Microbiological Standardization in Small Laboratory Animals and Recommendations for the Monitoring

Küçük Laboratuar Hayvanlarında Mikrobiyolojik Standardizasyon ve İzlem için Öneriler

Laboratuar Hayvanlarında Mikrobiyolojik Standardizasyon / Microbiological Standardization in Small Laboratory Animals

Meral Karaman
Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Türkiye.

Özet

Laboratuar hayvancılığında mikrobiyolojik standardizasyon; hayvanların barındırdıkları mikroorganizma türlerine ve buna bağlı olarak yetiştirilme ortamlarına göre sınıflandırılması, bu özelliklerinin korunması ve mikrobiyolojik durumlarının belgelendirilmesi esaslarına dayanmaktadır. Laboratuar hayvanlarında mikrobiyolojik standardizasyon açısından çok farklı sınıflandırmalar bulunmakla birlikte temel olarak; gnotobiotik hayvanlar, tam bariyer sistemi ile üretilen hayvanlar (Germ free; GF, Kolonizasyona dirençli floralı; CRF), kısmi bariyer sistemi ile üretilen hayvanlar (Spesifik patojen free; SPF) ve bariyersiz ünitelerde geleneksel yöntemlerle üretilen hayvanlar (Konvansiyonel; CV) şeklinde sınıflandırılabilirler. Mikrobiyolojik standardizasyonun izlenmesi iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan birincisi bariyer sistemlerinin kontrolü (süreç kontrol) diğeri ise laboratuar hayvanlarının kontrolüdür (ürün kontrol). Bariyer sistemlerinin kontrolünde; ortam havasından, yüzeylerden, hayvanların altlık malzemeleri, besinler ve sulardan rutin olarak örnekler alınır ve mikrobiyolojik testler yapılır. Laboratuar hayvanlarının izleminde ise sıklıkla FELASA'nın rehberleri kullanılmaktadır. Hayvanların mikrobiyolojik kalitelerine göre; izlem sıklığı, örneklem büyüklüğü, test edilecek mikroorganizmalar ve test yöntemlerinin değiştiği bu rehberler FELASA tarafından güncellenmekte ve web sayfalarında paylaşılmaktadır. Ülkemizde genel olarak deneysel çalışmalarda kullanılan hayvanların mikrobiyolojik açıdan belirli bir standardizasyonu bulunmamakta, rutin olarak izlem protokolleri uygulanmamaktadır. Bu nedenle mikrobiyolojik olarak standart hayvanların üretimi için tesislerin yapılanması ve mikrobiyolojik kaliteyi test eden destek laboratuarlarının oluşturulması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler

Mikrobiyolojik Standardizasyon; Fare; Sıçan; FELASA Önerileri; Sağlık İzlemi

Abstract

Microbiological standardization in laboratory animal breeding is based on the classification according to the microorganisms that the animals host and consequently their upbringing environment, as well as the certification of their microbiological status and the protection of their properties. Although there are many different classifications for microbiological standardization of laboratory animals, they can be basically classified as; gnotobiotic animals, animals bred with a complete barrier system (Germ free, GF, with Colonization-Resistant Flora; CRF), animals bred with a partial barrier system (Specified Pathogen Free, SPF), and animals bred by conventional methods in units without barriers (Conventional; CV). Monitoring of microbiological standardization is carried out in two ways. One is controlling barrier systems (process control) and the other is controlling laboratory animals (product control). In controlling barrier systems samples are taken routinely from ambient air, surfaces, base plate materials of animals, foods and waters, and microbiological tests are carried out. FELASA guidelines are frequently used in monitoring laboratory animals. These guidelines where the monitoring frequency, sample size, micro-organisms to be tested, vary according to the microbiological quality of the animals, and test methods and are frequently updated by FELASA and shared in their web pages. In our country, in general, laboratory animals used for experimental studies present no microbiological standardization, and follow-up protocols are not implemented. Therefore, construction of facilities for the production of microbiologically standard animals and establishment of backup laboratories testing microbiological quality should be established.

Keywords

Microbiological Standardization; Mice; Rat; FELASA Recommendation; Health Monitoring Program

DOI: 10.4328/JCAM.2195 Received: 26.11.2013 Accepted: 30.12.2013 Published Online: 02.01.2014 J Clin Anal Med 2015;6(5):722-726
Corresponding Author: Meral Karaman, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Türkiye.
GSM: +905326525652 E-Mail: meral.karaman@deu.edu.tr

