

# MIKROBIOLOGICKÝ MONITORING PROSTŘEDÍ LABORATORNÍCH MYŠÍ V BARIÉROVÉM EXPERIMENTÁLNÍM ZAŘÍZENÍ

## MICROBIOLOGICAL MONITORING OF LABORATORY MICE ENVIRONMENT IN A BARRIER EXPERIMENTAL FACILITY

TOMÁŠ SVOBODA, VLADIMÍR ŠPELINA, PETR PETRÁŠ, VERONIKA HOROVÁ, RADEK ŠERÝ,  
JANA VRKOSLAVOVÁ

*Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika*

### SOUHRN

**Cíle:** Zdravotní stav laboratorních zvířat ovlivňuje jejich vhodnost pro výzkum, a proto je důležité, aby každé pracoviště s laboratorními zvířaty mělo stanovený vlastní program kontroly kvality zdraví zvířat. Zdrojem infekce však nemusí být jen laboratorní zvířata, ale také průnik infekčního agens z vnějšího prostředí. V rámci koncepce biologické bezpečnosti zvířat (animal biosecurity) je v řadě zahraničních pracovišť prováděn mikrobiologický monitoring prostředí zvířat. Cílem naší práce bylo vyhodnotit, jak výše uvedený mikrobiologický monitoring prostředí zvířat přispěje k programu kontroly kvality zdraví zvířat.

**Metody:** Po dobu 3 let jsme za použití stěrů z povrchů sledovaných míst hodnotili hygienický stav prostředí laboratorních myší inbredního kmene BALB/c po prováděných sanitacích. Zaměřili jsme se nejen na chovné nádoby a jejich příslušenství, ale také na predilekční místa, kde dochází ke kontaktu s dodávaným materiálem a vstupujícím personálem. Dále jsme za použití stěrů sledovali složení mikroflóry v chovných nádobách po jejich týdenním osídlení inbredním kmenem myší BALB/c. Takto získané výsledky jsme konfrontovali s výsledky, které byly získány výtěry z viditelných sliznic jak od živých, tak usmrčených myší stejného kmene i s výsledky získanými mikrobiologickým vyšetřením orgánů po provedené pitvě. Nezávislé mikrobiologické vyšetření zvířat nám poskytlo externí pracoviště.

**Výsledky:** Z našich výsledků vyplývá, že mikrobiologické vyšetření stěrů prováděné po sanitaci chovných nádob, jejich vík a vybraných predilekčních míst v prostorách zvířat prokázalo vyhovující účinnost našich sanitacních postupů. Mikrobiologické vyšetření stěrů z použitých chovných nádob prokázalo shodu s výsledky dosaženými jak u živých, tak usmrčených myší a také nepřítomnost bakterií, které mohou způsobit vážná onemocnění lidí a zvířat.

**Závěr:** Získané výsledky potvrdily náš záměr zařadit použití stěrů z prostředí laboratorních myší i výtěrů z jejich viditelných sliznic do našeho programu kontroly kvality zdraví zvířat s možností snížit počty usmrčováných myší, aniž by došlo k ohrožení integrity v průběhu pokusů.

**Klíčová slova:** laboratorní zvířata, zdravotní stav, mikrobiologický monitoring, sanitace prostředí

### SUMMARY

**Aim:** The health status of laboratory animals affects their suitability for research, therefore it is important that each facility with laboratory animals has its own program of animal quality control. The source of the infection, however, may not only be the laboratory animals, but also on infiltration agent from the outside environment. In the framework of the animal biosecurity concept, microbiological monitoring of the environment is carried out in many foreign animal facilities. The aim of our work was to evaluate how the above-mentioned microbiological monitoring of animal environment may contribute to the Animal Health Quality Control Program.

**Methods:** Over a period of 3 years, through swabs from the surfaces of the monitored sites, we evaluated the hygienic condition of the laboratory mice (inbred strain BALB/c) after sanitation. We have focussed not only on breeding containers and their accessories, but also on predilection sites where they come into contact with supplied material and entering personnel. Furthermore, we have monitored the composition of the microflora in breeding vessels after their week-long settlement with the inbred strain of BALB/c mice. The obtained results were confronted with results obtained from the swabs of visible mucous membranes from both live and sacrificed mice of the same strain and the results obtained by microbiological examination of organs after autopsy. Independent microbiological examination of mice was provided by an external facility.

