

Zwierzęta laboratoryjne SPF – niezbędne modele w badaniach biomedycznych

MAREK WOSZCZYŃSKI, ALINA CZARNOMSKA

Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Centrum Onkologii,
Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie ul. W. K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

Woszczyński M, Czarnomska A.

SPF laboratory animals – indispensable models in biomedical research

Summary

According to international requirements, SPF animals are indispensable models in biomedical research. The paper presents the classification of laboratory animals according to their health status, list of eliminated microorganisms in the described SPF colony, diagnostic methods and recommended „barrier maintained systems”.

Keywords: laboratory animals, SPF health category.

Stale rosnące wymagania światowe dotyczące zwierząt laboratoryjnych używanych w badaniach doświadczalnych, zasady GLP (Good Laboratory Practice), do których powinniśmy zacząć się stosować dążąc do dołączenia do Unii Europejskiej i chcąc aby nasze wyniki badań były uznawane w świecie, a także polskie przepisy prawne (Ustawa o Ochronie Zwierząt art. 9 pkt 11 obowiązująca od sierpnia 1997 r.) doprowadziły do konieczności podjęcia zdecydowanych działań w kierunku ujednoczenia i poprawy jakości genetycznej i zdrowotnej hodowanych w Polsce zwierząt laboratoryjnych. Jeden z paragrafów wymienionej Ustawy mówi wyraźnie, że do badań i testów należy używać zwierząt pochodzących z uprawnionych hodowli, to znaczy zwierząt określonych genetycznie i o ustalonym standardzie zdrowotnym. Ponadto zgodnie z wymaganiami międzynarodowymi doświadczenia o charakterze biomedycznym powinny być wykonywane na zwierzętach kategorii SPF (Specified Pathogen Free). Zwierzęta laboratoryjne nie tylko te, u których występują łatwo wykrywalne objawy choroby ale również bezobjawowi nosiciele zakażeń patogennych, według współcześnie obowiązujących zasad nie nadają się do doświadczeń, szczególnie do doświadczeń biomedycznych. Bezobjawowe zakażenia mikroorganizmami chorobotwórczymi mogą znacznie skomplikować interpretację wyników badań lub je wręcz zafałszować. Mając na celu wyeliminowanie takich zagrożeń opracowano w latach pięćdziesiątych przy współdziałaniu organizacji międzynarodowych (WHO – World Health Organization, FAO – Food and Agriculture Organization, ILAR – Institute for Laboratory

Animal Resources, ICLAS – International Council for Laboratory Animal Science) następującą kategoryzację zwierząt laboratoryjnych (4, 6):

1. Zwierzęta gnotobiotyczne:

◆ germ free (GF) – wolne od wszystkich wykrywalnych mikroorganizmów i pasożytów

◆ monobionty	} zwierzęta GF celowo zasiedlone jednym, dwoma lub wieloma określonymi rodzajami mikroorganizmów
◆ dibionty	
◆ polibionty	

2. Zwierzęta SPF

3. Zwierzęta konwencjonalne (CV-I, CV-II, CV-III (6)).

Opracowano też wykazy mikroorganizmów, które powinny być wykluczone u zwierząt danej kategorii i gatunku. Dołączono sugestie do jakich rodzajów badań można i należy używać zwierzęta należące do poszczególnych kategorii zdrowotnych (6).

U zwierząt określanych jako gnotobiotyczne wszystkie obecne mikroorganizmy pochodzące z celowego zasiedlenia są znane i sklasyfikowane tak dalece, jak pozwalają na to aktualnie stosowane metody diagnostyczne. Stanowią one idealne modele doświadczalne, ale ze względu na koszty związane ze stosowaną techniką i wyposażeniem używane są tylko w doświadczeniach, w których wzajemne oddziaływanie gospodarza i mikroflory pełni szczególnie ważną rolę.