Giriş

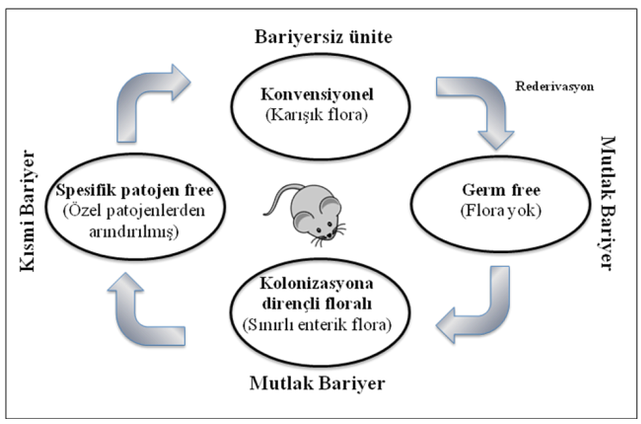
Laboratuar hayvancılığında mikrobiyolojik standardizasyon; hayvanların barındırdıkları mikroorganizma türlerine ve buna bağlı olarak yetiştirilme ortamlarına göre sınıflandırılması, bu özelliklerinin korunması ve mikrobiyolojik durumlarının belgelendirilmesi esaslarına dayanmaktadır.[1]

Deneysel çalışmalarda mikrobiyal florası bilinen, standart hayvanlarla çalışmak birçok avantaj sağlar. Öncelikle flora mikroorganizmaları bile deneysel koşullar altında patojenik hale gelebileceğinden bir enfeksiyon hastalığı nedeniyle hayvanın hastalanması ya da ölmesi dolayısıyla deneyin yarım kalması söz konusu değildir. Hayvanın mikrobiyolojik durumu kardiovasküler hastalıklar, kanser, immünoloji, gastroenteroloji, beslenme, farmakoloji, toksikoloji gibi bir çok çalışma alanını etkiler. Örneğin; germ free (GF) hayvanlara verilen bir madde kanseri önlerken aynı madde poliaksenik hayvanda kanseri tetikleyebilir. Bu durum göstermektedir ki mikroflora deneysel çalışmaların yorumlanmasında doğrudan etkilidir. Yine mikrobiyolojik olarak standart hayvanlar ile çalışmak, deneyler sırasında diğer hayvanların ya da insanların hastalanması (zoonoz enfeksiyonlar) riskini ortadan kaldırabilir. Bu durum sadece deneyin tamamlanmasına yardımcı olmakla kalmaz aynı zamanda koloninin sağlıklı bir şekilde devamına da katkıda bulunur. Dolayısıyla hayvan çalışmalarının etik temellerini oluşturan 3R kuralı çerçevesinde; araştırmalarda kullanılan hayvan sayısının azaltılması (Reducement) ve hayvan refahının iyileştirilmesi (Refinement) ilkelerine katkıda bulunur. Dezavantajı ise mikrobiyolojik olarak tanımlanmış hayvanların standardizasyonunun sürdürülmesi ciddi izolasyon sistemlerine, eğitimli personele ve iyi donanımlı destek laboratuarlarının varlığına bağlıdır ki bu durum hem tesise ilave bir iş gücü yükü hem de ciddi mali yük getirmektedir.[1,2]

Yakın zamana kadar birçok deney hayvanı herhangi bir mikrobiyolojik kalite kontrol çalışması yapılmadan, mikrobiyolojik standardizasyonu bilinmeden satılıyordu. Günümüzde ise deney hayvanı üretimi yapan bütün ciddi üretici ve yetiştiriciler özellikle FELASA'nın önerileri doğrultusunda mikrobiyal kalite kontrol çalışmaları yapmaktadır.

Küçük laboratuar hayvanları mikrobiyolojik kaliteleri ve yetiştirilme ortamları dikkate alındığında aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (Şekil 1);

1. Gnotobiotik hayvanlar
2. Tam bariyer sistemi ile üretilen hayvanlar
3. Kısmi bariyer sistemi ile üretilen hayvanlar
4. Bariyersiz ünitelerde geleneksel yöntemlerle üretilen hayvanlar



Şekil 1. Küçük laboratuar hayvanlarının mikrobiyolojik kaliteleri ve yetiştirilme ortamları

1. Gnotobiotik hayvanlar

Tamamen bilinen mikrobiyotaya sahip hayvanlardır. Gnotobiotik kelimesi yunanca bilinen yaşam (gnotos = well-known, biota = total life) anlamına gelmektedir. Mikrobiyota kavramı, hayvanların doğal olarak deri, ağız, müköz membranlar, solunum yolları, sindirim ve genital sistemlerinde bulunan normal ya da patojen olmayan olarak tanımladığımız bakteri, maya ve mantarlar gibi küçük bitkisel canlıları (Mikroflora), protozoa ve küçük omurgasızlar gibi hayvansal canlıları (Mikrofauna) kapsar. Gnotobiotik hayvanlar bir, iki ya da daha fazla tanımlanmış mikroorganizma türünü barındırmalarına göre; monoaksenik, diaksenik ya da poliaksenik hayvanlar olarak da adlandırılabilmektedirler.[2] Aseptik şartlarda doğan bu hayvanlar üretilme amaçlarına göre bariyerli ortamlarda ya da mikrobiyolojik olarak kontrol altında tutulan ortamlarda barındırılabilirler. Aslında bu hayvanlar hem GF hem de tanımlanmış floralı (defined flora) hayvanlardır. Özellikle seçilmiş bazı mikroorganizmalar ile konakçı arasındaki simbiotik yaşamı araştırmaya yönelik çalışmalarda, biotransformasyon çalışmalarında ve viral aşı üretiminde tercih edilirler. Enfeksiyöz etkenlere oldukça duyarlı olan bu hayvanların immun sistemleri iyi gelişmemiştir, barsak duvarları incedir.[3]

