# VADLĪNIJAS IZMĒĢINĀJUMOS IZMANTOJAMO DZĪVNIEKU LIETOTĀJIEM PAR IZMĒĢINĀJUMU DZĪVNIEKU MIKROBIOLOĢISKĀS UZRAUDZĪBAS STRATĒĢIJAS IEVIEŠANU UZŅĒMUMOS

ZANE KALNIŅA (BMC) | NK SĒDE 27.05.2019

# LIKUMDOŠANĀ IESTRĀDĀTĀS PRASĪBAS

**Ministru kabineta noteikumi Nr. 1** Rīgā 2019. gada 8. janvārī (prot. Nr. 1 18. §)
**Zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzības noteikumi**

**III. Dzīvnieku kopšana**

10. Veselība:

10.1. izmēģinājumu dzīvnieku audzētājs, piegādātājs vai lietotājs ir izveidojis stratēģiju, lai nodrošinātu, ka tiek uzturēts tāds izmēģinājumu dzīvnieku veselības stāvoklis, kas nodrošina izmēģinājumu dzīvnieku labturību un atbilst zinātniskajām prasībām. Šajā stratēģijā ietilpst:

10.1.1. regulāras veselības pārbaudes;

10.1.2. mikrobioloģiskās uzraudzības programma;

10.1.3. plāni rīcībai veselības traucējumu gadījumā;

10.1.4. veselības parametri un procedūras jaunu dzīvnieku ieviešanai;

# 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)

# VISPĀRĒJS PAMATOJUMS

**Standartizēšanai** ņem vērā zināmus un izmaināmus faktorus, tādus kā:

- izmēģinājuma dzīvnieku suga, līnija, vecums, dzimums, **mikrobioloģiskais statuss** (SPF, SOPF)
- vides faktorus, kas var būtiski ietekmēt bioloģiskās reakcijas izmēģinājuma dzīvniekos – vidi nosakošie fizikālie un ķīmiskie faktori, un **mikrobioloģiskā kontrole**

## SLIMĪBA UN INFEKCIJA NAV SINONĪMI

Pie infekcijas izraisītājiem var piederēt patogēni, oportūnisti un komensāļi, kuriem ir variabla patogenitāte – ir virkne mikroorganismu, kas var inficēt dzīvniekus, tomēr acīm redzamas slimības pazīmes tiem neattīstās.

BET! Subklīniska infekcija var novest pie izmainīta slimības gaitas, imunoloģiskās atbildes, no dzīvniekiem iegūstamo audu paraugu kontaminācijas, izmaiņām dzīvnieku uzvedībā, dzīvildzē, reproduktīvajā veselībā, ķermeņa masas svārstībās u.c.) vai apdraudēt cilvēka veselību (zoonozes), tādēļ nepieciešama to kontrole un informācija par dzīvnieka statusu attiecībā uz tiem.

**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** | | |
| *Helicobacter* spp. | x | |
| If positive, speciation for *H. hepaticus*, *H. bilis* and *H. typhlonius* is recommended | | |
| *Pasteurella pneumotropica* | x | |
| Streptococci β-haemolytic (not group D) | x | |
| *Streptococcus pneumoniae* | x | |
| *Citrobacter rodentium* | | x |
| *Clostridium piliforme* | | x |
| *Corynebacterium kutscheri* | | x |
| *Mycoplasma pulmonis* | | x |
| *Salmonella* spp. | | x |
| *Streptobacillus moniliformis* | | x |
| **Parasites** | | |
| Endo- and ectoparasites (reported to the genus level) | x | |