**Results:** Our results show that microbiological examination of swabs after sanitation of breeding cages, their lids and selected predilection sites in the animal room has demonstrated satisfactory efficacy of our sanitation procedures. Microbiological examination of swabs from used breeding vessels has shown consistency with the results achieved in both live and sacrificed mice and the absence of bacterial pathogens that can cause serious human and animal diseases.

**Conclusion:** The results have confirmed our intention to include the use of swabs from laboratory mice and swabs from their visible mucous membranes in our animal health control program with the potential to reduce the number of sacrificed mice without compromising integrity during experiments.

**Key words:** laboratory animals, health status, microbiological monitoring, environmental sanitation

## Úvod

Zdravotní stav laboratorních zvířat ovlivňuje jejich vhodnost pro výzkum, a proto je důležité, aby každé pracoviště s laboratorními zvířaty mělo stanovený program kontroly kvality zdraví zvířat, často nazývaný jako zdravotní monitoring (1). Jedná se o mikrobiologické vyšetření namátkově vybraných zvířat, která jsou pro tento účel usmrcována (2).

Zdrojem infekce však nemusí být jen laboratorní zvířata, ale také průnik infekčního agens z vnějšího prostředí. K ochraně před zavlečením infekce je doporučována koncepce biologické bezpečnosti zvířat (animal biosecurity), která vychází ze zásad veterinární epizootologie a veterinárně hygienických opatření (1–5). Jedná se o stavební úpravy a jejich technologické vybavení, vstup zvířat do zařízení, ošetření materiálů, které přicházejí do styku se zvířaty, řízení kontaktů mezi člověkem a zvířetem, bezpečné ošetření krmiva, podestýlky, vody, mikroklimatu, koncepci sanitacích a dezinfekčních postupů, bezpečnou likvidaci biologického odpadu a řadu dalších. Mikrobiologickou kontrolu prostředí zvířat zajišťuje pravidelný mikrobiologický monitoring, který se provádí v řadě zahraničních pracovišť (6–9). Cílem naší práce bylo vyhodnotit, jak mikrobiologický monitoring prostředí přispěje v programu kontroly kvality zdraví zvířat k minimalizaci rizika vzniku nežádoucí mikrobiální kontaminace.

Po dobu 3 let jsme za použití stěrů z povrchů sledovaných míst hodnotili hygienický stav prostředí laboratorních myší inbredního kmene BALB/c po prováděných sanitacích. Zaměřili jsme se na chovné nádoby a jejich příslušenství, protože zde dochází k nejintimnějšímu kontaktu zvířete s jeho prostředím, ale také na předilekční místa, kde dochází ke kontaktu s dodávaným materiálem a vstupujícím personálem (kliky dveří, podlahy u vchodu do místnosti se zvířaty, stojany a stěny v blízkosti chovných nádob). Z hlediska animal biosecurity jsme sledovali složení mikroflóry chovných nádob jak po provedené sanitaci, tak po jejich týdenním osídlení inbredním kmenem myší BALB/c. Za účelem validace tohoto způsobu mikrobiologického monitoringu jsme takto získané výsledky konfrontovali s výsledky získanými výtěry viditelných sliznic jak od živých, tak usmrcených myší i s výsledky získanými mikrobiologickým vyšetřením orgánů po provedené pitvě. Na pevných kultivačních půdách byl hodnocen nárůst bakterií a plísní, eventuálně stanoven počet narostlých kolonií. Dále bylo prováděno třídění bakterií na základě Gramova barvení a identifikace bakterií komerčními biochemickými testy a/nebo za použití hmotností spektrometrie (MALDI-TOF MS). Nezávislé mikrobiologické vyšetření zvířat nám poskytlo externí pracoviště (AnLab Ltd, Česká republika).

Kritérium hodnocení mikrobiálního znečištění prostředí bylo převzato z interního postupu Cornell University (10).

## Materiál a metodika

*Pokusná zvířata a jejich prostředí*

Sledování zdravotního stavu zvířat a jejich prostředí v našem bariérovém zařízení probíhalo v průběhu let 2016–2018 celkem na 160 laboratorních myších, dospě-