2. Tam bariyer sistemi ile üretilen hayvanlar

Mikrobiyolojik olarak tanımlanmış hayvanları elde edebilmek için öncelikle GF hayvan üretimi yapılmalıdır. GF hayvanlar mikroorganizmalardan tamamen arındırılmış, kendi hücreleri dışında gösterilebilen hiçbir yaşayan hücreye sahip olmayan diğer bir deyişle aksenik (a = without, xenos = foreign) hayvanlardır. Küçük kemirgenler için GF hayvanlar histerektomi, aseptik sezeryan veya embriyo transferi yöntemleri ile elde edilir. Histerektomi yönteminde uterus aseptik şartlarda çıkarılır, dezenfektan (örneğin; dilüe iyot) solusyon içine daldırılır daha sonra kabin içinde steril şartlarda açılır. Çıkarılan fetüslerin nazal kaviteleri steril tamponlar ile temizlenip solunumları uyarılır, vücut sekresyonları temizlenir. Ardından mikrobiyolojik durumları bilinen, tam bariyerli ortamlarda barındırılan sütannelere verilirler. Ancak bu uygulama sadece doğrudan temas yoluyla ya da çevresel yollarla enfektif ajanların geçişine engel olur. Anneden yavruya intrauterin yol ile geçişi engelleyemez. Özellikle Leukaemia virus, mycoplasma türleri, ***Pasteurella pneumotropica, Toxoplasma gondii ve Toxocara canis*** intrauterin yol ile geçebilen etkenler arasındadır. Bu nedenle rederivasyon ya GF hayvanlardan histerektomi ile ya da embriyo transferi yöntemi ile yapılmalıdır. Konvansiyonel (Conventional; CV) hayvanlardan histerektomi yöntemi ile elde edilenler ise rutin mikrobiyolojik izlem programına alınmalıdır. GF hayvanları CV hayvanlardan ayıran belirgin özellikleri vardır. En çarpıcı özellikleri ise çekumlarının CV hayvanların çekumlarından 5 kat daha büyük olmasıdır. Feçesleri açık renklidir ve kokusuzdur. Koprostanolü kolesterole, ürobilinojeni bilüribine indirgeyemezler. Kalp, akciğer, karaciğer gibi bazı organları daha küçüktür. Ayrıca periferik lenfoid organları küçülmüştür ve serum immunoglobulin konsantrasyonları düşüktür. İmmün sistemleri daha az gelişmiştir. İntestinal floraları olmadığından besin gereksinimleri farklıdır, özel diyet ile beslenirler.[2,4] GF hayvanlar, fizyolojik ve metabolik aktivite çalışmalarında, saf kültür üretimlerinde tercih edilirler.[1]

GF hayvanlara, fırsatçı enfeksiyonlara karşı direnç kazandırmak, mikroorganizmaların enterik kolonizasyonunu önlemek amacıyla dışarıdan uygun flora verilmesi ile kolonizasyona dirençli (enterik) floralı (Colonization Resistant Flora; CRF) hayvanlar elde edilir. Yani temel amaç dışarıdan mikroorganizmaların in-

testinal yollara kolonizasyonunu önlemektir. Burada bakteriyel düzenleme mekanizmalarının (otojenik mekanizmalar) yanısıra konakçının düzenleme mekanizmaları da (allojenik mekanizmalar) etkilidir. Otojenik mekanizmalar arasında bakteriyel reseptörlerin birbirleriyle yarışı, virülans faktörlerinin immün sistemi uyarması gibi faktörler etkiliyken, allojenik mekanizmalarda pH, barsak peristaltizmi, humoral immünite (özellikle salgısal Ig A düzeyleri), hücresel immünite, elektrolit dengesi, safra asitleri, epitelial hücrelerin yenilenmesi ve beslenme gibi faktörler etkili olmaktadır. CRF hayvanlarda tıpkı GF hayvanlar gibi mutlak bariyer sistemleri içinde yetiştirilirler.[1,2]