# MIKROBIOLOĢISKĀS UZRAUDZĪBAS PROGRAMMA

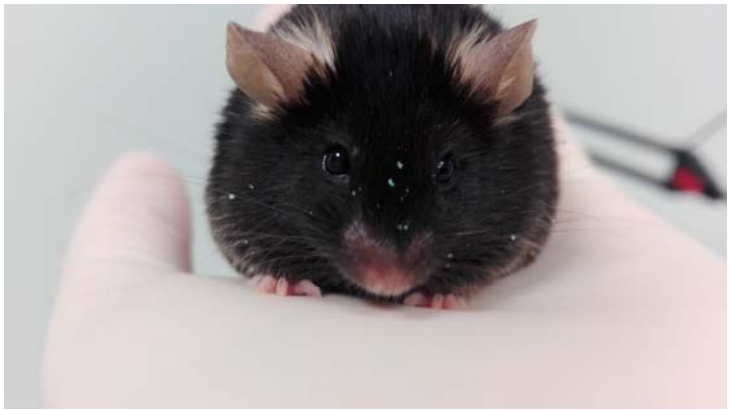
**Mikrobioloģiskās kontroles pasākumi izmēģinājuma dzīvnieku turētāja telpās (*biocontainment, bioexclusion*)**

***Dzīvnieku mikrobioloģiskā statusa izvērtēšana (vismaz 1x 3 mēnešos)***

## Būtiskākie vērā ņemamie faktori dzīvnieku mikrobioloģiskās uzraudzības programmas 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).
- Introducējamo 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 prevalence, izplatības veids un pieejamās testēšanas metodes (to specifiskums, jutība).

- Dotās vadlīnijas izstrādātas kā rekomendācija izmēģinājuma dzīvnieku lietotājiem, kuriem eksperimentālais darbs norit galvenokārt ar **imūnkompetentām laboratorijas pelēm**, kas tiek uzturētas **individuāli ventilējamos sprostos**, un kuriem kā dzīvnieku veselības un mikrobioloģiskā statusa monitorēšanas pieeju apsvērts izmantot **indikatordzīvniekus**



# MIKROBIOLOĢISKĀ VIENĪBA

- IVC – atsevišķs sprosts
- IVC statīvs
- Telpa (HEPA filtri)
- Vivārijs?

- 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 **indikatordzīvniekus**.

# INDIKATORDZĪVNIEKI

- Kā indikatordzīvnieki 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.

# VEICAMIE PASĀKUMI

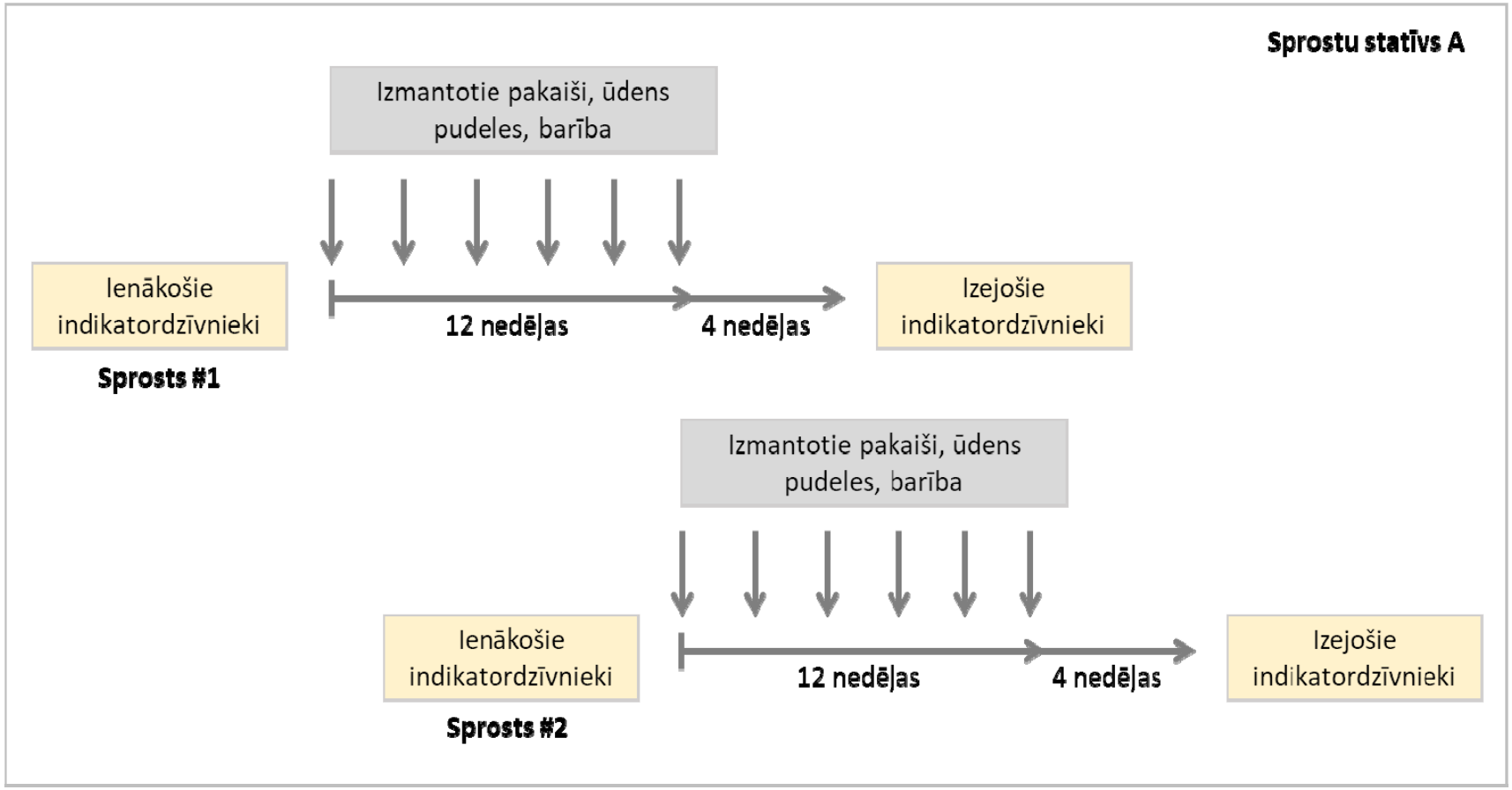
- Indikatordzīvnieki var tikt pakļauti vai nu