Zwierzęta SPF (Specified Pathogen Free) są wolne od wybranych dla danego gatunku mikroorganizmów. Samo określenie SPF jest pustym terminem, musi mu zawsze towarzyszyć dokładny wykaz mikroorganizmów, od których zwierzęta są uwolnione i stosowa-

nych metod diagnostycznych, nazwa ośrodków, w których badania są wykonywane, oraz częstość wykonywanych badań i termin ostatniego badania. Zwierzęta SPF stanowią pewien ekosystem, składający się z makroorganizmu (zwierzę) i licznych mikroorganizmów, spośród których tylko niektóre zostały wyeliminowane. Podczas gdy u zwierząt gnotobiotycznych wszystkie obecne mikroorganizmy są określone i sklasyfikowane u zwierząt SPF określone i sklasyfikowane są wyłącznie te, które zostały wyeliminowane.

Termin SPF został zaproponowany i rekomendowany w 1958 r. przez Subcommittee on Laboratory Animal Production of the Institute for Laboratory Animal Resources (ILAR) – New York Academy of Sciences, tłumaczony jako „Specific Pathogen Free” dla określenia zwierząt wolnych od mikroorganizmów chorobotwórczych wykrywanych przy zastosowaniu odpowiednich metod laboratoryjnych. Wkrótce termin ten został reinterpretowany jako „Specified Pathogen Free”).

Zwierzęta SPF uzyskuje się:

1. zasiedlając zwierzęta początkowo GF zestawem tlenowych i beztlenowych mikroorganizmów, a następnie utrzymując je poza izolatem w pokojach hodowlanych wyposażonych w odpowiednie bariery techniczne i higieniczne,

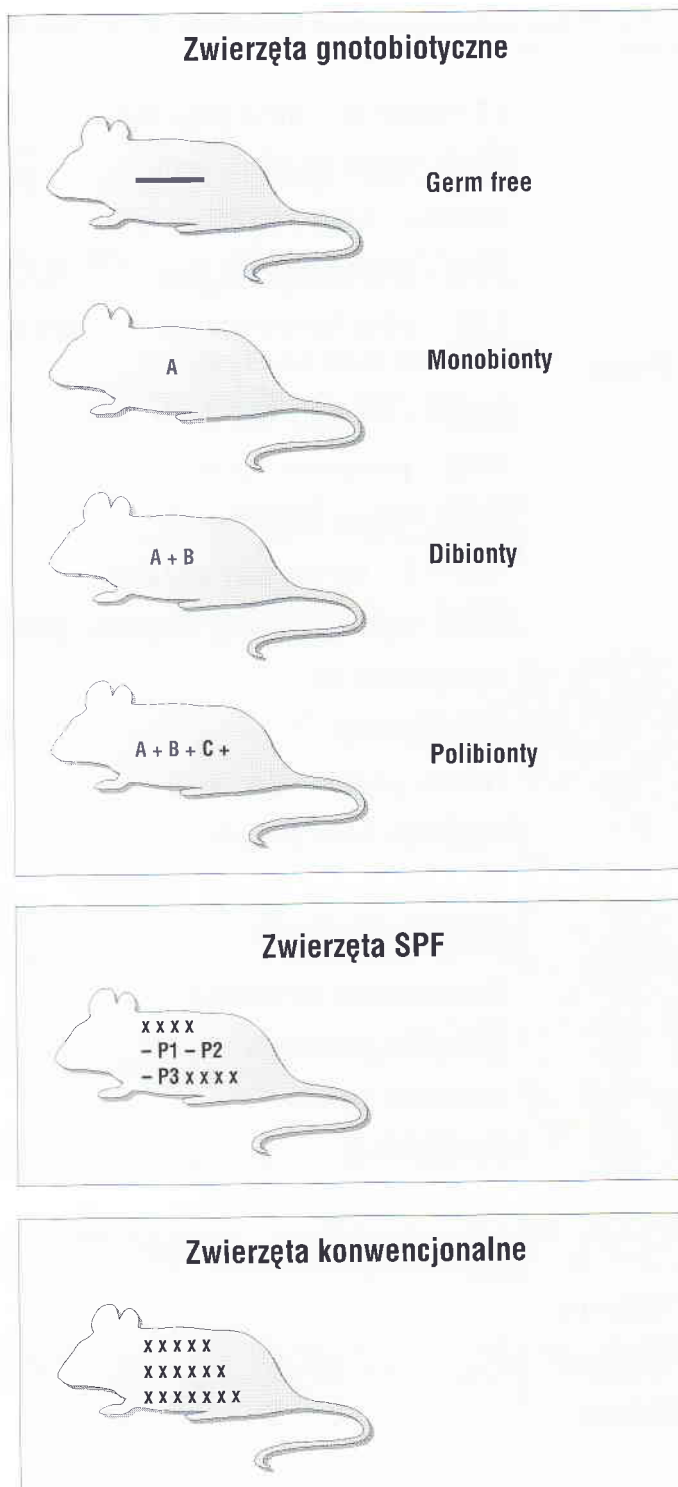
2. stosując środki terapeutyczne lub długotrwałe utrzymywanie w kontrolowanych warunkach wyższego standardu higienicznego (za barierą) z równoczesną regularnie prowadzoną ich kontrolą mikrobiologiczną i selekcją.

