

# Wpływ statusu zdrowotnego zwierząt laboratoryjnych: myszy i szczurów na wiarygodność wyników badań

GRAŻYNA PESZYŃSKA-SULARZ, ANNA ŻYŁKO, BEATA MUSZYŃSKA-FURAS,  
JOLANTA PARADZIEJ-ŁUKOWICZ

Trójmiejska Akademicka Zwierzętnia Doświadczalna – Centrum Badawczo-Usługowe, Gdański Uniwersytet Medyczny,  
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Peszyńska-Sularz G., Żyłko A., Muszyńska-Furas B., Paradziej-Łukowicz J.

## Influence of the health status of laboratory animals: mice and rats on the credibility of research results

### Summary

The study describes the influence of the health condition of laboratory animals used in experiments on the credibility and repeatability of research results obtained. It also presents a classification of animals into health categories depending on their microbiological purity: germ-free animals, specific pathogen-free animals and conventional animals. Detailed conditions which have to be fulfilled by animal quarters with a sanitary-hygienic barrier in order to keep specific pathogen-free animals (SPF) are also discussed. Moreover, the study describes general rules compliant with European standards for monitoring the health of laboratory animals, including a detailed register of detected pathogens specific for mice and rats. Numerous pathways of disease spread and their influence on the course of the experiment are pointed out. What is more, examples of the influence of contamination on animal biology and the results of experiments are presented. The table attached contains specific pathogens of mice and rats, which often significantly influence the course of experiments and should be regularly monitored. Pathogens which may cause zoonoses in people are also marked.

**Keywords:** laboratory animals, SPF, health status monitoring

Dynamiczny rozwój współczesnej wiedzy biomedycznej w dużym stopniu możliwy jest dzięki zastosowaniu w eksperymentach naukowych modeli zwierzęcych, głównie myszy i szczurów. Korzystanie z nich jest niezwykle istotne dla zrozumienia biochemicznych i molekularnych mechanizmów powstawania chorób, opracowywania nowych leków oraz optymalnego postępowania terapeutycznego. Osiągnięcie takich celów jest kryterialne dla jakości modelu zwierzęcego, który stanowi podstawowe narzędzie pracy badacza. Dla zagwarantowania wiarygodnych wyników doświadczeń konieczne jest zapewnienie zwierzętom wysokiego poziomu dobrostanu, którego odzwierciedleniem jest ich stan zdrowia. W zależności od zastosowanych w zwierzętniach rozwiązań architektonicznych, sprzętowo-aparaturowych, odpowiednich procedur roboczych, pochodzenia zwierząt oraz kwalifikacji personelu, w jednostkach utrzymywane mogą być zwierzęta różniące się statusem zdrowotnym. Status ten ma bezpośredni wpływ na jakość i wiarygodność badań wykorzystujących w swoich procedurach zwierzęta. Zależy on od różnorodnych czynników biologicznych, między innymi bakterii, wirusów, grzybów, pasożytów, będących często naturalnymi patogenami myszy i szczurów, których obecność nie zawsze manifestuje się objawami klinicznymi. Często jednak podczas trwania eksperymentu,

mimo że nie dochodzi do ujawnienia się czynnej postaci choroby, samo zakażenie może zaburzać parametry biologiczne zwierzęcia. Ponadto oczywiste jest, że rozwijająca się w trakcie procedury doświadczalnej choroba zakaźna również uniemożliwia właściwą interpretację wyników. Pomimo tego, że niezwykle istotne wydaje się zapewnienie wysokiej jakości mikrobiologicznej zwierząt doświadczalnych, w polskim środowisku naukowym nadal obserwuje się brak świadomości dotyczącej korelacji stanu zdrowotnego zwierząt laboratoryjnych z prawidłowym przebiegiem doświadczeń i wiarygodnością otrzymywanych wyników. Niewiedza ta ma również nierozdzielny związek z łamaniem zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia – tzw. zasady 3R (Replacement, Reduction and Refinement), których jedno z założeń dotyczy zminimalizowania liczby zwierząt używanych w doświadczeniach. To właśnie dzięki ujednocnieniu ich stanu zdrowotnego, poprzez regularny monitoring stanu zdrowia, można zmniejszyć liczebność grup doświadczalnych (9).