lých samicích o hmotnosti 20–30 g, inbredního kmene BALB/c. Laboratorní myši pocházely z SPF (specified pathogen free) chovu (Charles River Laboratories, Německo) a byly podle protokolu dodavatele prosté těchto nežádoucích agens: *minute virus of mice*, *mouse parvovirus*, *mouse hepatitis virus*, *murine norovirus*, *Theiler's murine encephalomyelitis virus*, *epizootic diarrhea infant mice*, *Sendai virus*, *reovirus*, *pneumonia virus of mice*, *mouse cytomegalovirus*, *Hantaan virus*, *lymphocytic choriomeningitis virus*, *mouse adenovirus*, *mouse thymic virus*, *ectromelia virus*, *lactate dehydrogenase elevating virus*, *K virus*, *Typhers diseases*, *Bordetella bronchiseptica*, *Citrobacter rodentium*, *Corynebacterium kutscheri*, *Pneumonia pneumotropica*, *Pneumonia multocida*, *Salmonella* sp., *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus pneumoniae*,  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* sp., *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter bilis*, *Helicobacter typhlonius*, *Cilia-associated respiratory bacillus*, *Mycoplasma pulmonis*, *Encephalitozoon cuniculi* and all ecto- and endoparasites.

*Ošetření zvířat*

Laboratorní myši (inbrední kmen BALB/c) byly dováženy v transportních přepravkách (VELAZ, s.r.o., Česká republika) s maximální ochranou před nežádoucí infekcí. Po povrchové dezinfekci těchto nádob byly laboratorní myši ihned umístěny do sterilních chovných nádob v bariérovém zařízení.

Každá chovná nádoba z plastu o rozměrech 800 cm<sup>2</sup> (Typ 3, VELAZ, s.r.o., Česká republika) obsahovala 6 dospělých myších samic, které byly krmeny ad libitum sterilním kompletním krmivem určeným pro tento druh zvířat (ST 1, výrobce Velaz, s.r.o., Česká republika), napájeny sterilní pitnou vodou a podestýlány sterilními bezprašnými dřevěnými hoblinami (Seln-Werk GmbH Co. KG, Německo). Krmítka a napáječky byly postupně doplňovány tak, aby zůstávaly plné. Použité chovné nádoby a její příslušenství včetně krmiva, pitné vody a podestýlky byly měněny 1krát týdně.

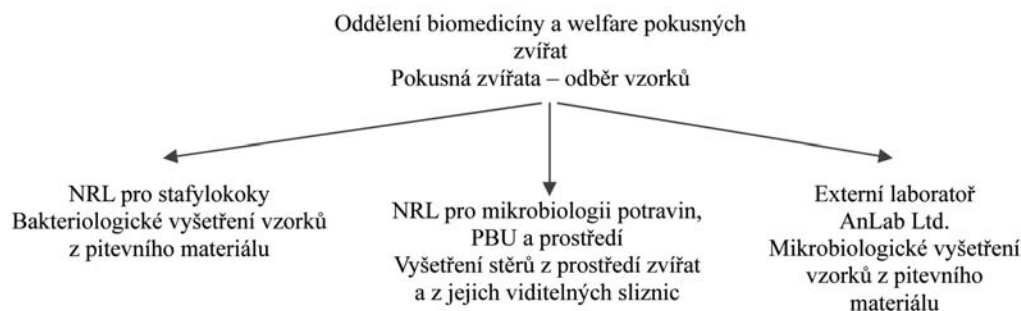
*Mikroklimatické podmínky v bariérovém zařízení*

Vstup za bariéru byl umožněn za použití vzduchové sprchy po převlečení osob do sterilních kombinéz s nasazenou ústní rouškou, čepicí a rukavicemi. Vzduch v místnostech se zvířaty byl filtrován od nežádoucích mikroorganismů, byl udržován přetlak o hodnotě 40 Pa a proudění vzduchu nepřesahovalo 0,3 m/s. Teplota prostředí se pohybovala v rozmezí 20–24 °C a relativní vlhkost v rozmezí 40–70 %. Světelný režim byl nastaven na 12 hodin tma a 12 hodin světlo. Mikroklimatické podmínky byly každou hodinu elektronicky registrovány a data ukládána po dobu 3 let.

*Sanitace prostor se zvířaty*

Chovné nádoby s jejich příslušenstvím byly strojově myty v 0,5–1,0% detergenčních roztocích (DIVBRAU, DIVOSTAR, Maďarsko), po opláchnutí pitnou vodou byly sterilizovány v parním autoklávu (BMT – Brněnská medicínská technika, a. s., Česká republika). Sterilizační procesy byly zaznamenávány a kontrolovány chemickými indikátory (BAG Health Care GmbH, Česká republika).

