



GV-SOLAS

Gesellschaft für Versuchstierkunde
Society for Laboratory Animal Science

Fachinformation

aus dem Ausschuss für Hygiene

Mikrobiologische Untersuchung von keimfreien Tieren (Isolatoren)

Stand Juni 2004

verfasst von:

**Ron Boot, Brunhilde Illgen-Wilcke, Karin Jacobi,
Bettina Kränzlin, Angela Lorenz, Michael Mähler, Herbert Meyer,
Werner Nicklas, Uwe Zillmann**

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung.....	3
Allgemeine Regeln	3
Methodik der Entnahme und Bearbeitung der Proben	4
Anhang.....	7

Vorbemerkung

Die Haltung von keimfreien Tieren war über lange Zeit rückläufig. Mit dem verstärkten Austausch von transgenen Tieren zwischen wissenschaftlichen Institutionen ergibt sich in jüngster Zeit verstärkt die Notwendigkeit, insbesondere Nagerpopulationen zu sanieren oder neue Populationen aufzubauen. Für den Aufbau neuer Populationen werden immer häufiger gnotobiotische Tiere eingesetzt, um so das Vorkommen unerwünschter Mikroorganismen in der Ausgangspopulation auszuschließen.

In den letzten Jahren gab es für den Nachweis oder den Ausschluss von Mikroorganismen eine Reihe von methodischen Weiterentwicklungen oder Erkenntnissen, die es angebracht erscheinen ließen, frühere Empfehlungen zur Untersuchung von keimfreien Tieren zu überarbeiten. Mit der hier vorliegenden Empfehlung sollte dieser Entwicklung Rechnung getragen werden. Gleichzeitig wurde versucht, auf der Grundlage langjähriger praktischer Erfahrungen die Vorgehensweisen bei der Überprüfung von in Isolatoren gehaltenen keimfreien Tieren zu vereinfachen.

Allgemeine Regeln

Der Nachweis des keimfreien Status von Tieren und Isolatoren erfordert eine Vorgehensweise, die auf den Regeln der Isolatorhandhabung aufbaut. Es muss bei allen Untersuchungen steril (nicht nur aseptisch) gearbeitet werden. Der Ansatz von Kontrollen der verwendeten Nährböden entsprechend den Richtlinien des DAB 10 (Nachweis der Sterilität) ist unbedingt erforderlich.

Was ist bei Isolatorhaltung zu kontrollieren:

1. der Isolator - Kontrolle der Sterilität vor dem Tierbesatz
2. die Tiere - Kontrolle der Keimfreiheit in regelmäßigen Abständen
3. Materialien, die in den Isolator eingebracht werden sollen - Kontrolle der Keimfreiheit jeder Charge.

Eine Empfehlung zur Untersuchungsfrequenz ist in folgender Tabelle dargestellt

Untersuchungsobjekt	Untersuchungshäufigkeit	Untersuchungsform
Isolator	vor jedem Neubesatz	Wischproben
	alle 4 Wochen	Einstreu/Futterreste
Tiere	alle 3 Monate	Ganztieruntersuchung
	alle 4 Wochen	Kotprobe
	bei jedem Schleusen	Kotausstrich
Futter, Wasser, Einstreu, sonst. Materialien	jede Charge	Sterilitätskontrolle

Die Untersuchungsfrequenz ist von der Handhabung des Isolators abhängig. Sie kann geringer sein, wenn nur selten Schleusungen durchgeführt werden und sollte höher sein, wenn häufig Material in den Isolator eingebracht wird.

Methodik der Entnahme und Bearbeitung der Proben

Die Auswahl der für die Routineuntersuchung verwendeten Tiere hängt von verschiedenen Faktoren ab. Am besten geeignet sind Tiere direkt aus dem zu untersuchenden Bestand, die dort geboren wurden oder aber lange Zeit dort verbracht haben. Sind keine derartigen Tiere vorhanden, werden Sentineltiere (s.u.) verwendet.