Rozróżnia się trzy różne systemy utrzymywania zwierząt zależne od dostępnego wyposażenia zwierzętami (3, 4):

- ◆ system hodowli otwartej (open system)
- ◆ system zamknięty barierą higieniczną (barrier maintained system)
- ◆ system izolatorowy (izolator system).

Zwierzęta SPF muszą być chronione przez efektywną barierę higieniczną. Dobre warunki higieniczne pozwalają w zamkniętych hodowlach SPF utrzymać przez wiele lat ich wysoki poziom zdrowotny. Zwierzęta SPF żyją dłużej aniżeli zwierzęta pozornie zdrowe – noszące zakażenia utajone, a ich zdolności reprodukcyjne są podwyższone. Podobnie, jak ma to miejsce u ludzi w społeczeństwie cywilizowanym, zwierzęta te nie umierają na skutek chorób zakaźnych. Czynniki odpowiedzialne za ich śmierć zmieniają się podobnie jak w społeczeństwie ludzkim m.in. zwiększa się umieralność spowodowana chorobami nowotworowymi występującymi głównie u starszych zwierząt.

Większość badań w Polsce prowadzona jest jeszcze na zwierzętach konwencjonalnych z hodowli otwartej. Ich status higieniczny nie jest określony. Wyniki doświadczeń uzyskane na takich zwierzętach są zawsze niepewne i ich wartość naukowa może być kwestionowana, często nie udaje się ich powtórzyć ani też nie mogą być poddane dyskusji i porównywane z wynikami uzyskanymi w innych ośrodkach naukowo-badawczych.



Ryc. 1. Kategorie zdrowotne zwierząt laboratoryjnych (Według Heine W. O. P., 1998 (4) zmodyfikowane)

Objaśnienia: A + B + C + = zwierzęta zasiedlone celowo określonymi gatunkami mikroorganizmów, - P1 - P2 - P3 = zwierzęta uwolnione od określonych gatunków mikroorganizmów patogennych, x x x = zwierzęta zasiedlone nieokreślonymi gatunkami mikroorganizmów

Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych pełniący od 10 lat funkcję Ośrodka Referencyjnego ds. Hodowli Gryzoni Laboratoryjnych firmowanego przez ICLAS, korzystał i nadal korzysta z konsultacji i materiałów dostarczanych przez tę organizację. Budo-

Tab. 1. Wykaz mikroorganizmów i pasożytów wykluczonych u zwierząt z hodowli SPF w Centrum Onkologii

Wirusy	ECTROMELIA – wirus ospy mysiej
	MHV – wirus zapalenia wątroby
	SENDAI – wirus parainfluenzy 1
	PVM – wirus zapalenia płuc
	LCM – wirus limfocytarnego zapalenia opon mózgowych i splotów naczyniówkowych
	REO-3 – reowirus typu 3
	MVM – parvovirus myszy
	TMEV – wirus Theiler'a
	KRV/H-1 – parwovirusy szczurów
	SDAV – wirus zapalenia ślinianek i gruczołów łzowych
Bakterie	<i>Mycoplasma sp.</i>
	<i>Salmonella sp.</i>
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
	<i>Corynebacterium murium Kutscheri</i>
	<i>Proteus sp.</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Citrobacter sp.</i>
Stawonogi	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tasiecmce	
Nicieńie	

wa nowego Centrum Onkologii (w latach 1973-1995) w Warszawie pozwoliła na zaprojektowanie, a następnie realizację Ośrodka na poziomie światowym. Założenia budowlane i wyposażenie oparto na materiałach ICLAS, GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) i FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations), jak też na własnych doświadczeniach nabytych w czasie wizytowania wielu ośrodków europejskich i japońskich.