Podlahy za bariérou byly denně, stěny a vstupy 1krát měsíčně, omývány dezinfekčními roztoky (SAVO 10%, Incidin, Incudur 0,75%, Desam GK 2%, Chloramin 2%), které byly pravidelně střídány, aby nedošlo ke vzniku rezistentních kmenů.

**Schéma zpracování vzorků ve Státním zdravotním ústavu (Šrobárova 49/48, Praha 10)****Pracovní postup a použité metody mikrobiálního monitoringu****Odběry vzorků***a) Odběr vzorků po sanitaci*

Odběry vzorků z chovných nádob a jejich vík byly prováděny do 24 hodin po jejich sanitaci. Stěry byly provedeny sterilními tampony/stěrovkami (Micro-Trans Swab, Česká republika) zvlhčenými těsně před použitím sterilním fyziologickým roztokem z vnitřního povrchu plastových chovných nádob (ze všech 4 koutů o celkové ploše 25 cm<sup>2</sup>) a jejich drátěných vík (z plochy 25 cm<sup>2</sup> v místě krmiva) a byly okamžitě předány k mikrobiologickému vyšetření.

Stěry z prostor pokusných zvířat byly prováděny stejným způsobem z povrchu predilekčních míst (klicka dveří z vnitřní strany, podlaha u vstupu do místnosti, stojany se zvířaty a stěny přibližně ve výši 160 cm nad podlahou).

*b) Odběr vzorků před sanitací*

Odběry vzorků z použitých chovných nádob a jejich vík po jejich týdenním osídlení byly prováděny stejným způsobem. Po odstranění zvířat a použité podestýlky byl z jednoho stěru získán směsný vzorek ze zbytků exkrementů (zbytky směsi trusu, moče, slin a kožních derivátů) od šesti myši.

*c) Odběr vzorků z viditelných sliznic a tkání myši*

Byly provedeny výtěry z viditelných sliznic a srsť jak od živých, tak od usmrcených myši, a navíc byly odebrány vzorky pitevního materiálu (plíce, srdce, já-

tra, slezina, tenké střevo, ledviny). K odebrání vzorků byly použity rovněž sterilní stěrovky (Micro-Trans Swab, Česká republika) zvlhčené sterilním fyziologickým roztokem.

**Zpracování vzorků***a) Stěry z chovných nádob a vík před a po sanitaci (SZÚ)*

*Stěry po sanitaci:* Pro stanovení celkového počtu bakterií, kvasinek a plísní byla každá stěrovka ustržena do sterilní zkumavky s 2 ml fyziologického roztoku (FR), ev. pufované peptonové vody (PPV), následně vytřepána na vortexu po dobu 30 sekund. Na povrch trypton-sojového agaru (TSA) a Sabouradova dextrózoového agaru (SDA) bylo inokulováno 0,2 ml uvedených roztoků a inkubováno.

*Stěry před sanitací:* V případě stěrů z chovných nádob před sanitací, ve kterých byly chovány myši, byl zbytek PPV se stěry doplněn sterilní PPV na celkový objem 10 ml, zkumavky umístěny do inkubátoru s třepačkou a za stálého třepání inkubovány 18 hodin pro případné pomnožení a následný záchyt bakterií na selektivních médiích. Po uplynutí této doby byla změřena optická denzita pro odhad počtu bakterií, bylo provedeno patřičné ředění pomocí fyziologického roztoku a na povrch jednotlivých selektivních půd bylo vyočkováno 0,2 ml daného roztoku. Pro lepší zachycení bakterií mléčného kvašení byla provedena také anaerobní kultivace s použitím vyvíječe anaerobní atmosféry AnaeroGen (Oxoid). Přehled půd a inkubační doba je uvedena v tabulce 1.

Tab. 1: Kultivační půdy a doba inkubace

Kultivační půda	Stanovení	Doba inkubace	Teplota inkubace
Krevní agar	Bakterie	24 hodin	37 °C
TSA (Trypton-sojový agar)	Bakterie	24–48 hod	30 °C
SDA (Sabouradův agar)	Kvasinky a plísně	2–5 dnů	25 °C
BP (Baird-Packer agar)	Rod <i>Staphylococcus</i>	24–48 hod po pomnožení v PPV	37 °C
CET (Cetridimidový agar)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24–48 hod po pomnožení v PPV	37 °C
MAC (MacConkey agar) ENDO (Endův agar)	Čeď Enterobacteriaceae	24–48 hod po pomnožení v PPV	37 °C
MRS (Agar podle DeMana, Rogosiho a Sharpeho)	Bakterie mléčného kvašení	24–48 hod po pomnožení v PPV	37 °C
SB (Slanetz a Bartley médium)	Rod <i>Enterococcus</i>	24–48 hod po pomnožení v PPV	37 °C
TBX (Trypton-žlučový agar s X-glukoronidem)	<i>Escherichia coli</i>	24–48 hod po pomnožení v PPV	37 °C