3. Kısmi bariyer sistemi ile üretilen hayvanlar

Özel patojenlerden arındırılmış hayvanlar (Spesified Patogen Free; SPF) olarak bilinen bu hayvanlar belirli mikroorganizmaları barındırmazlar. Başlangıç kolonisi olarak CRF hayvanlardan elde edilirler. Barındırma ortamları çevre şartlarından tamamen izole olmadığından zaman içinde CV hayvanların özelliklerini kazanırlar. SPF hayvanlar; ***Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae, Listeria monocytogenes***, helmintler, patojenik protozoalar ve mürin virüslerden arınmış olmalıdırlar. Yaşam süreleri CV hayvanlara göre daha uzun olduğundan yaşlılık çalışmalarında tercih edilirler. Ayrıca; biyolojik ürünlerin güvenilirliğinin test edilmesinde, toksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılırlar.[5,6]

4. Bariyersiz ünitelerde geleneksel yöntemlerle üretilen hayvanlar

Bariyersiz ünitelerde geleneksel yöntemlerle üretilen hayvanlar CV hayvanlar olarak bilinirler ve değişmeyen bir mikrobiyotaları vardır. Patojen mikroorganizmalara karşı korunmalarında mikrobiyotaları önemli katkı sağlar. Normal floralarını oluşturan bakteri türlerinin sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte sadece bağırsak içeriklerinde yaklaşık olarak 10^{10}-10^{11} CFU/gram bakteri bulunmaktadır. Floraları ile uyum içinde ortak bir yaşam sürerler. Aslında mikrobiyolojik olarak hiç de standart olmayan bu hayvanlar için en önemli özellik zoonoz hastalık taşımamaları ve klinik olarak herhangi bir hastalık belirtisi göstermemeleridir. Özellikle; Salmonella ve Shigella türleri, ***Mycobacterium tuberculosis, Pasteurella pneumotropica, patojenik dermotrofik mantarlar, Sarcoptes scapiei, Lymphocytic choriomeningitis*** (LCV) virüs taşımamalıdırlar. CV hayvanlar için herhangi bir özel üretim ya da yetiştiricilik sistemine ihtiyaç duyulmaz, standart barındırma şartları uygundur. Bu nedenle diğer hayvanlara göre ucuzdurlar, rutin çalışmalarda özellikle kısa sürelilerde sıklıkla kullanılırlar.[1,7]

Laboratuar Hayvancılığında Mikrobiyolojik Standardizasyonun İzlemi ve Önemi

Laboratuar hayvanları ile yürütülen çalışmalarda deneysel değişkenler olabildiğince en aza indirilmeye çalışılır. Laboratuar hayvanlarının mikrobiyolojik standardizasyonunun sürdürülmesi oldukça kapsamlı bir konudur. Burada bir canlının tüm sistemlerinin florasından, hastalık yapıcı etkenlere kadar milyonlarca mikroorganizmanın kontrolü söz konusudur. Bu kontrolde, mimari tasarım ve inşaat aşamasından itibaren tesis alt yapı özellikleri de önem taşır. Kontroller sırasında evrensel temel laboratuar güvenliği ilkeleri doğrultusunda hareket edilmesi ve laboratuar kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi için tesisin fiziksel özellikleri ön plana çıkar. Hayvanların doğal çevredeki haşere ve kemirgenlerle hiç bir şekilde temaslarının olmaması kolonide mikrobiyal kontaminasyonun sınırlandırılmasına katkı sağlar. Laboratuar hayvanlarının yetiştirildikleri alanların ofis odalarından uzakta konumlanmış, ses geçirmez duvarlarla çevrili olması, uygun seviyede ışıklandırma, hava ve nem kontrolünün yapılabilmesi gerekmektedir.[8] Barındırmada hijyenik makrolen kafeslerin kullanılması, sulukların ve başlıklarının standartlara uygun olması özellikle bu malzemelerin temizlik ve dezenfeksiyonunu kolaylaştırmaktadır.[9] Düzenli olarak yapılan kafes değişim işlemleri sırasında kullanılacak olan altlık malzemesinin kalitesi ve miktarı, hayvanların maruz kalabileceği enfeksiyöz ajanların miktarını ve hayvandan hayvana yayılmasını azaltmada önemli rol oynamaktadır.[10] Görüldüğü gibi mikrobiyolojik standardizasyonun sürdürülmesinde makroçevre ve mikroçevre koşulları büyük önem taşımaktadır.

Laboratuar hayvanı yetiştiriciliğinde mikrobiyolojik standardizasyonun izlenmesi ve kalite kontrol testlerinin yapılması aslında bir bütün olarak değerlendirilmesi gereken iki aşamada gerçekleştirilir. Bunlardan birincisi bariyer sistemlerinin kontrolü (süreç kontrolü) diğeri ise laboratuar hayvanlarının kontrolüdür (ürün kontrolü).

