

Rīga, 02.12.2018

Vadlīnijas izmēģinājumos izmantojamo dzīvnieku lietotājiem par izmēģinājumu dzīvnieku mikrobioloģiskās uzraudzības stratēģijas ieviešanu uzņēmumos

Pamats:

- FELASA 2014. gadā publicētās rekomendācijas *FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. Lab Anim. 2014 Jul;48(3):178-192*¹;
- apmācību kurss "Health Monitoring of Rodents: Traditional and Innovative Approaches" (organizators *Fondazione Guido Bernardini*, Itālija, 2016. gads).

Dotās vadlīnijas izstrādātas kā rekomendācija izmēģinājuma dzīvnieku lietotājiem, kuriem eksperimentālais darbs galvenokārt norit ar imūnkompetentām laboratorijas pelēm, kas tiek uzturētas individuāli ventilējamās sprostos, un kuriem kā dzīvnieku veselības un mikrobioloģiskā statusa monitorēšanas pieeju apsvērts izmantot indikator dzīvniekus.

1. Vispārējs apraksts un pamatojums

Ticamu un atkārtojamo rezultātu iegūšana ir viens no būtiskākajiem aspektiem eksperimentālajā darbā ar izmēģinājumu dzīvniekiem, īpaši 3Rs kontekstā, un eksperimentālo metožu kā arī izmēģinājumu dzīvnieku standartizēšana tam ir būtisks priekšnoteikums. **Standartizēšanai** ņem vērā zināmus un izmaināmus faktoros, tādus kā izmēģinājuma dzīvnieku suga, līnija, vecums, dzimums, mikrobioloģiskais statuss, kā arī vides faktoros, kas var būtiski ietekmēt bioloģiskās reakcijas izmēģinājuma dzīvniekos – vidi nosakošie fizikālie un ķīmiskie faktori, un mikrobioloģiskā kontrole. Lai nodrošinātu mikrobioloģisko kontroli (angl. – *biocontainment, bioexclusion*) dzīvnieku laboratorijās, tiek izmantotas dažādas un daudzpakāpju pieejas, kas šeit netiks aprakstītas, taču tās ņemamas vērā, izstrādājot dzīvnieku veselības monitorēšanas programmas.

Veselības monitorēšana (turpmāk VM) ir termins, kas apzīmē testēšanas pasākumu kopumu konkrētu patogēnu statusa un vispārējā veselības stāvokļa noteikšanai izmēģinājuma dzīvniekiem, un VM programma ir ieviešama visos izmēģinājuma dzīvnieku audzētāju un lietotāju uzņēmumos. Dzīvnieku **mikrobioloģiskai statusam** ir viens no būtiskākajiem kvalitātes rādītājiem VM programmas kontekstā. Slimība un infekcija nav sinonīmi. Pie infekcijas izraisītājiem var piederēt patogēni, oportunisti un komensāļi, kuriem ir variabla patogenitāte – ir virkne mikroorganismu, kas var inficēt dzīvniekus, tomēr acīm redzamas slimības pazīmes tiem neattīstās. Tomēr arī šādi infekciozie aģenti, izsaucot subklīnisku infekciju, var būtiski ietekmēt eksperimenta rezultātus (izmainīta slimības gaita, imunoloģiskā atbilde, no dzīvniekiem iegūstamo audu paraugu kontaminācija, izmaiņas dzīvnieku uzvedībā, dzīvildzē, reprodūktīvajā veselībā, ķermeņa masas svārstības u.c.) vai apdraudēt cilvēka veselību (zoonozes), tādēļ nepieciešama to kontrole un informācija par dzīvnieka statusu attiecībā uz tiem. Šī iemesla dēļ izmēģinājumu dzīvnieku **mikrobioloģiskā uzraudzība** ir iekļauta FELASA rekomendācijās par VM programmu ieviešanu izmēģinājumu dzīvnieku laboratorijās¹.