b) *Výtěry z viditelných sliznic a srsti od živých myši (SZÚ)*

Stěrové tampony byly vytřepány do fyziologického roztoku (předpoklad vyššího počtu zachycených mikroorganismů) a následně bylo vyočkováno 0,2 ml na povrch selektivních kultivačních médií (BP, CET, MAC, MRS, TBX, SB). Pro lepší zachycení bakterií mléčného kvašení byla provedena také anaerobní kultivace s použitím vyvíječe anaerobní atmosféry AnaeroGen (Oxoid).

c) *Výtěry z viditelných sliznic a srsti od usmrcených myši a vzorky myších tkání (SZÚ)*

Stěrové tampony byly přímo kultivovány na krevním agar (výtěry z usmrcených myši). Vzorky tkání z usmrcených myši byly 20 hodin pomnoženy v živném bujónu a pak rovněž kultivovány za aerobních podmínek na krevním agaru.

d) *Mikrobiologické vyšetření v externí akreditované laboratoři (AnLab Ltd., Praha)*

Náhodně vybrané myši v průběhu našeho sledování byly podrobeny kompletnímu mikrobiologickému vyšetření v akreditované externí laboratoři (AnLab Ltd., Praha).

Sérologické vyšetření na přítomnost virů bylo prováděno metodou ELISA a za pomoci imunoflorescenční metody.

Bakteriologické vyšetření bylo prováděnou běžnou kultivační metodou, pro depistáž *Helicobacter* sp. byla použita metoda PCR.

Parazitologické vyšetření obsahu střev bylo prováděno mikroskopickým průkazem vajíček helmintů i vývojových stádií prvoků koncentrační flotační metodou dle Fausta. Pro mikroskopický průkaz ektoparazitů byla použita metoda zhotovení nativního preparátu.

## Výsledky

## Hodnocení dosažených výsledků

a) *Způsob hodnocení sanitace prostředí*

Po ukončení inkubace byl zaznamenán celkový počet kolonií bakterií a plísní (stěry z chovných nádob, vík a prostředí zvířat na Petriho miskách).

Kategorizace znečištění prostředí podle počtu narostlých kolonií:

Skóre na TSA a SDA kultivační půdě, převzato z Cornell University, interní SOP (10):

0–5 kolonií = výborné

6–25 kolonií = vyhovující

26–50 kolonií = přijatelné

50 a více kolonií = nepřijatelné

Kategorizace znečištění prostředí podle barvitelnosti bakterií dle Grama (G+ a G– bakterie), převzato z Cornell University, interní SOP (10):

Výborná sanitace = žádný růst bakterií,

Dobrá sanitace = nepřítomnost gramnegativních tyčinek a grampozitivních koků,

Přijatelná sanitace = nepřítomnost gramnegativních tyčinek, ale přítomnost grampozitivních koků,

Nepřijatelná sanitace = přítomnost gramnegativních tyčinek.

*Gramovo barvení bylo provedeno standardním postupem pomocí reagentů firmy HIMEDIA.*

Výsledky úspěšnosti sanitace jsou uvedeny v tabulce 2.

Jak vyplývá z tab. 2, stěry provedené z výše uvedených předmětů po jejich sanitaci lze hodnotit podle počtu narostlých kolonií následovně:

Chovné nádoby, stěna (žádný nárůst kolonií bakterií a plísní na Petriho miskách) – jako **výborné**.

Drátěná víka, stojany (nárůst bakterií a plísní do 5 kolonií na Petriho miskách) – rovněž jako **výborné**.

Klika dveří z vnitřní strany, podlaha u vstupu do místnosti (nárůst bakterií a plísní pod 25 kolonií na Petriho miskách) – jako **vyhovující**.

Hodnocení mikrobiologického monitoringu podle barvitelnosti bakterií dle Grama (G+ a G– bakterie) lze hodnotit sanitační postupy následovně:

Chovné nádoby, stěny (žádný růst bakterií) – jako **výborné**.

