

בקרת מחלות ביחידת מכרסמים (רבייה וניסוי) – המלצות של FELASA

סטנדרטיזציה של מערכת בקרת ומניעת המחלות = סטנדרטיזציה של האיכות המיקרוביאלית של החיות. ממונה - אדם בעל הבנה התחום גידול חיות ומניעת מחלות צריך להתמנות להיות האחראי על מניעת ובקרת מחלות במתקן. הוא צריך לשתף את כל העובדים אשר צריכים להיות מיומנים בתצפית על החיות ואבחנה של כל חריגה בהתנהגות שלהם או בסימנים הקליניים.

בקרת המחלות – חלק אינטגרלי של מערכת בקרת האיכות של המתקן – GLP AALAC ISO

מדוע חשוב למוסד להקים מערכת בקרת מחלות ?

ירוסים, בקטריות, מיקופלסמה פטריות וטפילים יכולים לגרום למחלות במכרסמים. לרוב הם אינם גורמים למחלה קלינית.

1. המחלות משפיעות על הפיזיולוגיה של החיות על ההתנהגות שלהם ועל הגידול שלהם –

LYMPHOCITIC CORIOMENINGITIS , MHV, REOVIRUS : על הגדילה
מחלות ללא סימנים משפיעות גם על המצב החיסוני – CYTOMEGALOVIRUS MOUSE TYMIC
ADENOVIRUS .

2. כל המחלות (עם או בלי סימנים) מגדילות את הוריאביליות וגורמות גידול במספר החיות במחקר.

3. המחלות יכולות לזהם חומרים ביאולוגיים כמו גידולים מושתלים, תרביות רקמה ועוד ומשם לזהם את בעלי החיים.

4. חלק מהמחלות יכולות לגרום לזואונוזה ולכן חשוב לשלוט בהן.

גם גורמים אחרים כמו גורמים סביבתיים וגנטיים יכולים להשפיע על ההתאמה של החיות למחקר.

כל מכון צריך להתאים את המערכת לבקרת מחלות שלו לפי :

הבעיות המקומיות באזור של המכון

צרכי המחקר שלו

דרישות של המדינה או מערכת הבריאות

דרישות ספציפיות של יצור סרום או חיסונים

יחידה UNIT = יחידה עצמאית מבחינה מיקרוביאלית

יחידה יכולה להיות :

- כל המכון
- חדרים שונים בניינים שונים אשר אותם אנשים נכנסים לכולם – ללא אמצעי הגנה מיוחדים.
- יחידת ברייר קלאסית – גם עם יש בה מינים שונים.
- חדר חיות מוגן עם החלפת בגדים בכניסה.
- איזולטור או איזולטורים בהם מועברים בע"ח באופן חופשי ללא הגנה.
- כלוב IVC (למעשה כל כלוב הוא יחידה מיקרוביאלית עצמאית).

יחידת רבייה = יחידת רבייה עצמאית מבחינה מיקרוביאלית

- מעט אנשים נכנסים ליחידה .
- לעיתים נדירות מכניסים בעלי חיים
- לא מכניסים רקמות או תאים.

יחידת מחקר = יחידה עצמאית מבחינה מיקרוביאלית בה עוסקים במחקר

- מוכנסים בעלי חיים רבים מבחוץ
- נכנסים יחסית מספר רב של אנשים
- מוכנס ציוד רב

- מוכנסים תאים ורקמות

מערכות של בטיחות בקטריאלית אשר מפרידות בין החדרים על מנת למנוע העברת מחלות יכולה לחלק את המכון למספר יחידות = המכון יכול להיות רב יחידתי או חד יחידתי מבחינה מיקרוביאלית . חלל ותנועה של אנשים וחומרים מקשרים או מפרידים בין יחידות שונות.

העלות של בקרת ומניעת המחלות אינה נמוכה אבל היא יותר נמוכה מהנזק שעלול להגרם על ידי המחלה ועצירת המחקר.

החדרה של פתוגנים

הסיכון בהחדרה של פתוגנים ביחידת רבייה מאשר ביחידת מחקר בגלל תנועה קטנה יותר. במכון צריכים להיות נוהלים כתובים להכנסה של חיות, חומרים ביאולוגיים, ציוד ואנשים.

חדירה של פתוגנים מתבצעת על ידי :

- בעלי חיים
- חומרים ביאולוגיים
- ציוד
- אנשים.

בעלי חיים

רצוי להכניס בעלי חיים ממקומות שלהם יש נוהלי בקרה דומים לשלך. בעכברים טרנסגניים זה לפעמים לא אפשרי. אמצעים אחרים לבקרה של מחלות בבעלי חיים שמוכנסים למכון : הסגר, רדרישון.