2. Mikrobioloģiskās uzraudzības stratēģijas plānošana

Pirms uzsākt mikrobioloģiskās uzraudzības programmas ieviešanu, izmēģinājuma dzīvnieku audzētājiem un lietotājiem būtu jāapzina un jāņem vērā dzīvnieku turēšanas, eksperimentālo un palīgtelpu plānojumu un viņu rīcībā esošās barjeras, kas ieviestas infekciozo aģentu introducēšanas un izplatības kontrolei šajās telpās un pasargātu izmēģinājuma dzīvniekus no saskarsmes ar tiem. Būtiskākie faktori, kas būtu jāņem vērā, izstrādājot izmēģinājuma dzīvnieku **mikrobioloģiskās uzraudzības stratēģiju**, ir apkopoti 1. tabulā. Atkarībā no šiem faktoriem, ir iespējams izstrādāt un ieviest atšķirīgas mikrobioloģiskās uzraudzības stratēģijas, kurās variēs testējamo dzīvnieku skaits, testēšanas biežums un testējamo paraugu avots un skaits, kā arī testēšanas taktikas un specifisku metožu izvēle.

1. tabula. Būtiskākie vērā ņemamie faktori izmēģinājuma dzīvnieku mikrobioloģiskās uzraudzības stratēģijas izstrādei.

- Telpu plānojums un dzīvnieku izmitināšanas apstākļi (ārpus barjeras, barjera, individuāli ventilējams sprosts, izolators u.c.; vai ir iespēja telpās iekļūt insektiem, savvaļas grauzējiem).
- Vides mikrobioloģiskā uzraudzība (piem., HEPA filtrēts gaiss, sterilizēts ūdens, barība, eksperimentālie bioloģiskie materiāli, telpu/virsmu dezinfekcija un tās kontrole).
- Testējamajā telpu kompleksā izmitināmo dzīvnieku suga, līnija un imunoloģiskais statuss un to izmantošanas mērķis (izmantošana eksperimentā vai pavairošana).
- Introdūcējamo izmēģinājuma dzīvnieku ieguves avots/ mikrobioloģiskais statuss (sertificēti izmēģinājuma dzīvnieku audzētāji vai sadarbības partneri, veselības sertifikātā norādītā informācija).
- Mikrobioloģiskās vienības definējums konkrētajā laboratorijā (piem., izolators, sprosts, sprostu statīvs, telpa, telpu komplekss).
- Personāls (laboratorijas telpu apmeklētāju skaits un biežums, personīgie aizsargmateriāli, pārvietošanās iespējamība starp telpām ar atšķirīgu mikrobioloģisko statusu, SOP ievērošana u.c.).
- Veicamā eksperimentālā darba specifika un izvirzītās prasības (zinātniskie mērķi); biodrošības līmeņi (darbs ar infekciozajiem aģentiem/modeļiem).
- Sagaidāmā interesējošo infekciozo aģentu prevalences, izplatības veids un pieejamās testēšanas metodes (to specifiskums, jutība).