### Kategorie zdrowotne zwierząt

Zwierzęta laboratoryjne w zależności od ich statusu mikrobiologicznego i możliwości wykorzystania do badań dzieli się na następujące kategorie zdrowotne:

- Zwierzęta bezbakteryjne – GF (germ free).

Pozbawione są wszelkich wykrywalnych form żywych organizmów. Hodowane są w specjalnych izolatorach, które zapewniają jałowe warunki i całkowitą izolację od środowiska zewnętrznego. Są dobrym modelem do badań nad etiologią i leczeniem chorób zakaźnych oraz produkcji szczepionek. Zwierzęta te, charakteryzując się bardzo niskim poziomem przeciwciał, znajdują szerokie zastosowanie w badaniach immunologicznych (4, 8).

- Zwierzęta wolne od specyficznych patogenów – SPF (specific pathogen free). Nie posiadają określonych, swoistych, drobnoustrojów chorobotwórczych, patogennych dla danego gatunku zwierząt. Utrzymywane są w specjalnych warunkach, wymagających wysokiego reżimu sanitarnego, za barierą sanitarno-higieniczną. Zwierzęta te są idealnym modelem do większości badań biomedycznych (4, 8).

- Zwierzęta konwencjonalne – CV (convencional).

Mimo że charakteryzują się najniższą czystością mikrobiologiczną, muszą być wolne od zoonoz, czyli chorób przenoszonych na człowieka. Utrzymywane są najczęściej bez szczególnych zabezpieczeń sanitarnych. Powinny znajdować zastosowanie jedynie w celach dydaktycznych (4, 8).

### Warunki utrzymania zwierząt SPF

Prowadzenie hodowli oraz utrzymywanie zwierząt doświadczalnych o wysokim standardzie SPF możliwe jest jedynie w zwierzętarniach, posiadających specjalną strefę chroniącą zwierzęta przed zakażeniem, tzw. barierę sanitarno-higieniczną, której celem jest ograniczenie do minimum potencjalnych kontaminacji. Jednostki utrzymujące zwierzęta SPF powinny spełniać dodatkowo następujące założenia:

- mieć wiedzę na temat pochodzenia wprowadzanych za barierę zwierząt,
- kontrolować warunki utrzymania zwierząt,
- wdrożyć system monitoringu zdrowotnego zwierząt w celu kontrolowania wysokiej jakości mikrobiologicznej zwierząt.

Wszystkie nowo wprowadzane za barierę zwierzęta powinny posiadać dokumentację od dostawcy, zawierającą certyfikat zdrowia zwierząt, na który składają się: wykaz badanych mikroorganizmów z podziałem na: bakterie, wirusy, mykoplazmy, grzyby i pasożyty; rodzaj materiału biologicznego, w którym oznaczono dany patogen; metodykę, jak również wyniki badań przeprowadzonych w okresie ostatnich 12 miesięcy. Ponadto zwierzęta powinny odbyć obowiązkową kwarantannę. Na terenie zwierzętarni obarierowanej stosuje się rozwiązania, które minimalizują ryzyko kontaminacji. Stanowią je autoklawy przelotowe, pozwalające na sterylizację wchodzącego za barierę sprzętu i materiałów; system służ dla personelu; służby materiałowe oraz system wentylacji i klimatyzacji z absolutnymi filtrami HEPA, pozwalający na utrzymanie nadciśnienia, optymalnej wilgotności i temperatury w pokojach zwierzęcych. Dodatkowo w zwierzętarni rutynowej kontroli powinny podlegać: stan jakości wody, paszy, powietrza, sprzętów oraz materiałów ze strefy chronionej, a także zdrowie personelu.

Pomimo tak restrykcyjnych wymogów, wielu zabezpieczeń i nieustannej kontroli, zawsze istnieje ryzyko

wniknięcia potencjalnych patogenów. Dlatego niezwykle istotne jest przestrzeganie przez pracowników i użytkowników zwierzętarni określonych procedur korzystania z bariery sanitarno-higienicznej, w tym zasad związanych z drogami przekazywania sprzętu czystego i brudnego, a dla zapewnienia wysokiego standardu zwierząt SPF, prowadzenie rutynowej kontroli stanu zdrowia zwierząt.