חומרים ביאולוגיים

תאים, רקמות, סרום, זרע וגידולים. לשאוף שיגיעו עם אישורי ניקיון מתאימים , אם לא צריך להתייחס אליהם כמו לנגועים ולכן החיות המוזרקות צריכות להיות מוחזקות בבידוד משאר החיות ביחידה.

בני אדם

הצוות יכול להעביר מחלות מיחידה ליחידה או בתוך היחידה. הוא יכול להעביר את המחלות בשיער, ידיים או לבוש. צריך נוהל כתוב לגבי אמצעי הזהירות, הלבוש והכניסה ליחידה.

מחלה שנכנסה ליחידה יכולה להדביק עוד לפני שיש סימנים קליניים כלשהם או שיש נוגדנים. מחלה שנכנסה יכולה להיות מבוטרת באם מוציאים את כל החיות מהיחידה והיא עוברת חיטוי וניקיון לפני שנכנסים בעלי חיים חדשים. ALL IN –ALL OUT. זאת שיטה טובה למחקרים קצרי טווח = 6 שבועות.

מתי יש סיכון גבוה לחדירה של פתוגנים ? :

- יש יחידות רבות עם מחקרים שונים
- הכנסת חיות חדשות לפחות אחת לחודש
- כניסה של חוקרים
- שינוי בחוקרים ביחידה
- הכנסת חיות ממקורות אספקה שונים
- הכנסה של חומרים ביולוגיים
- חיות נגועות במכון

מתי יש סיכון בינוני לחדירה של פתוגנים ? :

- הכנסה של חיות רק לפעמים
- מחקר אחד או שניים ביחידה
- מחקרים ארוכי טווח
- ALL IN ALL OUT
- כניסה רק של כימיקלים ולא של חומרים ביולוגיים

תדירות הבדיקה וגודל המדגם

תדירות בדיקה = כל 3 חודשים. באם יש צורך אפשר לעשות כל פחות זמן. כל חיה שמתה = לעשות PM. – זה לא נכלל במדגם אלא בנוסף. באם יש ביחידה כמה מינים של בעלי חיים – כל אחד צריך מערכת בקרה משלו. כמה שהמחלה מדבקת יותר כך גודל המדגם יכול להיות יותר קטן ולהיפך. בכדי להגדיל את האמינות של האיתור צריך להגדיל את המדגם. **יש נוסחה של ILAR.** היא טובה לאוכלוסיות של יותר מ 100 חיות באם המחלה מתפשטת בצורה הומוגנית. גודל המדגם הוא בן 10 בעלי חיים ליחידה. אמינות האיתור תלויה במידת ההדבקה של המחלה ובשיטת הבדיקה בה משתמשים. בדיקה סרולוגית יותר אמינה מבדיקה של זיהוי ישיר בהיסטופתולוגיה. **תדירות הבדיקות ביחידת רבייה או בניסוי בו אין הכנסה של חומרים ותנועה רבה של אנשים = כל 3 חודשים** **תדירות הבדיקה ביחידת ניסוי עם הכנסה של חומרים רבים ותנועה של אנשים = פחות מ 3 חודשים.** אם בודקים כל חודש אז מספיק 3-5 חיות. במקרים של כלובי IVC או חיות מאד יקרות – אפשר להשתמש במדגם קטן יותר 3-5 חיות. בארנבות למשל אפשר לא להמית את החיות אבל אז צריך לקחת יותר דגימות.

גודל המדגם

מחלות מאד מדבקות – SENDAI, MHV – צריך פחות חיות בכדי לאתר את המחלה. אם המחלה מדבקת ב 50% - על מנת לקבל 95% אמינות איתור צריך 5 חיות אם המחלה מדבקת ב 30% - על מנת לקבל 95% אמינות איתור צריך 10 חיות אם המחלה מדבקת ב 10% - על מנת לקבל 95% אמינות איתור צריך 30 חיות 10 חיות ליחידה. בניסויים קטנים או בחיות טרנסגניות יקרות – אי אפשר לקחת הרבה חיות. המספר יורד יחד עם הכנסת נוטרים לבדיקה.

נוטרים – SENTINEL

משתמשים בנוטרים בשביל לא להשתמש בחיות של המחקר:

- באם המספר של החיות קטן
- באם הן יקרות מאד טרנסגניות או בעלי מערכת אימונולוגית מוחלשת.
- באם הנוטרים רגישים יותר למחלה – למשל אם המחקר הוא בחיות מוחלשות אימונולוגית – בדיקות סרולוגיות לא עובדות עליהן – אז שימוש בנוטרים שאפשר לבדוק אותם סרולוגית הוא יעיל לאיתור המחלות.