Zwierzęta Ośrodka reprezentują standard zdrowotny SPF i są regularnie w naszym własnym laboratorium kontrolowane pod względem zakażeń pasożytniczych, bakteryjnych i wirusowych zgodnie z zaleceniami międzynarodowymi. Wykaz mikroorganizmów

objętych kontrolą przygotowano na podstawie wymagań międzynarodowych oraz proponowanych w karcie informacyjnej do założeń technologicznych produkcji zwierzęcej: Zwierzęta Laboratoryjne – dla zwierząt kategorii SPF (6, 8).

Badanie parazytologiczne na obecność roztoczy wykonuje się analizując pod lupą lub pod mikroskopem osad z alkoholowych wypluczyn z sierści i skóry myszy. Po zabiciu zwierzęta poddawane są kąpeli w 70% wodnym roztworze alkoholu etylowego przez ok. 5 min., następnie alkohol zlewany do dużych probówek, od każdej myszy osobno, jest dekantowany i z osadu wykonuje się preparat (7, 10).

W czasie badania sekcyjnego kontrolowana jest wewnętrzna powierzchnia skóry na obecność cyst *Psorergates simplex* oraz wątroba w celu wykluczenia obecności larw tasiecmca (*Cysticercus fasciolaris*). Badania na obecność nicieni (*Aspiculuris tetraptera* i *Syphacia obvelata*) w treści jelita grubego, ślepego i okrężnicy wykonywane są pod lupą bezpośrednio po seksji. Obecność pierwotniaków w treści okrężnicy i jelita ślepego zawieszanej w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) kontrolowana jest pod mikroskopem (7).

Badania bakteriologiczne obejmują posiewy z nosogardzieli, z oka, z treści jelita ślepego i okrężnicy oraz u samic z pochwy przy zastosowaniu standardowych podłoży diagnostycznych (1, 2, 9). Identyfikacja prowadzona jest przy zastosowaniu zestawu testów API firmy BioMerieux do diagnostyki pałeczek z rodziny

Enterobacteriaceae, pałeczek Gram-ujemnych niefermentujących i ziarenkowców Gram-dodatnich, zestaw PPL18 firmy HTL stosowany jest do identyfikacji ziarenkowców Gram-dodatnich (*Streptococcus sp.*). Rutynowo stosuje się barwienie metodą Grama. Badania w kierunku obecności mikroorganizmu *Mycoplasma sp.* oraz wirusów *Sandai*, *MHV*, *Ectromelia*, *PVM*, *Reo-3*, *TMEV*, *MVM*, *LCM*, *SDAV* i *KRV/H-1* prowadzone są metodą testu immunoenzymatycznego ELISA przy użyciu zestawów typu MAT oferowanych przez firmę Perimmune oraz ImmunoComb Test Kit firmy Orgenic.

Trzy razy w miesiącu badane są wybrane losowo z hodowli trzy dojrzałe myszy. Myszy przebywają w

warunkach za barierą higieniczną (barrier maintained system). System ten wyposażony jest w śluzę, autoklawy przelotowe (sterylizacja parowa w warunkach podwyższonego ciśnienia) dla sprzętu, paszy, wody oraz specjalne śluzę dla personelu obsługującego zwierzęta. Zwierzęta karmione są granulowaną paszą przemysłową LABOFEED H produkowaną w Wytwórni Pasz i Koncentratów w Kcyni. Do picia dostają wodę w butelkach szklanych z poidłem ze stali nierdzewnej. Ściółkę stanowią odpylone wióry z drzew iglastych. Klimatyzacja zapewnia w pomieszczeniach hodowlanych temperaturę $22 \pm 2^\circ\text{C}$ oraz 15-krotną wymianę powietrza w ciągu godziny. Oświetlenie pomieszczeń spełnia wymagania cyklu dobowego 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Wykaz mikroorganizmów wyeliminowanych z hodowli zawiera tab. 1.