1. Bariyer sistemlerinin kontrolü (Süreç kontrolü)

Bariyer sistemleri laboratuar hayvanlarının mikrobiyolojik konumlarına göre farklı özellikler taşırlar. Temel amaç hayvanın mevcut mikrobiyolojik kalitesinin korunmasının yanı sıra çalışanın korunması ve laboratuar kaynaklı enfeksiyonların önlenmesidir. Bariyer sistemleri, mutlak bariyerler (İzolatör) olabileceği gibi ortama sadece potansiyel patojen ajanların girişini engelleyen klasik bariyerler de olabilir.

İzolatörler, çevresel koşullardan tamamen ayrılmış ve kendi iç çevresel koşulları kontrol altında tutulabilen, herhangi bir mikroorganizma giriş ya da çıkışına izin vermeyen ortamlardır. Mutlak bariyer sistemlerinde temel amaç hayvanların korunması ise bariyer pozitif basınç altında tutulur ve ortamdan kafeslere ya da koridordan izolatör odasına herhangi bir hava akımına, mikroorganizma girişine izin verilmez. Atıkların (altlık materyali, yem, ölü hayvanlar vb.) uzaklaştırılmasında ise mutlaka biyogüvenlik düzey 2 (BGD-2) önlemleri alınır, temel laboratuar güvenliği ilkelerine uyulur. Tüm kafes değişim işlemleri kontrollü hava akımlarının sağlandığı biyogüvenlik kabinlerine benzer ünitelerde yapılır.[11]

Mutlak bariyer sistemlerinde temel amaç çalışanın ve çevrenin korunması ise hayvanlar negatif basınç altındaki yüksek biyogüvenlik önlemli ortamlarda barındırılır. Hayvan biyogüvenlik düzeyi-3 (Animal Biosafety Level; ABSL-3) çalışmalarının yapıldığı bu laboratuarlar için ideal olanı ayrı bir binada olmasıdır. Diğer hayvanlarla ve laboratuarlarla aynı binada bulunması durumunda bu laboratuarın tüm giriş ve çıkışlarının kontrollü olması ve diğer laboratuarlardan bağımsız bir sterilizasyon-dezenfeksiyon sistemine (tüm katı ve sıvı atıklar için) sahip olması gerekmektedir. ABSL-3 çalışmalarının yapıldığı mutlak bariyerli ortamlarda hayvanlarla ilgili tüm işlemler sınıf-3 biyogüvenlik kabinleri içinde yapılmalıdır. Kafeslerde dahil olmak üzere kullanılan tüm malzemeler kabin içinde dezenfekte edildikten sonra bu laboratuar içindeki bir otoklavda sterilizasyon işlemi uygulanmalıdır. Tüm uygulamalar için BSL-3 rehberleri dikkate alınmalıdır.[11,12]

Klasik bariyer sistemlerinde ise ortama potansiyel patojenlerin girişini önlemek temel amaçtır. Bu sistemde alınacak önlemlerin niteliği bariyer bütünlüğünün genel özelliklerini belirlemektedir. Örneğin; ortama girecek malzeme ve ekipmanların sterilizasyonu ya da dezenfeksiyonu, personelin duş alarak girmesi ya da eldiven, maske, steril önlük gibi kişisel koruyucu malzemeleri kullanması ortamın mikrobiyal durumunu belirleyecektir.[1]

Bariyer sistemleri olarak geçmişte sıklıkla plastik ya da metal

izolatörler kullanılmaktaydı. Biyobalon (biobubble) olarak adlandırılan plastik sistemler aslında oda haline getirilmiş sınıf-2 biyogüvenlik kabinleri olarak da düşünülebilir. Giren ve çıkan havanın filtreler (HEPA; High Efficiency Particulate Air) aracılığı ile kontrol edildiği bu sistemlerde alınacak önlemlerin derecesi ortam özelliklerini belirlemektedir. Bu ortamlar bir oda şeklinde olabileği gibi sınıf-3 biyogüvenlik kabinlere benzer şekilde dışarıdan kauçuk eldivenlerle işlemlerin yapıldığı küçük üniteler şeklinde de olabilir. Mutlak bir bariyer oluşturulmak isteniyorsa içeriye girecek tüm malzeme, ekipman ve personelin steril olması gerekmektedir. Bu bariyer sistemlerinin mikrobiyolojik kalite kontrolünün sağlanmasında ortam havasından, yüzeylerden, hayvanların altlık malzemeleri, besinler ve sulardan örnek alınması ve mikrobiyolojik testlerin yapılması gerekmektedir. Geçmişten günümüze kadar yaygın olarak kullanılan biyobalon sistemlerinin en önemli avantajı ucuz olması, kolay kurulabilmesidir. Dezavantajı ise yapılan testler sonucunda ortamda istenmeyen bir mikroorganizmanın saptanması durumunda tüm kolloninin yok edilmesinin gerekmesidir.[13,14]