  (i) tiešam kontaktam ar izmēģinājuma dzīvniekiem, vai

  (ii) izmantotajiem materiāliem (pakaiši, ūdens, barība, sprostu vāki) no eksperimentālo dzīvnieku sprostiem, kas tiek introducēti indikatordzīvnieku sprostos ar zināmu regularitāti un pēc iepriekš definētas shēmas

- 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.

# INDIKATORDZĪVNIEKU IZMANTOŠANAS SHĒMA



# TESTĒJAMAIS MATERIĀLS

- 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 indikatordzīvniekiem eksponējamo materiālu, gan testēšanas metodi.
- Klasiski tiek kombinētas dažādas testēšanas metodes – seroloģiskās analīzes (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, IFA – imunofluorescence assay, MIA – microsphere immunoassay) uz ievāktiem asins paraugiem, PCR, mikroskopiski izmeklējumi un mikrobioloģiskie uzsējumi no uztriepēm.
- Testēšanai var tikt sūtīti dzīvi indikatordzīvnieki vai arī ievākti atšķirīgi bioloģiskie paraugi, kas nosūtīti uz testēšanas laboratoriju
- Rekomendējami sertificētu testēšanas laboratoriju pakalpojumi.

# PAPILDUS IZMANTOJAMA STRATĒĢIJA

- Ja dzīvnieki tiek turēti individuāli ventilējamos sprostos, var tikt izmantoti **speciāli filtru ieliktņi**, kas savāc daļiņas izejošā gaisa plūsmas ceļā no visa sprostu statīva.
- Šādi filtri var tikt izmantoti zemas prevalences (1-5 inficēti sprosti no 60) patogēnu detektēšanai individuālā sprostu statīvā, izmantojot PCR metodi, un atsevišķos gadījumos šī metode ir parādīta kā efektīvāka par indikatordzīvnieku metodi, tādēļ izmantojama kā **komplementāra pieeja**, un var tikt izmantota biežāk – **reizi mēnesī**.

## 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 medikamentozi ārstēti no konkrēta patogēna).
- ✓ Par VM programmas atbildīgās personas vārds un kontaktinformācija.
- ✓ Vispārējs VM programmas apraksts.