Drátěná víka, stojany, klika dveří z vnitřní strany, podlaha u vstupu do místnosti (nepřítomnost gramnegativních tyčinek a grampozitivních koků) – jako **dobré**.

b) *Metody identifikace bakterií na SZÚ*

Identifikaci izolovaných bakterií provádíme na základě morfologických znaků kolonií, Gramova barvení, biochemických testů (oxidázový test, katalázový test), diagnostických souprav GP24, ev. GN24 (DIAGNOSTICS s.r.o.) a/nebo pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS. Přehled kultivačních půd a doba inkubace je uvedena v tab. 1.

Identifikované bakterie izolované ze stěrů z nádob a jejich vík jsou uvedeny v tab. 3.

Jak vyplývá z tabulky 3, z použitých chovných nádob po jejich týdenním osídlení zvířaty byly identifikovány následující bakterie: *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactobacillus johnsonii*. Plísňe ani kvasinky zachyceny nebyly. Na drátěných víkách nebyly zachyceny bakterie, kvasinky ani plísňe. Identifikované bakterie izolované z výtěrů viditelných sliznic živých myši jsou uvedeny v tab. 4.

Tab. 2: Mikrobiologický monitoring prostředí laboratorních myši po sanitaci

Způsob odběru vzorků		Počty kolonií narostlých na jednotlivých kultivačních půdách			
Stěry z povrchů	Počet vzorků z jednotlivých odběrových míst	TSA	SDA	BP	ENDO
Chovná nádoba	28	0	0	0	0
Drátěné víko	28	1	5	0	0
Klika dveří z vnitřní strany	28	10	0	0	0
Podlaha u vstupu do místnosti	28	0	20	0	0
Stojan	28	2	2	0	0
Stěna cca 160 cm nad podlahou	28	0	0	0	0

Tab. 3: Záchyt bakterií v chovných nádobách a jejich víkách před sanitací

Místo stěru	Počet laboratorních myší, kmene BALB/c	Počet stěrů/počet pozitivních záchytů	Identifikované bakterie
Chovná nádoba se zbytky exkrementů	48	8/7	Staphylococcus sciuri, Enterococcus gallinarum, Enterococcus casseliflavus, Lactobacillus johnsonii Žádný záchyt plísni
Víko chovné nádoby	48	8/0	Bez záchytu bakterií a plísni

Poznámka: Stěry byly odebrány sterilními stěrkami z exkrementů, které ulpěly v rozích chovných nádob a vík v místě krmiva po odstranění použité podestýlky a zvířat. Exkrementy, které ulpěly v místě stěrů, se skládaly z myšního trusu, moče, slin a kožních derivátů.

Tab. 4: Záchyt a identifikace bakterií po výtěru viditelných sliznic a srsti živých myší

Výtěry z živých myší		Laboratorní myš, kmen BALB/c
Místo výtěru	Počet vzorků	Identifikace bakterií
Nosohltan	12	Staphylococcus sciuri, Lactobacillus johnsonii
Rektum	12	Enterococcus gallinarum, Enterococcus faecium, Enterococcus mundii, Escherichia coli
Vagina	12	Enterococcus gallinarum, Lactobacillus murinus
Srst	12	Bez záchytu bakterií a plísni

Jak vyplývá z tabulky 4, byly z výtěrů viditelných sliznic odebraných živým myším identifikovány následující bakterie:

Nosohltan – *Staphylococcus sciuri*, která jako saprofyt a komenzál obývá horní cesty dýchací a trávicí trakt zvířat a člověka. Bakterie *Lactobacillus johnsonii* bývá součástí mikroflóry trávicí soustavy a vaginy.

Rektum – *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus mundii* a *Escherichia coli*, nehemolytický kmen. Bakterie, které se vyskytují jako saprofyt a komenzál trávicího traktu u zvířat a člověka.

Vagina – *Enterococcus gallinarum* a *Lactobacillus murinus*, které jsou jednou z významných částí střevní mikroflóry a také se vyskytují na sliznici dutiny ústní a vaginy.

Srst – bez záchytu bakterií a plísni.

Identifikované bakterie izolované z výtěru viditelných sliznic usmrcených myší jsou uvedeny v tab. 5.

Jak vyplývá z tab. 5, z výtěrů viditelných sliznic usmrcených myší byly identifikovány následující bakterie:

Nosohltan – *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus gallinarum*, které jako saprofyt a komenzál obývají horní cesty dýchací a trávicí trakt zvířat a člověka.