Für die Untersuchung werden häufig alte Zuchttiere verwendet, da diese wegen ihrer langen Verweildauer im Bestand und ihrer abnehmenden Immunkompetenz das breiteste Erregerspektrum aufweisen. Außer für serologische Untersuchungen und bestimmte parasitologische Untersuchungen (Helminthen) sind aber auch Jungtiere mit einem Alter von mindestens 10 Wochen gut geeignet. Die Tiere werden aus möglichst verschiedenen Tierräumen und Käfigen einer Tierhaltungseinheit entnommen.

1. Wischprobe

1.1. Untersuchung neu aufgebauter und sterilisierter Isolatoren

Frisch sterilisierte Isolatoren (z.B. mit Peressigsäure) können mittels Wischprobe auf Sterilität überprüft werden. Zur Entnahme von Wischproben werden mit angefeuchteten sterilen Tupfern alle Stellen, die bei der Reinigung schlecht zugänglich sind, sowie solche, wo direkte Verbindungen nach außen bestehen könnten, intensiv abgewischt. Diese Tupfer werden in steriles Transportmedium verbracht, ausgeschleust, und wie im Anhang beschrieben weiterbehandelt.

Die Wischprobe ist nur aussagefähig, wenn sichergestellt ist, dass bei der Entnahme keine Rückstände von Desinfektions- oder Sterilisationsmittel mehr im Isolator verblieben waren.

1.2. Kontrolle im laufenden Betrieb

Im laufenden Betrieb eines Isolators ist eine Wischprobe nur dann sinnvoll, wenn der Verdacht auf eine Kontamination besteht, im Tier jedoch (noch) keine Kontamination nachweisbar ist. Hierbei wird wie unter 1.1 beschrieben verfahren.

2. Tiere

Beim Versagen von Sterilisationsmaßnahmen ist am ehesten mit dem Eindringen von Bakterien und/oder Pilzen in den Isolator zu rechnen. Diese sind meist zuerst im Tier, speziell im Kot nachweisbar. In der Praxis hat sich dazu die Untersuchung von Kotproben als Routinekontrolle bewährt, sollte jedoch nicht als alleinige Methode angewandt werden.

Zur Kontrolle der Keimfreiheit der Tiere im Isolator sind folgende Proben möglich:

1. Serumproben - Virologie, eingeschränkt Bakteriologie und Parasitologie

2. Abstriche - Bakteriologie
3. Kotproben - Bakteriologie, Mykologie, eingeschränkt Parasitologie
4. Ganztieruntersuchung - Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Pathologie

Serumproben und Abstriche sind in ihrer Aussagefähigkeit eng begrenzt. Virale Infektionen in Isolatoren sind im Vergleich zu Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen selten, in Abstrichen können u.U. Keime mit spezifischen Ansprüchen oder Habitaten nicht erfasst werden. Die Ganztieruntersuchung beinhaltet die drei anderen Möglichkeiten, ist allerdings auch am aufwändigsten und für eine häufige Kontrolle wenig empfehlenswert.

2.1. Serumproben

Die Blutentnahme im Isolator ist relativ kompliziert und wird für die Routineüberwachung im Allgemeinen nicht eingesetzt. Die Blutentnahme an ausgeschleusten Tieren braucht nicht unter besonderen Sicherheitsvorkehrungen zu erfolgen. Serumgewinnung und -untersuchung entsprechen dem Vorgehen bei SPF- und konventionellen Tieren.

2.2. Kotproben

Kotproben werden sowohl direkt vom Anus entnommen als auch aus dem Käfig gesammelt. Die gesammelten Proben können Einstreu enthalten, dürfen jedoch nicht eingetrocknet sein! Sie werden in einem möglichst kleinen (wenig Sauerstoff) geschlossenen Gefäß ausgeschleust und sofort unter sterilen Bedingungen als Mischprobe weiterbearbeitet wie unter 2.3 angegeben.

Für die häufige Kontrolle kann eine Kotprobe auch nur auf einen Objektträger als Ausstrich aufgebracht und mikroskopisch auf Bakterien überprüft werden (s. Tab. 1). Bei regelmäßiger Kontrolle sind viele Kontaminationen auf diese Weise erfassbar.

Bei Verdacht auf Kontamination muss umgehend eine weitergehende Kontrolle durchgeführt werden.

Hinweis: Parallel zu Kotproben können auch Einstreu/Futterreste untersucht werden. Sie können getrennt von den Kotproben gesammelt werden, ihre Weiterbehandlung erfolgt wie für Kotproben aufgeführt.