# RĪCĪBAS PLĀNS POZITĪVA TESTĒŠANAS REZULTĀTA GADĪJUMĀ

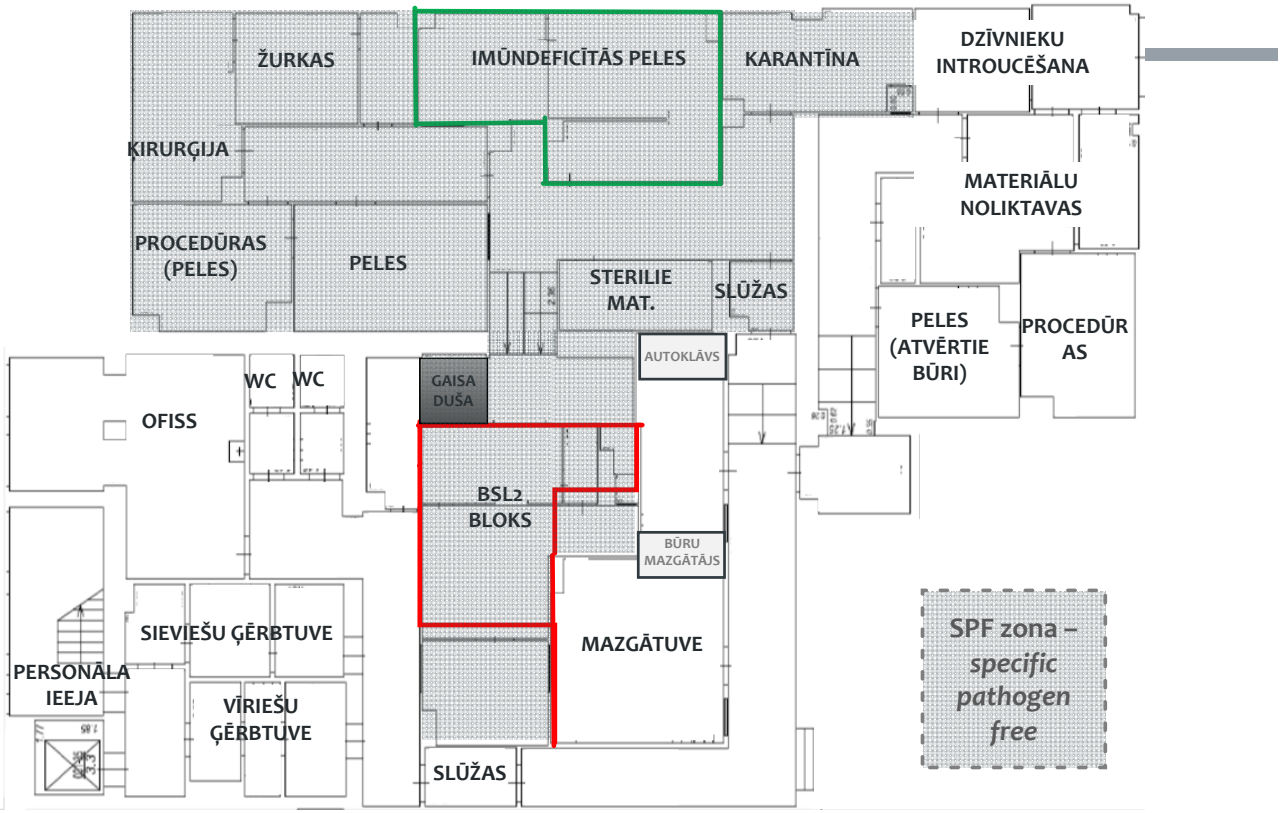
- Pārliecināties, vai rezultāti nav falsi pozitīvi (atkārtota testēšana – specifiskākas metodes? cita laboratorija?)
- Ar *in-house* metodēm (PCR?) veikt plašu skrīningu uz eksperimentālo sprostu paraugiem, lai izvērtētu patogēna izplatību.
- Ja patogēna klātbūtne pierādīta, ir vairāki scenāriji:
    1. Ja dotā patogēna/mikroorganisma klātbūtne neietekmē vai minimāli ietekmē eksperimentālā darba gaitu/rezultātus, to var atzīt un nekāda papildus rīcība neseko;
    2. Ja ir pieejams efektīvs terapijas veids, dzīvniekus var ārstēt; ja izmēģinājuma dzīvnieki ir īpaši vērtīgi (piem., transgēnas peļu līnijas), var tikt veikta rederivācija vai embrionālā pārnese;
    3. 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.