Obecnie Zakład dysponuje 26 szczepami myszy oraz 3 szczepami szczurów laboratoryjnych. Zadaniem Ośrodka jest zaopatrywanie zakładów krajowych w zwierzęta o kategorii SPF do badań biomedycznych oraz porady i konsultacje w dziedzinie hodowli, kontroli genetycznej i kontroli zdrowia, właściwego wyboru zwierząt do doświadczeń, a także konsultacje dotyczące budowy i wyposażenia nowych ośrodków hodowlanych lub tzw. zwierzętarni doświadczalnych.

Działania Ośrodka z pewnością przyczyniają się do znacznego ograniczenia liczby zwierząt koniecznych do uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych wyników

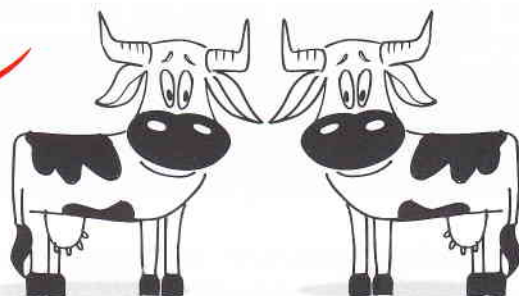
badania, co poza względami ekonomicznymi ma niewątpliwie bardzo ważny aspekt etyczny zgodny z założeniami Ustawy o Ochronie Zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Allen A. M., Nomura T.: Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals. U. S. Dept Health Human Serv., Natl. Inst. Health, Div. Res. Serv., NIH Publication, Bethesda, U.S.A., 1986.
2. Czarnomska A., Świńska A.: Kontrola bakteriologiczna w konwencjonalnej hodowli myszy laboratoryjnych, *Zwierzęta Lab.* 1982, 19 (1-2), 29-41.
3. Guidelines for breeding and care of laboratory animals. World Health Organization (WHO) International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). Wyd.: T. Fujikura, G. J. R. Hovell, O. Hänninen, K. Pelkonen, Roma, Italia, 1994.
4. Heine W. O. P.: Environmental Management in Laboratory Animal Units – Basic Technology and Hygiene – Methods and Practice. Pabst Science Publishers, Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga, Scottsdale (U.S.A.), Wien, Zagreb, 1998.
5. Infectious Diseases of Mice and Rats. Comm. Infect. Dis. Mice and Rats, Inst. Laboratory Animal resources, Natl. Res. Council, Washington, 1991.
6. Karta informacyjna do założeń technologicznych produkcji zwierzęcej: Zwierzęta Laboratoryjne. Instytut Zootechniki, Zakład Inf. Zootech., Kraków, 1983.
7. Lis A.: Najczęściej występujące zakażenia pasożytnicze u myszy laboratoryjnych, *Zwierzęta Lab.* 1986, 23 (1-2), 39-44.
8. List of Pathogens for Specification in SPF Laboratory Animals, Red. Biberach, GV SOLAS, Bazylea, 1988.
9. Mikrobiologische Diagnostik bei Laboratoriumstieren. Red. Biberach, GV SOLAS, Bazylea, 1989.
10. Szymańska H., Piasecka A., Krysiak E., Lis A., Czarnomska A.: Zakażenia pasożytnicze i bakteryjne u myszy laboratoryjnych utrzymywanych w warunkach hodowli konwencjonalnej otwartej i zamkniętej, *Zwierzęta Lab.* 1986, 23 (1-2), 65-71.

Adres autora: lek. wet. Marek Woszczyński, ul. W. K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa; e-mail: zgen@coi.waw.pl

Apteka Dobrej Ceny



cloxamed ts

natychmiastowe i długie działanie
osłona antybiotykowa w okresie zasuszenia

- natychmiastowe działanie dzięki zawartości soli sodowej kloksacyliny
- dobre stężenie substancji aktywnych
- praktyczny dozownik zapobiegający zbyt głębokiemu wprowadzeniu konusa (dokładna i jałowa aplikacja leku)

prostMedica

74-106 Stare Czarnowo 77; tel. (091) 31 24 290, 31 24 236; tel./fax (091) 31 24 117