### Monitoring stanu zdrowia zwierząt

Z chwilą rozpoczęcia procedury eksperymentalnej model zwierzęcy będący integralnym elementem doświadczenia staje się jednocześnie czynnikiem bezpośrednio wpływającym na przebieg eksperymentu, jego jakość, powtarzalność, a tym samym wiarygodność uzyskiwanych wyników (7). W związku z tym niezwykle istotne jest, by zwierzęta podlegały rutynowej kontroli stanu zdrowia. Ogólne standardy badań opracowane zostały przez FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) w przewodniku monitoringu stanu zdrowia zwierząt. Panel badań oceniających kompleksowo stan zdrowotności zwierząt zakłada różne kierunki monitoringu: bakteriologiczny, wirusologiczny, mykologiczny, parazytologiczny, a także ocenę anatomo- i histopatologiczną. Badaniom stanu zdrowia zwierząt podlegać powinna odpowiednio liczna, reprezentatywna grupa losowo wybranych zwierząt, uwzględniająca szczep/stado, wiek, płeć, liczbę zwierząt z pomieszczeń hodowlanych i/lub eksperymentalnych. Zwiększa to wiarygodność wyników i ewentualność wykrycia potencjalnego zakażenia.

Zastosowanie poszczególnych procedur laboratoryjnych w celu monitorowania stanu zdrowia zwierząt doświadczalnych uzależnione jest przede wszystkim od kierunku badania, czyli rodzaju poszukiwanego w badanej próbce czynnika biologicznego, a także – co nie jest bez znaczenia – względów ekonomicznych.

Nadal szerokie zastosowanie mają:

1. Klasyczne techniki mikrobiologiczne, czyli przede wszystkim:

- wykonywanie posiewów materiału klinicznego na podłoża stałe lub płynne,
- identyfikacja patogenów z zastosowaniem szeregów biochemicznych oraz analiza preparatów bakterioskopowych.

2. Metodyki serologiczne i immunologiczne – najczęściej testy immunoenzymatyczne oraz immunofluorescencyjne.

3. Ocena histopatologiczna badanego materiału (stosowana np. w diagnostyce w kierunku obecności *Klosiella muris*).

4. Standardowe techniki parazytologiczne:

- oględziny makroskopowe badanej próbki,
- badanie mikroskopowe:
- wykonywanie rozmazów bezpośrednich m.in. w roztworze soli fizjologicznej, płynu Lugola, KOH bądź parafinowym,
- wykonywanie preparatów mikroskopowych z materiału poddanego uprzednio procedurom zagęszczania próbki (dotyczy przede wszystkim diagnostyki chorób pasożytniczych układu pokarmowego), są to powszechnie stosowane metody, jak flotacja oraz techniki sedymentacyjne, głównie dekantacja.

Wymienione metody nie zawsze są technikami wystarczająco czułymi i specyficznymi, by dostarczyć zadowa-

Tab. 1. Lista specyficznych patogenów myszy i szczurów, które powinny być monitorowane w zwierzętarniach utrzymujących zwierzęta o standardzie SPF