2.3. Ganztieruntersuchung

Die Tiere werden in einem geschlossenen Behälter aus dem Isolator geschleust, der erst zur Tötung und Untersuchung unter einer Sterilwerkbank geöffnet wird. Tötung, Probenentnahme und -ansatz müssen unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Von allen verwendeten Nährmedien sind Positiv- und Negativkontrollen mitzuführen. Die zu entnehmenden Proben sind in der Reihenfolge der Entnahme in Tab. 1 aufgelistet.

Vor der Sektion wird eine gründliche äußere Inspektion des Tieres durchgeführt. Während der Sektion und Probenentnahme werden alle makroskopisch sichtbaren morphologischen

Besonderheiten und pathologischen Veränderungen registriert. Nach der Entnahme aller Proben wird das gesamte Tier noch einmal gründlich auf morphologische und pathologische Veränderungen inspiziert.

Hinweis: Bei keimfreien Tieren ist das Caecum beträchtlich vergrößert und sein Inhalt relativ flüssig. Ein morphologisch normal erscheinendes Caecum ist ein Hinweis auf eine bakterielle Kontamination. Dagegen ist eine entzündliche Reaktion im Colon nicht zwingend kontaminationsbedingt. Sie kann auch durch im Futter vorhandene biologisch aktive Lipopolysaccharide aus der Zellwand abgetöteter gramnegativer Bakterien hervorgerufen sein.

Tabelle 1: Proben zur Ganztieruntersuchung

Nr.	Probe	Probenbearbeitung	Untersuchungsgang	Nachweis
1	Blut	Serumgewinnung	Antikörpernachweis	virale Infektionen, einige bakterielle Infektionen und Parasiten, Mykoplasmen
2	Fell	auf Sabouraud-Agar	Kultivierung bei 22-30°C mind. 10 Tage	Pilze
3	Lunge	in TGB*	Kultivierung bei 37°C 10 Tage, aerob	Bakterien, Pilze
		auf Sabouraud-Agar	Kultivierung bei 22-30°C mind. 10 Tage	Pilze
		DNA-Gewinnung	PCR	<i>Pneumocystis carinii</i> , CAR- Bacillus, <i>Streptobacillus moniliformis</i> , Mykoplasmen
4	Caecuminhalt, Coloninhalt, Kot	in TGB*	Kultivierung bei 37°C 10 Tage, aerob	Bakterien, Pilze
		auf Sabouraud-Agar	Kultivierung bei 26°C mind. 10 Tage	Pilze
		DNA-Gewinnung	PCR	Helicobacter spp.
		Ausstrichpräparat	nativ	Bakterien, Parasiten
			Gram-Färbung	Bakterien, Pilze

*Thioglycolat-Bouillon. Bei Anzeichen von Keimwachstum (Trübung, Gasbildung) werden die Proben wie unter "Wischproben" im Anhang beschrieben weiterbearbeitet.

3. Einzuschleusende Materialien

Bei der Sterilisation von Futter, Wasser, Einstreu usw. muss das Sterilisationsverfahren validiert sein. Dennoch ist es sinnvoll, insbesondere bei der Futtersterilisation jede Charge vor dem Einbringen in den Isolator zu kontrollieren. Eine Kontrolle kann direkt durch die Untersuchung einer Stichprobe auf Keimfreiheit oder indirekt durch die Untersuchung von Sporenstreifen, die zusammen mit dem jeweiligen Material autoklaviert wurden, erfolgen. Dabei ist entsprechend den Angaben zur Untersuchung der Wischproben vorzugehen. Weitere Überwachungsmöglichkeiten für den ordnungsgemäßen Ablauf des

Autoklaviervorganges (Temperatur- oder Druckfühler, Min/Max-Thermometer, Temperaturindikatoren mit Farbumschlag) sollten etabliert sein und zusammen mit den biologischen Tests vor der Verteilung der autoklavierten Materialien ausgewertet werden.