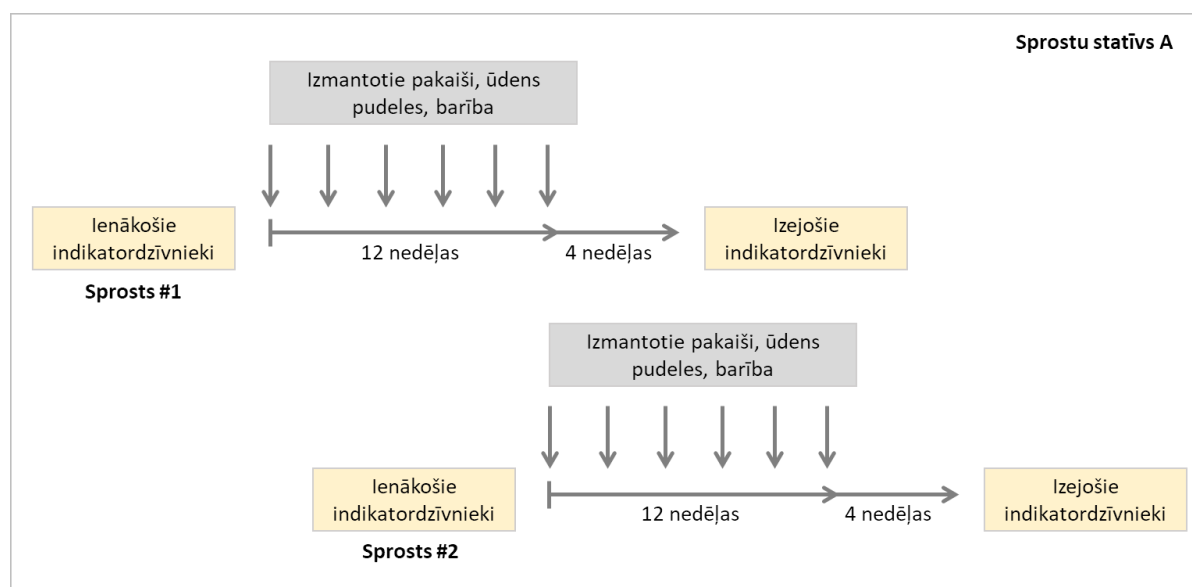
Mūsdienās par ierastu praksi ir kļuvis laboratorijas peles turēt **individuāli ventilējamajos sprostos** (IVC – *individually ventilated cage*) – tās ir slēgta tipa sistēmas, kurās izmitināmas mazas laboratorijas dzīvnieku grupas un kurās ienākošais gaiss tiek HEPA filtrēts un piegādāts atsevišķi katram individuālam IVC, tādējādi radot lokālu barjeru. Ja stingri ievēro nosacījumu, ka šāds sprosts tiek atvērts tikai atbilstoši ventilētā laminārā, kontaminācijas risks starp sprostiem tiek samazināts līdz minimumam un katrs tādējādi katrs individuāls sprosts var tikt uzskatīts par atsevišķu **mikrobioloģisko vienību**. Tomēr visbiežāk šajā gadījumā par noslēgtu mikrobioloģisko vienību tiek pieņemts individuāls IVC statīvs, kas var saturēt līdz 60-80 sprostiem, un kas ir pieslēgts atsevišķai ventilēšanas iekārtai, jo izmēģinājuma dzīvniekiem veikto procedūru dabas (kad IVC tiek atvērti vienotā telpā ārpus lamināra) vai cilvēkfaktoru (organizatorisku un procesuālu) dēļ tomēr iespējama infekciozo aģentu izplatīšanās. Tomēr infekciozo aģentu iespēja izplatīties starp IVC sprostiem ir būtiski samazināta salīdzinājumā ar atvērtā tipa sprostiem, kas noved pie to zemas prevalences dzīvnieku kolonijā, un tādējādi uzraudzīt iespējamo infekciozo aģentu klātbūtni šajā IVC sistēmā sistemātiski ir sarežģīti. Lai iegūtu pēc iespējas sistemātiskāku informāciju par iespējamo infekciozo aģentu klātbūtni šādos gadījumos, visbiežāk rekomendējamā taktika šajā situācijā ir izmantot **indikator dzīvniekus**.