Bakterie, mykoplazmy, grzyby	Wirusy	Pasożyty	
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Pneumonia virus of mice (PVM)	<i>Eimeria</i> spp.	Pierwotniaki
<i>Carbacillus</i>	Sendai virus (SEV)	<i>Entamoeba muris</i>	
* <i>Mycoplasma pulmonis</i> <i>Mycoplasma arthritidis</i>	Mouse polio virus (TMEV), (GDVII), (Theiler's)	<i>Giardia muris</i>	
<i>Pasteurellaceae</i>	Respiratory enteric virus 3 (REO3)	<i>Klosiella muris</i>	
* <i>Salmonella</i> spp.	*Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	<i>Spironucleus</i> spp. ( <i>Hexamita</i> )	
<i>Streptococci</i> $\beta$ -hemolytic (nie z grupy D)	Mouse adenovirus type 1 (MAV1), (FL), (MAD)	Trichomonads	
* <i>Staphylococcus aureus</i>	Mouse adenovirus type 2 (MAV2), (K87)	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	*Hantavirus (HAN), (IFA)	<i>Aspicularis tetraptera</i>	Niczenie
<i>Helicobacter</i> spp.	Mouse hepatitis virus (MHV)	<i>Syphacia</i> spp.	
* <i>Streptobacillus moniliformis</i>	Mouse rotavirus (EDIM)	<i>Trichosomoides crassicauda</i>	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Minute virus of mice (MVM)	* <i>Hymenolepis nana</i>	Tasiemce
<i>Citrobacter rodentium</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella</i> spp.	Mouse parvovirus (MPV)	* <i>Hymenolepis diminuta</i>	
* <i>Pneumocystis carini</i>	Mouse cytomegalovirus (MCMV)	<i>Liponyssus</i> spp. <i>Myobia</i> spp.	Ektopasożyty
<i>Eperythrozoon coccoides</i>	Ectromelia virus (ECTRO)	<i>Myocoptes</i> spp.	
<i>Haemobartonella muris</i>	Kilham rat virus (KRV)	<i>Notoedres</i> spp.	
* <i>Dermatophytes</i>	Rat parvovirus (RPV)	<i>Polypax</i> spp.	
	Sialodacryoadenitis/Rat coronavirus (SDAV)/(RCV) Toolan's H-1 parvovirus (TH1) *Murine norovirus (MNV)	<i>Psorergates</i> spp. <i>Radfordia</i> spp.	

Objaśnienia: \* – patogeny wywołujące zoonozy

lającej, obszernej wiedzy o aktualnym statusie zdrowotnym badanego stada. Obecnie coraz powszechniej podejmuje się próby rutynowego zastosowania technik z zakresu mikrobiologii molekularnej w celu monitorowania stanu zdrowia zwierząt laboratoryjnych. Mowa tu przede wszystkim o różnego typu technikach jakościowego i ilościowego PCR. Trwają także prace nad zastosowaniem mikromacierzy DNA do wykrywania czynników biologicznych, chorobotwórczych dla zwierząt.

Wdrożenie procedur molekularnych do standardowej kontroli statusu zdrowotnego zwierząt laboratoryjnych może znacząco rozszerzyć dotychczasową wiedzę o patogenach tej grupy zwierząt, ich faktycznym rozpowszechnieniu, nowych metodach profilaktyki oraz ewentualnego postępowania terapeutycznego.

Niezwykle istotnym aspektem monitorowania stanu zdrowotności zwierząt jest możliwość wykrycia patogenów powodujących choroby odzwierzęce – zoonozy (tab. 1). Dzięki temu można zapobiec występowaniu zakażeń personelu i innych osób mających kontakt ze zwierzętami i materiałem zwierzęcym. Stanowi to ochronę przez potencjalnym ryzykiem zachorowania na wiele zagrożających zdrowiu lub życiu człowieka chorób (1).

Rodzaje potencjalnych zagrożeń, swoistych dla myszy i szczurów czynników biologicznych, które powinny być monitorowane przy ocenie stanu ich zdrowia, przedstawia tab. 1.

## Kontaminacje a wiarygodność wyników

Infekcje zwierząt laboratoryjnych mają znaczący wpływ na wyniki eksperymentów. Należy pamiętać, że nawet w najbardziej restrykcyjnie prowadzonych zwierzętarniach istnieje wiele potencjalnych dróg kontaminacji, co wiąże się z ryzykiem zakażenia utrzymywanych zwierząt. Spośród wielu wektorów zakażenia na plan pierwszy wysuwa się personel, źle wysterylizowany sprzęt i inne zwierzęta, w tym głównie dzikie gryzonie i owady. W zależności od rodzaju czynnika biologicznego, warunków utrzymania myszy i szczurów oraz wrażliwości zwierząt choroba może przebiegać w różnych postaciach: od bezobjawowej, kiedy to zwierzę nie wykazuje żadnych widocznych objawów chorobowych, poprzez postać kliniczną z charakterystycznymi symptomami, do nadostrej, kończącej się bardzo szybkim zejściem śmiertelnym bez widocznych oznak choroby (1, 3). Kliniczne objawy, charakteryzujące się najczęściej słabą kondycją zwierzęcia, spadkiem masy ciała, zmienioną okrywą włosową, spadkiem wskaźników rozrodczości, w jednoznaczny sposób zaburzają przebieg wszystkich eksperymentów. Sytuacja taka ma jednak najczęściej miejsce w zwierzętarniach tzw. konwencjonalnych, w których brak bariery sanitarno-higienicznej. W jednostkach o wysokim standardzie mikrobiologicznym rzadko spotyka się zwierzęta z klinicznymi objawami infekcji. Nie oznacza to jednak, że nie są one