Anhang

Bearbeitung von Wischproben

Die aus dem Isolator ausgeschleusten Proben werden umgehend unter Beachtung der Regeln sterilen Arbeitens aliquotiert in Thioglycolat-Bouillon (TGB) bei 37°C und in SabouraudBouillon bei 22-30°C mindestens 10 Tage bebrütet. Ein TGB-Röhrchen wird mit einem Testkeim beimpft und als Positivkontrolle sowie ein ungeöffnetes Röhrchen derselben Nährmediumcharge als Negativkontrolle (ebenfalls bei 37°C) bebrütet. Die Röhrchen sind täglich zu kontrollieren. Beim Auftreten von Veränderungen des Mediums (Wolkenbildung, Bodensatz, Trübung, Gas, etc.) sind eine mikroskopische Prüfung auf Keimwachstum (GramPräparat) vorzunehmen sowie Ausstriche auf festen Nährböden anzulegen:

- Sabouraud-Agar: Bebrütung aerob, 22-30°C, 10 Tage
- Columbia-Blutagar: Bebrütung aerob, 37°C, 3 Tage
- Columbia-Blutagar: Bebrütung anaerob, 37°C, 7 Tage

Von diesen Nährböden ausgehend kann eine Differenzierung erfolgen.

Probenmaterial von Tieren

Das bei der Sektion ausgeschleuster Tiere oder direkt im Isolator entnommene und in verschlossenen Gefäßen ausgeschleuste Probenmaterial wird in Thioglycolat-Bouillon verbracht und zusammen mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle wie unter "Wischproben" beschrieben weiterbehandelt.

Achtung: Nicht alle Keime, die im Tier vorkommen können und/oder in Flüssigmedien anwachsen, sind auf festen Nährböden nachweisbar. Erscheint der Direktausstrich oder eine Primärkultur im mikroskopischen Präparat positiv, auf festen Nährböden ist jedoch kein Wachstum nachweisbar, sollte umgehend eine weitere Probe aus dem betroffenen Isolator untersucht werden.

Haftungsausschluss

Die Nutzung und Verwendung der Veröffentlichungen (Fachinformationen, Stellungnahmen, Hefte, Empfehlungen, u. ä.) der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS und die Umsetzung der darin enthaltenen Informationen und Inhalte erfolgt ausdrücklich auf eigenes Risiko der jeweiligen Nutzer*innen oder Verwender*innen.

Die GV-SOLAS und auch die Autor*innen können für etwaige Unfälle und Schäden jeder Art, die sich durch die Nutzung der Veröffentlichung ergeben, keine Haftung übernehmen.

Die GV-SOLAS übernimmt keine Haftung für Schäden jeglicher Art, die durch die Nutzung der Webseite und das Herunterladen der Vorlagen entstehen. Ebenfalls haftet die GV-SOLAS nicht für unmittelbare oder mittelbare Folgeschäden, Datenverlust, entgangenen Gewinn, System- oder Produktionsausfälle.

Haftungsansprüche gegen die GV-SOLAS und die Autor*innen für Schäden materieller oder ideeller Art, die durch die Nutzung oder Nichtnutzung der Informationen bzw. durch die Nutzung fehlerhafter und/oder unvollständiger Informationen verursacht wurden, sind grundsätzlich ausgeschlossen.

Schadenersatzansprüche sind daher sowohl gegen die Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS wie auch gegen die Autor*innen ausgeschlossen.

Die Werke inklusive aller Inhalte wurden unter größter wissenschaftlicher Sorgfalt erarbeitet. Gleichwohl übernehmen die GV-SOLAS und die Autor*innen keinerlei Gewähr und keine Haftung für die Aktualität, Korrektheit, Vollständigkeit und Qualität der bereitgestellten Informationen, ebenso nicht für Druckfehler.

Es kann keine juristische Verantwortung sowie Haftung in irgendeiner Form für fehlerhafte Angaben und daraus entstandene Folgen von der GV-SOLAS und den Autor*innen übernommen werden.

Für die Inhalte von den in diesen Veröffentlichungen abgedruckten Internetseiten sind überdies ausschließlich die Betreiber der jeweiligen Internetseiten verantwortlich.

Die GV-SOLAS und die Autor*innen haben keinen Einfluss auf Gestaltung und Inhalte fremder Internetseiten und distanzieren sich daher von allen fremden Inhalten.