Rektum – *Enterococcus gallinarum*, bakterie, která se vyskytuje jako saprofyt a komenzál trávicího traktu u zvířat a člověka. *Escherichia coli*, nehemolytický kmen, je běžná mikroflóra střev.

Vagina – *Enterococcus gallinarum*, *Escherichia coli*, nehemolytický kmen, a navíc *Lactobacillus murinus*, který je jednou z významných částí střevní mikroflóry a také se vyskytuje na sliznici dutiny ústní a vaginy.

Tab. 5: Záchyt a identifikace bakterií po výtěru viditelných sliznic a srsti usmrcených myší

Výtěry z usmrcených		Laboratorní myš, kmen BALB/c
Místo výtěru	Počet vzorků	Identifikace bakterií
Nosohltan	12	Staphylococcus sciuri, Enterococcus gallinarum
Rektum	12	Enterococcus gallinarum, Escherichia coli
Vagina	12	Enterococcus gallinarum, Escherichia coli, Lactobacillus murinus
Srst	12	Bez záchytu bakterií a plísni

Tab. 6: Záchyt a identifikace bakterií z vnitřních orgánů usmrcených myší

Odběr vzorků tkání		Laboratorní myš, kmen BALB/c
Orgán	Počet vzorků	Identifikace bakterií
Plíce	12	Bez záchytu bakterií a plísni
Srdce	12	Bez záchytu bakterií a plísni
Játra	12	Enterococcus gallinarum
Slezina	12	Enterococcus gallinarum
Střevo	12	Enterococcus gallinarum, Escherichia coli
Ledviny	12	Enterococcus gallinarum, Lactobacillus murinus

Srst – bez záchytu bakterií a plísni.

Identifikované bakterie izolované z vnitřních orgánů usmrčených myší jsou uvedeny v tabulce 6.

Jak vyplývá z tabulky 6, z vnitřních orgánů odebraných z usmrčených myší byly identifikovány následující bakterie:

Plíce, srdce – bez záchytu bakterií a plísni.

Játra, slezina – *Enterococcus gallinarum*, bakterie, která se vyskytuje jako saprofyta a kmenzál trávicího traktu u zvířat a člověka.

Střevo – *Enterococcus gallinarum*, *Escherichia coli*, nehemolytický kmeny, které patří k běžné mikrobiotě střev.

Ledviny – *Enterococcus gallinarum*, *Lactobacillus murinus*, které jsou jednou z významných částí střevní mikroflóry.

Místa výskytu bakterií a hodnocení jejich biologických vlastností odpovídá údajům uváděným v odborné literatuře (11–15).

### Hodnocení nálezů z externí laboratoře

Sérologické vyšetření myší prokázalo negativní titry protilátek proti murinnímu viru.

Bakteriologické vyšetření prokázalo obvyklou mikrobiotou kolonu, vagíny a průdušnice (koaguláza -negativní stafylokoky, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli* nehemolytická).

Parazitologické vyšetření prokázalo nepřítomnost ekto a endoparazitů.

### Diskuse a závěr

Pravidelná sanitace zařízení s pokusnými zvířaty přispívá k minimalizaci šíření infekcí (1, 3, 16). Mikrobiologický monitoring sanitace detekuje, zda zavedený sanitací postup (mytí, dezinfekce prostor a sterilizace chovných nádob a jejich příslušenství) proběhl úspěšně. V negativním případě odhalí případné závady, aniž by došlo k vzplanutí infekce. Z našich výsledků vyplývá, že mikrobiologické vyšetření stěrů prováděné po sanitaci chovných nádob, jejich vík a vybraných predilekčních míst v prostorách laboratorních myší prokázalo vyhovující účinnost sanitčních postupů prováděných na našem pracovišti.

Kritérium hodnocení znečištění prostředí bylo převzato z interního postupu (10) a je využíváno v řadě zahraničních pracovišť s pokusnými zvířaty (6–9). Výše uvedený způsob kontroly prostředí je nenáročný na čas, laboratorní vybavení a lze jej doporučit i pro zvěřince s jednoduchým laboratorním vybavením.

V rámci mikrobiologického monitoringu prostředí laboratorních myší nás dále zajímalo, zda je možné použít stěry ze znečištěných chovných nádob a jejich vík k detekci nežádoucích mikroorganismů. Výsledky mikrobiologického vyšetření stěrů z chovných nádob a jejich vík po jednotýdenním osídlení kmenem laboratorních myší BALB/c jsme porovnávali s výsledky vyšetření po výtěrech viditelných sliznic a srsti jak od živých, tak od usmrčených laboratorních myší stejného kmene. Jak vyplývá z výše uvedených tabulek 4 a 5, byla nalezena významná shoda ve složení mikroflóry vyšetřovaných myší. Rovněž výsledky bakteriologického vyšetření tkání (viz tab. 6) prokázaly shodu. Naše výsledky, získané výše uvedeným způsobem, byly také potvrzeny nezávislou mikrobiologickou laboratoří (AnLab Ltd, Česká republika).