zakażone. Dowiedziono, że zakażenia nie ujawniające klinicznych objawów choroby, często przechodzące w formę kliniczną podczas procedury doświadczalnej, a także pozostające w postaci subklinicznej mogą w istotny sposób wpływać na wyniki eksperymentów. Infekcje utajone stanowią ponadto większe ryzyko dla prawidłowego przebiegu doświadczeń niż infekcje kliniczne, ze względu na brak widocznych objawów (1, 5). Badacz nie posiadający danych na temat zdrowotności użytych w eksperymencie zwierząt może nie wiedzieć, że są one zainfekowane, a to może skutkować zafałszowanymi wynikami eksperymentu. Zdarza się również, że odpowiedź immunologiczna po zakażeniu może utrzymywać się przez wiele miesięcy od wystąpienia infekcji, a znaczna ilość zaobserwowanych pod koniec doświadczenia zmian fizjologicznych i histopatologicznych może być wynikiem tej odpowiedzi, a nie procedury eksperymentalnej, co w rezultacie również prowadzi do nieprawdziwych wniosków. Przykładem może być subkliniczna infekcja *Helicobacter* spp. u myszy, powodująca przewlekłe zapalenie wątroby i zapalenie jelita grubego. Obraz tej infekcji często możliwy jest do zaobserwowania dopiero w badaniach biochemicznych parametrów wątroby lub anatomo- i histopatologicznych (5). Innymi przykładami są zmiany obserwowane w behawiorze zwierząt, aktywności motorycznej czy zdolności do uczenia się, które mają związek z infekcjami pasożytniczymi. Dowiedziono, że zakażenia takie mogą interferować z działaniem leków stosowanych do znieczulania zwierząt, ponadto hamują tempo wzrostu zwierząt, jak również wpływają na zmianę odpowiedzi immunologicznej (5). Jednym z najniebezpieczniejszych patogenów, który może zniwelować efekty pracy badacza jest *Mycoplasma pulmonis*, której patogenny wpływ ma odzwierciedlenie w fizjologii wielu różnych narządów. Infekcje tym patogenem mogą zakłócać badania związane głównie z układem oddechowym, nerwowym, rozrodczym i odpornościowym (2, 5). Wiele czynników etiologicznych ma różne powinowactwo do określonych szczepów zwierząt w obrębie tego samego gatunku. I tak na przykład Sendai Virus (SV), jeden z najważniejszych patogenów w epizootologii myszy i szczurów laboratoryjnych, mający powinowactwo głównie do układu oddechowego, powoduje częściej zakażenia bezobjawowe u szczurów ze szczepu LEW oraz Brown Nowary niż szczepu F344. Podobnie myszy szczepów DBA/2 i 129/J są bardzo podatne na zakażenia SV, podczas gdy myszy szczepów SJL/J i C57BL/6J wykazują większą odporność. Infekcja SV może powodować zaburzenia w rozrodzie zwierząt, zmiany w aktywności komórek układu immunologicznego, zmiany fizjologii układu oddechowego. Opisany został również wpływ zakażenia SV na odpowiedź na przeszczepiane nowotwory, odrzuty przeszczepów, wzrost apoptozy oraz opóźnienie gojenia się ran (2). Przedstawione powyżej przykłady kontaminacji, dowodzą, jak ważny jest monitoring zdrowia zwierząt oraz jego wpływ na jakość modeli zwierzęcych używanych w doświadczeniach biomedycznych.