Günümüzde polivinil klorid bazlı malzemeden yapılmış bireysel havalandırmalı kafes (Individually Ventilated Cages; IVC) sistemleri kullanılmaktadır. Kimyasal dezenfektanlar ya da buhar ile steril hale getirilen bu sistemlerde hava "blower" adı verilen kontrollü ventilasyon ünitesi ile sağlanmaktadır. IVC sistemler diğer sistemlere göre oldukça pahalı olmakla birlikte birçok avantaja da sahiptir. Düşük amonyak ve karbondioksit düzeyleri, azalmış nem oranları ve ayarlanabilir havalandırma sirkülasyonları ile hayvan refahının üst düzeyde olduğu bu sistemde çalışan ve çevre sağlığı da gözetilmektedir. Herbir kafesin havalandırması ayrı olduğundan kontaminant ajanların diğer kafeslere yayılması sınırlandırılmakta, kuşkulu durumlarda sadece o kafesin raktan uzaklaştırılması yeterli olmaktadır. Aynı oda ve rak içinde farklı enfeksiyöz ajanları kapsayan çalışmalar bir arada yürütülebilmektedir.[15,16] ABSL-3 çalışmaları için yüksek biyogüvenlik önlemli IVC sistemleri de bulunmaktadır.

2. Laboratuar hayvanlarının kontrolü (Ürün kontrolü)

Bu kontrolde önemli olan hastalıklı ya da ölü hayvanların izleminin yanı sıra koloniyi temsil edecek şekilde sağlıklı hayvanların rutin izleminin yapılmasıdır. Sağlıklı görünümlü hayvanlar, kolloninin hijyenik durumu hakkında bilgi verebilecek önemli kaynaklardır. Avrupa Laboratuar Hayvanları Bilimi Dernekleri Federasyonu (Federation of European Laboratory Animal Science Associations; FELASA) üretim kolonilerinin veya araştırma birimlerinin sağlık izlemi programları ile ilgili yayınladığı önerilerinde protokolün kurumdan kuruma ya da aynı tesisin farklı birimleri arasında araştırma hedefleri, hayvan barınaklarının fiziksel durumu ve planı, bakım yöntemleri, hayvanların kaynağı, personel miktarı ve niteliği, tanı laboratuarlarının çalışma kapasitesi ve mali durum gibi faktörlere göre farklılık gösterebildiğini belirtmiştir.[17,18] AALAS (American Association for Laboratory Animal Science) ve ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science) laboratuar hayvanları bilimi alanında dünyada geçerliliği olan diğer kuruluşlardır. Bu kuruluşların laboratuar hayvanlarının düzenli sağlık kontrolleri ve mikrobiyolojik izlemleri konusunda katı kuralları bulunmamaktadır. Bu nedenle birçok izlem önerisinin temelini FELASA rehberleri oluşturmaktadır. FELASA rehberlerini düzenli olarak güncellemekte ve bu bilgileri ücretsiz olarak web sayfasında paylaşmaktadır.[17]

Gelişmiş ülkelerde laboratuar hayvanları üretimi büyük çiftliklerde ve üretim merkezlerinde (Örneğin; Taconic Europe A/S, Quantum Laboratories Ltd, Charles River WIGA vb.) yapılmaktadır. Araştırma merkezleri ihtiyaç duydukları deney hayvanlarını bu merkezlerden sağlamaktadır. Oldukça gelişmiş teknik alt yapı ve laboratuar olanaklarına sahip bu kuruluşlar kendi standartlarını ve kalitelerini denetlemek amacıyla FELASA'nın önerileri doğrultusunda çeşitli mikrobiyolojik kalite kontrol programlarını izlemektedirler. Hayvan satışları sırasında alıcılara bu hayvanların mikrobiyal durumlarını, hangi sıklıkla hangi testlerin yapıldığını gösteren belgeler sunmaktadırlar. Ülkemizde de laboratuar hayvanı üretim ve yetiştiriciliği alanında FELASA'nın hazırlamış olduğu rehberler kabul edilmektedir. Ancak düzenli olarak ve tam anlamıyla bu protokolleri uygulayan bir kurum henüz bulunmamaktadır.

FELASA rehberlerinde de belirtildiği gibi hayvanların mikrobiyolojik kalitelerine göre; izlem sıklığı, örneklem büyüklüğü, test edilecek mikroorganizmalar ve test yöntemleri değişmektedir . Ancak genel olarak üç ayda bir, rastgele örnekleme yöntemi ile herbir raktan 10 hayvanın test edilmesi önerilmektedir. SPF kolonilerinde mikrobiyolojik taramanın sıklığı yılda 2-12 olarak belirtilmektedir. Tarama testlerinde hangi enfeksiyöz ajanlara yönelik hangi incelemelerin yapılması gerektiği rehberlerde yayınlanmıştır. Sakrifikasyonu takiben nekropsi önerilmekte, serolojik, bakteriyolojik ve parazitolojik incelemeler için hangi örneklerin alınması gerektiği de belirtilmektedir.[19]