Kā indikator dzīvnieki tiek izmantoti tās pašas sugas īpatņi, laboratorijas peļu gadījumā visbiežāk tās ir imūnkompetentas *outbred* laboratorijas peļu līnijas NMRI, SWISS vai CD-1^{+/+}, kas tiek piegādātas no komerciāliem sertificētiem laboratorijas dzīvnieku audzētājiem, un kurām ir SOPF (*specific and opportunistic pathogen free*) statuss (audzētas izolatoros). Visbiežāk tiek izmantotas 8-10 nedēļas vecas mātītes. Kā variants papildus imūnkompetentajiem dzīvniekiem, var tikt izmantoti arī

imūndeficītie dzīvnieki – lai gan serokonversija tiem nenotiek un seroloģiskajiem testiem to asins paraugi nav izmantojami, tomēr šie dzīvnieki var palīdzēt noteikt subklīniskas infekcijas izraisītāju klātbūtni, kurus imūnkompetentie dzīvnieki spēj imunoloģiski kontrolēt un tādējādi samazina iespēju tos detektēt.

3. Veicamie pasākumi

Indikatorozīvnieki var tikt pakļauti vai nu (i) tiešam kontaktam ar izmēģinājuma dzīvniekiem, vai (ii) izmantotajiem materiāliem (pakaiši, ūdens, barība, sprostu vāki) no eksperimentālo dzīvnieku sprostiem, kas tiek introducēti indikatorozīvnieku sprostos ar zināmu regularitāti un pēc iepriekš definētas shēmas (1. attēls). Eksperimentālajās dzīvnieku laboratorijās visbiežāk tiek izvēlēta tieši otrā no minētajām taktikām (angl. – *soiled bedding sentinels*), lai šiem mērķiem nepakļautu izmēģinājuma dzīvniekus, kuru pieejamība nereti ir ierobežota. Turklāt, IVC izmantošanas gadījumā, nejauši testēšanai izvēlēti eksperimentā izmantotie izmēģinājuma dzīvnieki nesniegtu pilnvērtīgu informāciju par visā sprostu statīvā izmitināto dzīvnieku mikrobioloģisko statusu.



1. attēls. Indikatorozīvnieku izmantošanas shēma eksperimentālajās dzīvnieku laboratorijās. Uz vienu IVC statīvu (60-80 sprosti) tiek rekomendēts vismaz viens sprosts ar indikatorozīvniekiem, katrā sprostā izmitināmas 2-5 peles. Ik nedēļu (vai ik pāris nedēļas) un vismaz 12 nedēļas no vietas indikatorozīvnieki tiek pakļauti tiešai saskarsmei ar netīrajiem pakaišiem, izmantotajām ūdens pudelēm un barības paliekām no eksperimentālo dzīvnieku individuāli ventilējamajiem sprostiem (vismaz 50% no pakaišiem indikatorozīvnieku sprostos jāstāda netīrajiem pakaišiem no izmēģinājuma dzīvnieku sprostiem, kas ievākti sprostu maiņas laikā, un tiek savākti pēc iepriekš izstrādātas shēmas). Pēc 12 nedēļām IVC statīvā tiek introducēts papildus sprosts #2 ar jauniem SOPF indikatorozīvniekiem, kuriem tiek uzsākta dotā administrēšanas shēma, lai nodrošinātu mikrobioloģiskās uzraudzības nepārtrauktību. Savukārt sprosts #1 ar indikatorozīvniekiem tiek turēts vēl četras nedēļas, pirms dzīvnieki vai to bioloģiskais materiāls tiek nodots testēšanai (gadījumā, ja inficēšanās notikusi pēdējā administrēšanas nedēļā, ir nepieciešams laiks serokonversijai). Tad, vadoties pēc izvēlētas testēšanas taktikas, vai nu dzīvi dzīvnieki (piem., 2 no 4) vai to paraugi tiek sūtīti uz sertificētu testēšanas laboratoriju, un uzņēmumā palikušie indikatorozīvnieki netiek eitanazēti pirms testēšanas pārskata saņemšanas. Vajadzības gadījumā šie dzīvnieki ir pieejami atkārtotiem testiem un/vai patoloģijas slēdzienam.