### Podsumowanie

Eksperymenty na zwierzętach znane są od tysiącleci i stanowią fundament postępu w naukach biomedycznych

(7). W Polsce każdego roku przeprowadza się tysiące takich doświadczeń. W 2007 r. wykorzystano 250 tysięcy zwierząt, w tym około 150 tysięcy myszy i szczurów. Od momentu, kiedy zaczęto wykorzystywać zwierzęta w doświadczeniach, sposób postrzegania ich statusu zdrowotnego i jego wpływu na wiarygodność wyników badań diametralnie się zmienił. Na przełomie XIX i XX wieku badacz mógł powiedzieć: „nie mogę przeprowadzić dziś mojego doświadczenia, ponieważ wszystkie moje szczury padły”. W połowie wieku XX zapewne powiedziałyby: „nie mogę przeprowadzić dziś doświadczenia, bo wszystkie moje szczury są chore”. Za to dziś mówi: „nie mogę przeprowadzić mojego doświadczenia, ponieważ wszystkie moje zwierzęta są seropozytywne” (2). Świadomość tego, że zła jakość zwierząt to zły eksperyment, stała się przyczyną zrewolucjonizowania technik hodowli zwierząt laboratoryjnych (7). W ostatnich latach w naszym kraju powstało kilka nowych zwierzętarni, które zarówno architektonicznie, jak i funkcjonalnie dostosowane są do utrzymywania zwierząt o standardzie SPF. Spełniają one wysokie wymogi prawa europejskiego i polskiego, dotyczące warunków hodowli zwierząt, co prowadzi do zwiększenia stopnia dobrostanu zwierząt laboratoryjnych. Jak wiadomo, pojęcie dobrostanu zwierząt rozpatrywane jest na płaszczyznach komfortu fizycznego, psychicznego i biologicznego. Nowa dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady Europy w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych ma ujednoczyć postępowanie w dziedzinie doświadczeń na zwierzętach w Unii Europejskiej. Stanowi ona solidną podstawę dla pełnego wdrożenia zasad 3R. Chcąc zastosować tę zasadę, powinno się zapewnić zwierzętom odpowiednio wysoki poziom dobrostanu, na uzyskanie którego wpływa między innymi systematyczny monitoring zdrowia. W celu zagwarantowania właściwego przebiegu monitorowania dobrostanu zwierząt konieczna jest stała opieka weterynaryjna. Dobrostan zwierząt wykorzystywanych w procedurach doświadczalnych jest szczególnie ważny i w dużym stopniu zależy od jakości i kompetencji zawodowych personelu nadzorującego te procedury, dlatego równie istotne i niezwykle potrzebne są szkolenia poszerzające wiedzę na temat zwierząt laboratoryjnych i szeroko pojętych zagadnień z nimi związanych.

### Piśmiennictwo

1. Anusz Z.: Choroby odzwierzęce. Wyd. ART, Olsztyn 1991.
2. Baker G. D.: Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. Clin. Microbiol. Rev. 1998, 233-235.
3. Blackmore D. K.: Accidental contamination of a specified-pathogen-free unit. Laboratory Animals 1972, 257-271.
4. Brylińska J., Kwiatkowska J.: Zwierzęta laboratoryjne, metody hodowli i doświadczeń. Universitas, Kraków 1996.
5. Hau J., van Hoosier G. L.: Handbook of Laboratory Animals Science. Essential Principles and Practices. CRC Press, New York, USA 2003, s. 313.
6. Kaliste E.: The welfare of Laboratory Animals. Infections in laboratory animals: importance and control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 2007, 23-35.
7. Katkiewicz M.: Zwierzęta laboratoryjne – choroby i użytkowanie. Wyd. SGGW-AR, Warszawa 1989, s. 5.
8. Krzanowska H., Preibisch J., Korda P.: Zwierzęta laboratoryjne – choroby i użytkowanie. PZWL, Warszawa 1974.
9. Russell W. M. S., Burch R. L.: The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London 1959.

Adres autora: lek. wet. Grażyna Peszyńska-Sularz, ul. Karłowicza 64/1, 80-275 Gdańsk; e-mail: gsularz@gumed.edu.pl