נוטרים מיוחדים :

ערום – PINWORM
C57 - אקטופרזיטים
ECTROMELIA - BALBC , DBA
SENDAI - DBA 129
צעירים ל HELICOBACTER HEPATICA

צורת הניטור:

יש להחזיק את הנוטרים 6 שבועות לפחות בחדר, יש לפזר הנוטרים בצורה אחידה בחדר **אפשר להכניס את הנוטרים לכלוב או להכניס אליהם את המצע האוכל והשתיה של חיות הניסוי.** אפשר להכניס אותם מידי פעם ולהוציא בלהקות רבייה משתמשים בחיות מתוך הלהקה. הנוטרים צריכים להיות נקיים מהוירוסים שאותם בודקים – אם בודקים חיות בעלי מערכת אימונו חלשה – נוטרים צריכים להיות נקיים מ PNEUMOCISTIC CARINII .

למחלות – SENDAI , CAR - צריך להכניס את הנוטרים לכלוב ישירות כי זה לא עובר דרך מצע. במחקר ארוך טווח – אפשר להכניס בהתחלה כמות של נוטרים שתספיק לכל המחקר או כל תקופה מסוימת להכניס קבוצה קטנה לדגימה.
במחקרים קצרי טווח כאשר כל פעם מוסיפים חיות למחקר – אפשר כל פעם שמכניסים חיות להוסיף גם נוטרים לקבוצה החדשה שנכנסה.
חיות בעלות מערכת חיסונית חלשה נדבקים יותר בקלות במחלות ובכך הם נוטרים טובים אבל אי אפשר לבדוק סרולוגית וזה חיסרון.

בדיקות לאיתור המחלות

שיטות ישירות – מאתרים את הנגיף או חלקים שלו.
שיטות לא ישירות – סרולוגיה למשל שם מאתרים נוכחות של נוגדנים לנגיף.
הדגימות צריכות להילקח מחיות ניסוי או נוטרים שנבחרו באקראי ולא מפול של בעלי חיים.
ירוסים - סרולוגיה היא הבדיקה האמינה ביותר. משמשת גם ל RAP MAP
ELISA - IFA , HI - השתיים הראשונות יותר רגישות. הרוב ELISA ב IFA משתמשים ב TYMIC VIRUS
HI – משמשת לאבחנה של פרוו וירוס.
PCR – בדיקה של מרכיבים של DNA של הנגיף.
LDV - המזהם הגדול ביותר של חומרים ביאולוגיים – בודקים רמה של LDH בדם או PCR
בקטריות - הבדיקה הנפוצה ביותר היא תרבית.
יש תרביות מיוחדות – כמו דם או מועשרות ב CO2
PCR – יעיל ב HELICOBACTER , TYZZER
ELISA - יעיל ב CAR, MYCOPLASMA
פרזיטולוגיה
בדיקה של הפרווה לגילוי טפילי עור חיצוניים.
בדיקת צואה לטפילי מעיים – פלוטציה
סרולוגיה – יעיל ב ENCEPHALITOOZON CUNICULI

סרולוגיה חיובית רק מעידה כי החיה באה במגע עם המחלה ופתחה נוגדנים אבל לא שהיא חולה
סרולוגיה חיובית צריכה להיות מאושרת גם בתרבית או ב PCR או בהיסטופתולוגיה.
אם יש תשובה חיובית לפני שנוקטים בצעדים דרמטיים יש לאשר במעבדה אחרת או בבדיקה חוזרת.

פתולוגיה

צריך לעשות בדיקה פתולוגית מושלמת בכל האברים ולערוך בדיקות משלימות לצורך זיהוי.
חיות אשר מראות סימנים קליניים צריך להמית ולשלוח לפתולוגיה מיקרוביאלוגיה, פרזיטולוגיה וסרולוגיה.

איזה גורמים מחפשים

בלהקות רבייה גורמי המחלה צריכים להיבדק לפי רשימה קבועה אחת ל 3 חודשים.
גורמים אחרים פחות חשובים או נפוצים יכולים להיבדק אחת לשנה. אותה מדיניות גם בלהקות ניסוי שבהן אין מדיניות הכל בפנים הכל בחוץ.
בדיקות נוספות אפשר לערוך במקרים הבאים :
כאשר יש סימנים קליניים של מחלה
כאשר יש פצעים
כאשר יש ירידה ברבייה או שינוי פיזיולוגי בולט
כאשר משתמשים בחיות בעלות מערכת אימונולוגית פגועה.
חומרים ביאולוגיים צריכים להיבדק ל LDV - זה נעשה לרוב ב HAP RAP MAP .