Peļu patogēnu transmisija no viena dzīvnieka uz citu var notikt dažādos atšķirīgos veidos – aerosolu veidā (ar gaisu), fekāli-orāli, tieša kontakta veidā, ar dzīvniekam administrējamo bioloģisko materiālu (šūnu līnija, vielu suspensijas u.c.), un šis faktors ir būtisks gan izvēloties indikatorozīvniekiem

ekspozējamo materiālu, gan testēšanas metodi. FELASA rekomendācijas attiecībā uz **testējamajiem patogēniem** (baktērijām, vīrusiem un parazītiem) laboratorijas pelēs un to testēšanas biežumu apkopoti 2. tabulā.

2. Tabula. Rekomendējamais monitorējamo infekciozo aģentu saraksts un testēšanas biežums laboratorijas pelēm (*Mus musculus*) (kopēts tabulas oriģināls no FELASA rekomendācijām).

	Every 3 months	Annually
Viruses		
Mouse hepatitis virus	x	
Mouse rotavirus	x	
Murine norovirus	x	
Parvoviruses:		
Minute virus of mice	x	
Mouse parvovirus	x	
Theiler's murine encephalomyelitis virus	x	
Lymphocytic choriomeningitis virus		x
Mouse adenovirus type 1 (FL)		x
Mouse adenovirus type 2 (K87)		x
Mousepox (ectromelia) virus		x
Pneumonia virus of mice		x
Reovirus type 3		x
Sendai virus		x
Bacteria		
<i>Helicobacter</i> spp.	x	
If positive, speciation for <i>H. hepaticus</i> , <i>H. bilis</i> and <i>H. typhlonius</i> is recommended		
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	x	
Streptococci β-haemolytic (not group D)	x	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	x	
<i>Citrobacter rodentium</i>		x
<i>Clostridium piliforme</i>		x
<i>Corynebacterium kutscheri</i>		x
<i>Mycoplasma pulmonis</i>		x
<i>Salmonella</i> spp.		x
<i>Streptobacillus moniliformis</i>		x
Parasites		
Endo- and ectoparasites (reported to the genus level)	x	
Additional agents*		
Viruses:		
Hantaviruses		
Herpesviruses (mouse cytomegalovirus, mouse thymic virus)		
Lactate-dehydrogenase elevating virus		
Polyomaviruses (mouse polyomavirus, K virus)		
Bacteria and fungi:		
Cilia-associated respiratory bacillus		
<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Other <i>Pasteurellaceae</i> [†]		
<i>Pneumocystis murina</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
Others as necessary		

VM programmas, kas izmanto indikatordzīvniekus izmēģinājumu dzīvnieku mikrobioloģiskā statusa noteikšanai, klasiski kombinē dažādas testēšanas metodes – seroloģiskās analīzes (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*, IFA – *immunofluorescence assay*, MIA – *microsphere immunoassay*) uz ievāktiem asins paraugiem, PCR, mikroskopiski izmeklējumi un mikrobioloģiskie uzsējumi no uztriepēm. Visvienkāršākais no veidiem, kā testēt plašu patogēnu spektru, ir sūtīt uz sertificētu testēšanas laboratoriju dzīvus dzīvniekus; piemēram, no četriem vienā sprostā izmitināmiem indikatordzīvniekiem divi tiek sūtīti testēšanai, kamēr divi paturēti atkārtotām/papildus analīzēm nepieciešamības gadījumā. Taču ir iespējams paņemt testējamus paraugus uz vietas uzņēmumā un nosūtīt tos uz laboratoriju testēšanai, tādējādi ietaupot dzīvnieku transportēšanas izmaksas, kas var būt visai ievērojamas. Izmēģinājuma dzīvnieku lietotāji var apsvērt daļēji izmantot *in-house* testa metodes, tomēr jāņem vērā, ka nepieciešams izmantot adekvātas pozitīvās un negatīvās kontroles, pārzināt doto patogēnu ģenētiskās īpatnības un antigenitātes variabilitāti, un ne vienmēr šāda ekspertīze/mikroorganismu kolekcijas uzņēmumos ir pieejamas. Tādēļ rekomendējami sertificētu testēšanas laboratoriju pakalpojumi.