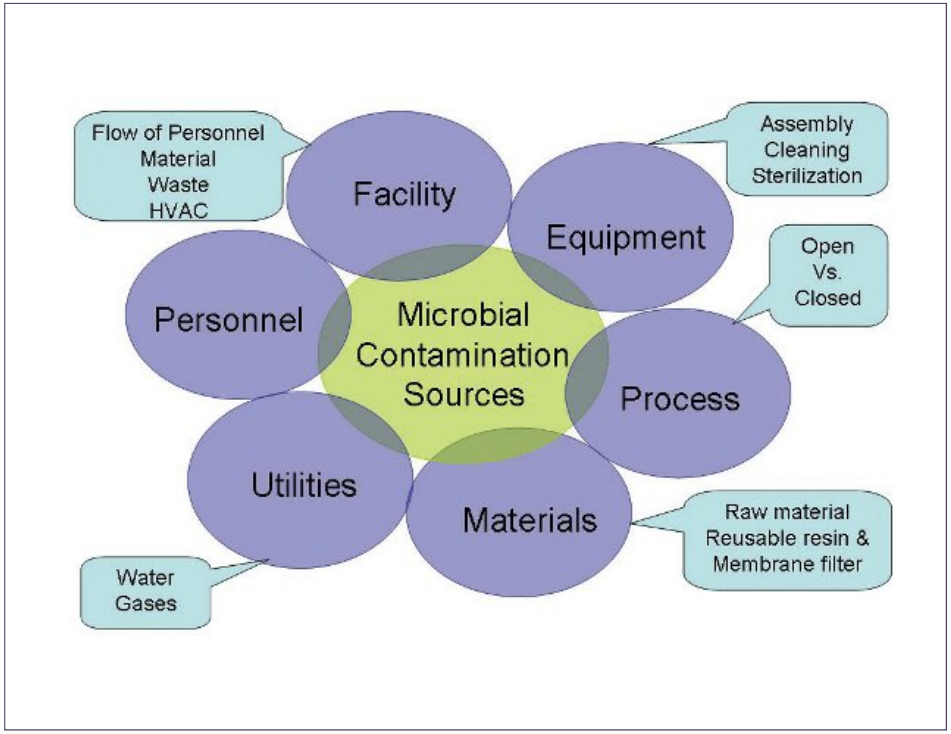
Vadoties pēc pieejamās zinātniskās literatūras un FELASA vadlīnijām, gadījumā, kad izmēģinājuma dzīvnieki tiek turēti IVC, iespēja iegūt pilnībā reprezentatīvus datus par infekciozo aģentu izplatību eksperimentālajā kolonijā ir apgrūtināta, jo indikatordzīvnieku izmantošana, pakļaujot tos izmantotajiem 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 komponenetēm atkarībā no uzņēmumā īstenotā eksperimentālā darba specifikas un vajadzībām.

Jautājumi?

# DZĪVNIEKU VESELĪBAS MONITORĒŠANAS  BMC


ŽURKAS
IMŪNDEFICĪTĀS PELES
KARANTĪNA
DZĪVNIEKU INTROUCĒŠANA
KIRURĢIJA
MATERIĀLU NOLIKTAVAS
PROCEDŪRAS (PELES)
PELES
STERILIE MAT.
SLŪŽAS
PELES (ATVĒRTIE BŪRI)
PROCEDŪRAS
AUTOKLĀVS
WC
WC
GAISA DUŠA
OFISS
BSL2 BLOKS
BŪRU MAZGĀTĀJS
MAZGĀTUVE
SIEVIEŠU ĢĒRBTUVE
PERSONĀLA IEEJA
VĪRIEŠU ĢĒRBTUVE
SLŪŽAS
SPF zona – specific pathogen free




*BIOCONTAINMENT & BIOEXCLUSION*