דיווח על תוצאות הבדיקה

תוצאות הבדיקה צריכות להיות מדווחות לחוקרים שעובדים עם החיות
התוצאות הן חלק מחומר המחקר והשפעתן צריכה להיות מוערכת על תוצאות המחקר ולהיות כלולה בתוך פרסום המחקר.
הדיווח צריך לכלול:
סוג היחידה – רגיל, ברייר, IVC , איזולטור
סוגי החיות
תוצאות חיוביות של מינים אחרים שמוחזקים ביחידה

רשימת הוירוסים, בקטריות, מיקופלסמות, פטריות וטפילים אותם מבקשים לבדוק תאריכי הבדיקות האחרונות ב 18 החודש שעבר תוצאות כל הבדיקות הפתולוגיות והשינויים הפתולוגיים שנמצאו תוצאה חיובית = מציאה של פתוגן אפילו בחיה אחת, כנ"ל לגבי תשובה חיובית סרולוגית אבל את אלו צריך לאמת בדרך אחרת. יחידה שנמצאה חיובית ממשכה להיות כזאת עד לריסטוקינג מלא או רדרייושן. לאחר מיכן נדרשות סדרת בדיקות שליליות בכדי לאשר את ביעור המחלה מהיחידה. לפי FELASA יחידה שלילית היא יחידה שנמצאה שלילית במשך 18 חודשים רצופים. (כלומר 6 בדיקות רבעוניות).

דגימות לבדיקה לבקרת מחלות

מתקן	יש מספיק חיות לדגימה	דגימה אקרעית
בריר - רבייה	יש	אפשרי
בריר - ניסוי	לרוב יש	לרוב לא אפשרי
איזולטור - GERMFREE	לרוב אין - החיות נקיות מוירוסים אז לרוב מחפשים בקטריות. כאן יש גם בעיית מקום אז לוקחים דגימה קטנה.	לרוב לא אפשרי
IVC או פילטר - כאן כל כלוב הוא למעשה יחידה מיקרוביאלית בפני עצמה	אין - צריך להשתמש בנוטרים ולהכניס להם דגימות מצע מכל הכלובים.	לא אפשרי

מה בודקים ?

BORDETELLA	לרוב ללא סימנים בארנבת וחולדות
CAR BACILLUS	מחלה נשימתית כרונית בעכבר. לרוב יחד עם MYCOPLASMA לא מועבר מכלוב לכלוב - נוטרים צריכים מגע ישיר כי לא עובר במצע
CLAMIDIA	יכול לעיתים לגרום בעיה נשימתית בעכבר
CITROBACTER RODENTIUM	גורם להיפרפלסיה של המעי בעכבר
TYZZER - CLOSTRIDIUM PILIFORME	לא גדל בתרבית. היסתופתולוגיה לא יעילה. סרולוגיה - אינה מעידה על מחלה בפועל. PCR - יעילות לא ברורה. דיכוי מערכת חיסונית באחוז גבוהה של החיות - משמש לדיאגנוזה של הבקטריה.
CORYNEBACTERIUM BOVIS	מחלה קלינית בעכבר ערום - היפרקרטוזיס של העור. לפעמים תמותה גבוהה בעכבר ערום. רצוי לבדוק לבקטריה חיות רגישות אימונולוגית.
CYTROBACTER KUTCHERI	מחלה נשימתית בעכבר וחולדה - עם או בלי סימנים קליניים
HELICOBACTER HEPATICA	לא ברור
LEPTOSPIRA	תיבדק רק אם יש מגע עם עכברי בר
MYCOPLASMA PULMONIS	מחלה נשימתית קשה. סרולוגיה, PCR, תרבית-איטית.
PNEUMOCYSTIS CARINII	פתוגן פיטרייתי חשוב בחיות עם מערכת אימונולוגית פגועה.
SALMONELLA	תוקף את החיות ואת העובדים
STAPHYLOCOCCUS AERUS	עובר בין בעלי החיים ובני האדם - פוגע בעור - אבצסים
STRPTOBACILUS MONILIFORMIS	בעכברים וחולדות. העכבר הוא נשא טבעי של הבקטריה.
STREPTOCOCCUS PNEUMONIA	מחלה נשימתית בחיות עם מערכת חיסונית חלשה אבל גם באחרות.

נפוץ . המחלה מבערת את עצמה , יכולה להשאר בחיות אימונו- דה.	MHV - CORONAVIRUS
מגיע מסרום או תאים וממגע עם עכברי בר	ECTROMELIA
עכברי בר הם הנשאים של המחלה הזואונוטית הזאת. בחולדות הוא א-סימפטומתי	HANTAVIRUS
פוגע רק בעכברים ומתפשט באוכלוסיה שלהם. עובר בעיקר בהזרקות, העברת תאים בין חיות, דרך טפילים ועוד. לרוב לא נמצא בלהקות רבייה אבל מזהם של חומרים ביאולוגיים.	LDV
זואונוזה המועברת על ידי עכברים. בעכבר קשה לזיהוי בסרולוגיה כי העכבר לא תמיד מפתח נוגדנים.	LYMPHOCITIC CORIOMENINGITIS
עכבר וחולדה = נשאים. לא עובר במצע ויש להשתמש בנוטרים ישירים	SENDAI