Ja dzīvnieki tiek turēti individuāli ventilējamos sprostos, var tikt izmantoti speciāli filtri ieliktnī, kas savāc daļiņas izejošā gaisa plūsmas ceļā no visa sprostu statīva. Šādi filtri var tikt izmantoti zemas prevalences (1-5 inficēti sprostī no 60) patogēnu detektēšanai individuālā sprostu statīvā, izmantojot PCR metodi, un atsevišķos gadījumos šī metode ir parādīta kā efektīvāka par indikatordzīvnieku metodi^{2,3}, tādēļ izmantojama kā komplementāra pieeja, un var tikt izmantota biežāk – reizi mēnesī. Ideālā gadījumā, abas šīs metodes būtu vēlams kombinēt, jo tās ir savstarpēji papildinošas, un neviena no tām nesniedz pilnīgu informāciju⁴.

Indikatordzīvnieki netiek eitanazēti līdz testēšanas pārskata beigām, kas ļauj nepieciešamības gadījumā atkārtoti/detalizēti testēt infekciozos aģentus vai nu nosūtot paraugus uz citu sertificētu laboratoriju vai apstiprināt iespējami pozitīvus gadījumus, izmantojot citas testa metodes. Pēc testēšanas pārskata saņemšanas, uzņēmumā tiek gatavots VM pārskats par noteikto periodu. Tajā iekļaujama informācija, kas sniedz pilnīgu ainu par uzņēmuma atbilstošo izmēģinājuma dzīvnieku un tādējādi konkrēto testējamo mikrobioloģisko vienību statusu attiecībā uz konkrētajiem patogēniem. Rekomendētā VM pārskatā iekļaujamā informācija apkopota 3. tabulā.

3. Tabula. Rekomendācijas norādāmajai informācijai, kas iekļaujama veselības monitorēšanas pārskatā.

-
- Telpas(u) apzīmējums un dzīvnieku izmitināšanas apstākļi (ārpus barjeras, barjera, individuāli ventilējams sprosts, izolators u.c.).
 - Testējamajā telpu kompleksā izmitināmās dzīvnieku sugas un līnijas (katrai sugai sagatavojams atsevišķs pārskats).
 - Pēdējās testēšanas datums un pārskata sagatavošanas datums.
 - Katra aģenta testēšanas biežums.
 - Visu testējamo aģentu nosaukumi alfabētiskā secībā, kategorizēti pēc patogēnu klases.
 - Katra aģenta detektēšanai izmantotā testa metode un testēšanas laboratorijas nosaukums.
 - Pēdējās testēšanas rezultāti (ideālā gadījumā norādāmi visi līdzšinējie testēšanas rezultāti), bet ne mazāk kā 18 mēnešu garumā (izteikti kā pozitīvo dzīvnieku skaits/testēto dzīvnieku skaits).
 - Ja dzīvniekiem veikta patoloģiskā izmeklēšana, rezultātus izsaka kā: izmeklējumu rezultātā dzīvniekos izmaiņas tika/netika novērotas; katrai sugai/līnijai patoloģiskās izmaiņas jānodala atsevišķā sarakstā.
 - Pārskatā jāparedz vieta komentāriem (piemēram, piezīmēm vai izmēģinājuma dzīvnieki ir tikuši medikamentozī ārstēti no konkrēta patogēna).
 - Par VM programmas atbildīgās personas vārds un kontaktinformācija.
 - Vispārējs VM programmas apraksts.
-