Výhodu použití stěrů z chovných nádob, které byly použity ke skupinovému ustájení laboratorních myší, spatřujeme v tom, že lze z jednoho stěru získat směsný vzorek od více zvířat, a to jak do počtu, tak i do druhu odebraného materiálu (zbytky směsi trusu, moče, slin a kožních derivátů), a tak získat větší celkový přehled o mikrobiálním osídlení celé kolonie.

Identifikované bakterie, které byly izolovány z odebraných vzorků, odpovídají mikrobiálnímu osídlení zdravých zvířat (11–15).

V průběhu našeho sledování byla udržena požadovaná kvalita zdraví myší v kategorii SPF (prostě specifických patogenů), a to jak během karantény, tak i po celou dobu probíhajících pokusů.

Dosažené výsledky potvrdily náš záměr zařadit použití stěrů z prostředí myší a výtěrů z jejich viditelných sliznic do „programu kontroly kvality zdraví zvířat“ na našem pracovišti, a navíc tak uplatnit jednu ze zásad koncepce 3R (16), a to snížit počty usmrčováných zvířat pro účely mikrobiologické diagnostiky, aniž by došlo k ohrožení zdraví ostatních myší.

*Poděkování:*

*Práce byla podpořena MZ ČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZÚ, IČ 75010330).*

### LITERATURA

1. Pritchett-Corning KR, Shek WR, Henderson KS, Clifford CB. Companion guide to rodent health surveillance for research facilities. Wilmington: Charles River; 2009.
2. Mähler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. Lab Anim. 2014;48(3):178-92.
3. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the care and use of laboratory animals. 6th ed. Washington, D. C.: Institute of Laboratory Animal Resources; 1996.
4. Zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů. Sbírka zákonů ČR. 1992;částka 50:1284-90.
5. Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon) ve znění pozdějších předpisů. Sbírka zákonů ČR. 1999;částka 57:3122-50.
6. Ednie LD, Wilson RP, Lang CM. Comparison of two sanitation monitoring methods in an animal research facility. Lab Anim Sci. 1998;37(6):71-4.
7. Shields RP, Schramm B, Braune NE. Evaluation of room cleaning procedures in a laboratory animal facility. Lab Anim. 1979;13(3):253-6.
8. Schondelmeyer CW, Dillehay, DL, Webb SK, Huerkamp MJ, Mook DM, Pullium JK. Investigation of appropriate sanitation frequency for rodent caging accessories: evidence supporting less-frequent cleaning. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2006 Nov;45(6):40-3.
9. Wellstood-Nuesse S, Shields RP. Environmental monitoring in a laboratory animal facility. Lab Anim Sci, 1976 Aug;26(4):592-9.
10. Guanzini L. Microbiological monitoring program in conventional animal facilities. Standard operating procedure (SOP). Cornell University, Cornell Center for Animal Resources and Education; 2006.

11. Dubos R, Schaedler RW, Costello R, Hoet P. Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 1965;122(1):67-76.
12. Kloos WE, Schleifer KH, Smith RF. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp.nov. and its subspecies. *Inter J Syst Bacteriol.* 1976;26(1):22-37.
13. Schaedler RW, Dubos RJ. The fecal flora of various strains of mice. Its bearing on their susceptibility to endotoxin. *J Exp Med.* 1962 Jun 1;115:1149-60.
14. Schaedler RW, Dubos R, Costello R. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J Exp Med.* 1965 Jul 1;122:59-66.
15. Vařejka F, Mráz O, Smola J. Speciální veterinární mikrobiologie. Praha: SZN; 1989.
16. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU, o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Úřední věstník EU. 2010;53(L 276):33-79.

*Došlo do redakce: 4. 6. 2019*

*Přijato k tisku: 28. 7. 2019*

*MVDr. Tomáš Svoboda, CSc.*

*Státní zdravotní ústav*

*Šrobárova 49/48*

*100 00 Praha 10*

*Česká republika*

*E-mail: mvd.r.svoboda@seznam.cz*