Serolojik testler temel olarak viral enfeksiyonların tespitinde kullanılmaktadır. Enzim immünoassay (ELISA) ve immünofloresan antikor (IFA) testleri son yıllarda büyük ölçüde kompleman fiksasyon (CF) ve hemaglütinasyon inhibisyon (HAI) testlerinin yerini almıştır. Genel olarak tarama testlerinin ELISA yöntemi ile yapılması, olumlu sonuçların IFA ile doğrulanması önerilmektedir. Bakteriyolojik inceleme için örnekler; üst solunum yollarından (nazofarinks, trakea), bağırsak kanalından (çekum içeriği veya feçes), üreme organlarından (prepusium ve vagina) alınabilir. İzolasyonda genellikle kültür yöntemleri önerilmekle birlikte özellikle Helicobacter türleri gibi geç ve güç üreyen bakterilerin saptanmasında seroloji ya da polimeraz zincir tepkimesi (PZT) temelli testler kullanılmaktadır. Parazitolojik incelemelerde ektoparazitlerin varlığını saptamak amacıyla postlar incelenmelidir. Endoparazit açısından ise bağırsak kanalından ya da feçesten alınan örneklerden yayma preparat hazırlanmalı, ıslak ve Giemza boyalı olarak mikroskop altında incelenmelidir. Parazitlerin identifikasyonunda gerekli durumlarda serolojik ya da PZT temelli testlere de başvurulabilir. Bu noktada tarama testlerinin sensitivite ve spesifitesinin yanısıra pozitif ve negatif prediktif değerleri de dikkate alınmalıdır. Bu taramalar sırasında herhangi bir türe ait suşda enfeksiyöz ajana rastlanılması durumunda tüm kolloninin ve aynı odadaki diğer hayvanların da taramaya tabii tutulması önerilmektedir.[17,18]

Kolonide izlemi yapılacak hayvan sayısını belirlemede çeşitli formüller bulunmakla birlikte genel olarak rutin incelemelerde yetiştirme bölümünde her bir raktan rastgele seçilen en az 10 hayvanın taramasının yapılması yeterlidir. Tavsiye edilen izlem sıklığı 3 ayda bir olmakla birlikte birçok ticari üretici testleri daha sık aralıklarla yapmaktadır. (örneğin 6 haftada bir) Ayrıca 3 ayda bir 10 hayvanı test etmek yerine her 4-6 haftada bir 3-5 hayvanı test etmek şeklinde uygulamalarda görülebilmektedir. Çoğu araştırma biriminde, mikrobiyolojik durumun izlemi için, rastgele örneklenebilecek uygun yaşta hayvan her zaman bulunamayabilir. Ayrıca, farklı özellikteki deney hayvanları (transgenik, immunodepresif, vb.) gibi az sayıda bulundurulan hayvanlar son yıllarda artan oranlarda kullanılmaktadır. Bu nedenle sentinel hayvanların kullanımı tavsiye edilir. Sentinel hayvanlar, üretim kolonisinde hijyenik durumu bilinen (bilinen patojenler bakımın-

dan negatif) ve koloninin mikrobiyolojik durumunu belirlemede yardımcı olacak hayvanlardır. Sentinel hayvanların potansiyel enfeksiyonlara maruz kalabilecekleri en muhtemel yerlerde (hayvan odasında farklı rakların en alt rafında, açık kafeslerde, kirli altlıklı kafeslerde) barındırılmaları gerekmektedir.[18,20]

Tarama testleri uygulanacak olan hayvan kolonisinde, rutin incelemenin dışında şüphelenilen bir durum varsa yaşı ve cinsiyeti göz önünde bulundurularak en az 100 hayvan içerisinden rastgele örnekleme ile seçilen hayvanlarda inceleme yapılmalıdır.[19]

Ülkemizde TC Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının 13 Aralık 2011 tarihinde çıkardığı "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik" ve buna ilişkin "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmeliğin Uygulama Talimatı" madde 15'de SPF üretim yapılan fare ve sıçanlarda mikrobiyolojik kriterler yönünden izlem yapılması ve bu izlemlerin Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının ruhsatlı özel ya da kamuya ait veteriner teşhis ve analiz laboratuarlarında yaptırılması gerektiği belirtilmektedir. Talimatın 5 ve 6 nolu eklerinde bu hayvanlarda test edilmesi gereken enfeksiyöz etkenlerin isimleri, hangi sıklıkta ve hangi yöntemlerle araştırılması gerektiği bildirilmektedir.[21]