4. Rīcības plāns pozitīva testēšanas rezultāta gadījumā

Ja testēšanas pārskatā uzrādās kaut viens pozitīvs rezultāts, vispirms šis atradums ir jāapstiprina – vai nu ar citām testēšanas metodēm, vai nosūtot paraugus atkārtoti uz to pašu vai (vēlams) citu sertificētu testēšanas laboratoriju, jo ir iespējami falsi pozitīvi rezultāti. Bez tam, ja pieejamas iepriekš validētas *in-house* metodes (piem., PCR praimeru paneļi), ir iespējams salīdzinoši ātri un lēti veikt skrīningu uz doto patogēnu, testējot visus eksperimenta sprostus/dzīvniekus, lai noskaidrotu infekcijas izplatības pakāpi. Ja infekcija ir apstiprināta, tad iespējami trīs rīcības plāni:

- Ja dotā patogēna/mikroorganisma klātbūtne ir uzskatāma par salīdzinoši neitrālu – t.i., neietekmē vai minimāli ietekmē eksperimentālā darba gaitu/rezultātus, to var atzīt un nekāda papildus rīcība neseko; tomēr ir svarīgi darīt to zināmu visām iesaistītajām pusēm (tai skaitā minēt šo faktu, publicējot zinātniskā darba rezultātus); paralēli tam, tiek veikti pasākumi, lai ierobežotu dotās infekcijas izplatību uz citām mikrobioloģiskajām vienībām uzņēmumā;
- Ja ir pieejams efektīvs terapijas veids, dzīvniekus var ārstēt no dotās infekcijas (eksperimentālajās laboratorijās reti izmantots variants); ja izmēģinājuma dzīvnieki ir īpaši vērtīgi (piem., transģēnas peļu līnijas), var tikt veikta rederivācija vai embrionālā pārnese, tādējādi atjaunojot dotās peļu līnijas SPF/SOPF statusu.
- Ja patogēns rada nopietnu apdraudējumu un nav pieejama efektīva ārstēšanas metode, eksperimentālais darbs tiek pārtraukts, visi izmēģinājuma dzīvnieki eitanazēti, laboratoriju telpās veikti efektīvi dezinfekcijas pasākumi un introducēti jauni SPF/SOPF dzīvnieki ar atbilstošu veselības sertifikātu.

Vadoties pēc pieejamās zinātniskās literatūras un FELASA vadlīnijām, gadījumā, kad izmēģinājuma dzīvnieki tiek turēti IVC, iespēja iegūt pilnībā reprezentatīvus datus par infekciozo aģentu izplatību eksperimentālajā kolonijā ir apgrūtināta, jo indikator dzīvnieku izmantošana, pakļaujot tos izmantotajiem pakaišiem un citiem materiāliem, var izrādīties nepietiekama. Tomēr tā ir un paliek standarta metode mikrobioloģiskā statusa noteikšanai šajās dzīvnieku izmitināšanas sistēmās, un iespēju robežās ir papildināma ar komplementārām VM programmas komponentēm atkarībā no uzņēmumā īstenotā eksperimentālā darba specifikas un vajadzībām.

Literatūras avoti:

- 1 Mahler Convenor, M. *et al.* FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* **48**, 178-192, doi:10.1177/0023677213516312 (2014).
- 2 <<http://www.tecniplast.it/usermedia/en/PRODUCTS/housing-cages/interceptor/WhitePaper.pdf>>
- 3 Mahabir, E., Durand, S., Henderson, K. S. & Hardy, P. Comparison of two prevalent individually ventilated caging systems for detection of murine infectious agents via exhaust air particles. *Lab Anim*, 23677218785929, doi:10.1177/0023677218785929 (2018).
- 4 de Bruin, W. C., van de Ven, E. M. & Hooijmans, C. R. Efficacy of Soiled Bedding Transfer for Transmission of Mouse and Rat Infections to Sentinels: A Systematic Review. *PLoS One* **11**, e0158410, doi:10.1371/journal.pone.0158410 (2016).

Vadlīnijas sagatavoja:

Dr. biol. Zane Kalniņa

Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju centra vadošā pētniece,
Laboratorijas dzīvnieku bloka vadītāja

Paraksts: 