Variability of diurnality in laboratory rodents. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 2006; 192(7):701–14. Epub 2006/01/20. <https://doi.org/10.1007/s00359-006-0093-x> PMID: 16421752.
72. Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, Sotocinal SG, Rosen S, Tuttle AH, et al. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods*. 2014; 11(6):629–32. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2935> PMID: 24776635.
73. Sharp J, Azar T, Lawson D. Effects of a complex housing environment on heart rate and blood pressure of rats at rest and after stressful challenges. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2014; 53(1):52–60. Epub 2014/01/15. PMID: 24411780.
74. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, European Parliament and the Council(2010).
75. Stauffacher M, Peters A, Jennings M, Hubrecht R, Holgates B, Francis R, et al. Future principles for housing and care of laboratory rodents and rabbits: Report for the revision of the Council of Europe Convention ETS123 Appendix for rodents and rabbits—Part B—Background information for the proposals presented by the Group of Experts on Rodent and Rabbits, GT 123 (2000) 57. Council of Europe, 2000.
76. Sharp J, Azar T, Lawson D. Does cage size affect heart rate and blood pressure of male rats at rest or after procedures that induce stress-like responses? *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2003; 42(3):8–12. Epub 2003/05/01. PMID: 19760827.
77. Sherwin CM. The motivation of group-housed laboratory mice, *Mus musculus*, for additional space. *Animal Behaviour*. 2004; 67(4):711–7. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.08.018>
78. Sherwin CM. The motivation of group-housed laboratory mice to leave an enriched laboratory cage. *Animal Behaviour*. 2007; 73(1):29–35. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.04.008>
79. Gaskill BN, Pritchett-Corning KR. The Effect of Cage Space on Behavior and Reproduction in Cr1:CD1 (Icr) and C57BL/6NCr1 Laboratory Mice. *PLoS One*. 2015; 10(5):e0127875. Epub 20150528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127875> PMID: 26020792.
80. Tepper JS, Weiss B, Wood RW. Alterations in behavior produced by inhaled ozone or ammonia. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1985; 5(6, Part 1):1110–8. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(85\)90147-2](https://doi.org/10.1016/0272-0590(85)90147-2) PMID: 4092873
81. O'Halloran P, Kingsley M, Nicholson M, Staley K, Randle E, Wright A, et al. Responsiveness of the single item measure to detect change in physical activity. *PLoS One*. 2020; 15(6):e0234420. Epub 2020/06/26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234420> PMID: 32584830.
82. Krohn TC, Hansen AK. Evaluation of corncob as bedding for rodents. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences*. 2008; 35(4):231–6.
83. Villalon Landeros R, Morisseau C, Yoo HJ, Fu SH, Hammock BD, Trainor BC. Corncob bedding alters the effects of estrogens on aggressive behavior and reduces estrogen receptor- α expression in the brain. *Endocrinology*. 2012; 153(2):949–53. Epub 2011/12/22. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1745> PMID: 22186416.
84. Pelkonen KH, Hänninen OO. Cytotoxicity and biotransformation inducing activity of rodent beddings: a global survey using the Hepa-1 assay. *Toxicology*. 1997; 122(1–2):73–80. Epub 1997/09/26. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(97\)00079-6](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(97)00079-6) PMID: 9274803.
85. Mani SK, Reyna AM, Alejandro MA, Crowley J, Markaverich BM. Disruption of male sexual behavior in rats by tetrahydrofurandiols (THF-diols). *Steroids*. 2005; 70(11):750–4. Epub 2005/06/02. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.04.004> PMID: 15927221.
86. Markaverich B, Mani S, Alejandro MA, Mitchell A, Markaverich D, Brown T, et al. A novel endocrine-disrupting agent in corn with mitogenic activity in human breast and prostatic cancer cells. *Environ Health Perspect*. 2002; 110(2):169–77. Epub 2002/02/12. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110169> PMID: 11836146.
87. Trainor BC, Takahashi EY, Campi KL, Florez SA, Greenberg GD, Laman-Maharg A, et al. Sex differences in stress-induced social withdrawal: independence from adult gonadal hormones and inhibition of female phenotype by corncob bedding. *Horm Behav*. 2013; 63(3):543–50. Epub 2013/02/07. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.01.011> PMID: 23384773.

88. Hurst JL, Payne CE, Nevison CM, Marie AD, Humphries RE, Robertson DHL, et al. Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature*. 2001; 414(6864):631–4. <https://doi.org/10.1038/414631a> PMID: 11740558
89. Nevison CM, Armstrong S, Beynon RJ, Humphries RE, Hurst JL. The ownership signature in mouse scent marks is involatile. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 2003; 270(1527):1957–63. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2452> PMID: 14561310
90. Arakawa H, Arakawa K, Blanchard D, Blanchard R. Scent marking behavior in male C57BL/6J mice: Sexual and developmental determination. *Behavioural Brain Research*. 2007; 182(1):73–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.05.007> PMID: 17561279
91. Burn CC, Peters A, Day MJ, Mason GJ. Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. *Lab Anim*. 2006; 40(4):353–70. Epub 2006/10/05. <https://doi.org/10.1258/002367706778476460> PMID: 17018207.
92. Coon RA, Jones RA, Jenkins LJ Jr., Siegel J. Animal inhalation studies on ammonia, ethylene glycol, formaldehyde, dimethylamine, and ethanol. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1970; 16(3):646–55. Epub 1970/05/01. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(70\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0041-008x(70)90069-4) PMID: 4987187.
93. Buckley LA, Jiang XZ, James RA, Morgan KT, Barrow CS. Respiratory tract lesions induced by sensory irritants at the RD50 concentration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984; 74(3):417–29. Epub 1984/07/01. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(84\)90295-3](https://doi.org/10.1016/0041-008x(84)90295-3) PMID: 6740688.
94. Kane LE, Barrow CS, Alarie Y. A short-term test to predict acceptable levels of exposure to airborne sensory irritants. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1979; 40(3):207–29. Epub 1979/03/01. <https://doi.org/10.1080/15298667991429516> PMID: 495461.
95. Silverman L, Whittenberger JL, Muller J. Physiological response of man to ammonia in low concentrations. *J Ind Hyg Toxicol*. 1949; 31(2):74–8. Epub 1949/03/01. PMID: 18126182.