Laboratuar hayvanları birimlerinde rutin sağlık taramalarının ve aylık ya da dönemlik enfeksiyöz ajan taramalarının yapılması, dışarıdan birime nakli yapılacak hayvanlar için karantina prosedürünün uygulanması, tarama sonuçlarının veri tabanlarına düzenli olarak işlenmesi, saptanan sorunlara yönelik önlemlerin alınması ile başlangıçta kurumlara maddi yük ve iş gücü yükü getiren bu uygulamalar zaman içinde kuruma avantajlar sağlamaktadır. İlerleyen dönemde tesisin sağlık harcamaları giderleri azalmakta, sağlıklı, standart ve refah düzeyi artmış hayvanlarla güvenilir ve tekrarlanabilir araştırma sonuçları elde edilmektedir. Bu uygulamalar ile çalışan ve çevre sağlığı da korunmaktadır.[20]

Son yıllarda ülkemizde kamu ve özel sektörde laboratuar hayvanı üretim ve yetiştiriciliği yapan kuruluşların sayısı artmıştır. Ancak burada önemli olan rakamsal olarak artışlar değil refah düzeyi yüksek, standart hayvan üretimi yapan tesis sayısının artmasıdır. Bu nedenle tesislerin yapılanmalarını gözden geçirmesi ve mikrobiyolojik kaliteyi test eden destek laboratuarlarının oluşturulması doğru bir yaklaşım olacaktır.

Çıkar Çakışması ve Finansman Beyanı

Bu çalışmada çıkar çakışması ve finansman destek alındığı beyan edilmemiştir.

Kaynaklar

1. Boot R, Koopman JP, Kunstyr I. Microbiological standardization. In: Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, editors. Principles of Laboratory Animal Science. Amsterdam: Elsevier; 2001. p. 149-72.
2. Hem A. Gnotobiology. In: Svendsen P, Hau J, editors. Laboratory Animal Science, Selection and Handling of Animals in Biomedical Research. CRC Press Inc; 1994. p. 273-91.
3. Fox JG. Normative Biology, Husbandry, and Models Gnotobiotics. In: Fox JG, Barthold S, Davisson M, Newcomer C, Quimby F, Smith A, editors. The Mouse in Biomedical Research. San Diego: Elsevier; 2006. p. 217-33.
4. Schaedler RW, Dubs R, Costello R. Association of germfree mice with bacteria isolated from normal mice. J Exp Med. 1965; 122: 77-82.
5. Mannen K. Definition of Microbiological Status of Rats and Mice. The Need for Methods of Defining Flora International Standards for Terminology. In: Microbial and Phenotypic Definition of Rats and Mice: Proceedings of the 1998 US/Japan Conference. Washington DC: National Academy Press; 1998. p. 24-27.
6. Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbitsand their effects on research. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:231-66.
7. Carter PB, Foster HL. Gnotobiotics. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editors. The Laboratory Rat. New York (NY): Elsevier; 2006. p. 693-711.
8. Kaliste E, Mering S. The Welfare of Laboratory Rats. In: Kaliste E, editor. The Welfare of Laboratory Animals. Netherlands: Springer; 2007. pp 153-80.
9. Faith RE, Hessler JR. Housing and Environment. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editors. The Laboratory Rat. New York (NY): Elsevier; 2006. p. 303-27.
10. Rosenbaum MD, Vandewoude S, Johnson TE. Effects of cage-change frequency and bedding volume on mice and their microenvironment, JAALAS. 2009; 48(6): 763-73.
11. Karaman M. Temel laboratuar güvenliği ve ülkemizdeki duruma genel bakış. J Clin Anal Med. 2011;2(3):130-3.
12. Centers for Disease Control and Prevention. BMBL Section V. Vertebrate animal biosafety level criteria, 2009. p.60-102
13. Nicklas W. Infections in Laboratory animals: Importance and Control. In: Kaliste E, editor. The Welfare of Laboratory Animals. Netherlands: Springer; 2007. p. 23-35.
14. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Edition ILAR, Washington DC: National Academy Press. 2011.
15. Brielmeier M, Mahabir E, Needham JR, Lengger C, Wilhelm P, Schmidt J. Microbiological monitoring of laboratory mice and biocontainment in individually ventilated cages: a field study. Lab Anim. 2006;40(3):247-60.
16. Krohn TC, Hansen AK, Dragsted N. The impact of cage ventilation on rats housed in IVC systems. Lab Anim. 2003;37(2):85-93.
17. Homberger F, Boot R, Feinstein R, Hansen AK, Van der Logt J. FELASA guidance paper accreditation of laboratory animal diagnostic laboratories. Lab Anim. 1999; 33 (l):19-39.
18. Kunstyr I, Nicklas W. Control of SPF conditions: FELASA standards. In: Krinke GJ, editor. The Laboratory Rat. San Diego: Academic Press; 2000. p.133-42.
19. Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B. Recommendations health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. Lab Anim. 2002; 36: 20-42.
20. Nicklas W. International harmonization of health monitoring, ILAR Journal. 2008; 49(3): 338-46.
21. Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı, Veteriner Teşhis Ve Analiz Laboratuarı Yönetmeliği. Tarih 11 Aralık 2011; Sayı 28139.