

Het tot stand komen van de germfree faciliteit van de Centrale Dienst Proefdieren in Groningen

Jessica de Rover en Catriene Thuring

*Centrale Dienst Proefdieren, A. Deusinglaan 1, 9713AV, Groningen
j.de.rover@umcg.nl; c.m.a.thuring@umcg.nl*

De Centrale Dienst Proefdieren (CDP) is onderdeel van de Rijksuniversiteit Groningen en Universitair Medisch Centrum Groningen. De CDP faciliteert dierexperimenteel onderzoek geïnitieerd door onderzoeksgroepen vanuit de faculteit Medische Wetenschappen en vanuit Farmacie, onderdeel van de Faculteit Wiskunde en Natuurwetenschappen. Binnen de CDP worden studies uitgevoerd in verschillende typen huisvestingen onder verschillende microbiologische condities: conventionele huisvesting in open bakken, SPF en SOPF huisvesting in IVC kooien. De CDP faciliteert en beweegt mee met de behoeften van de onderzoekers. Zo kwam de vraag vanuit een onderzoeksgroep naar de mogelijkheid om studies aan proefdieren te doen onder germfree omstandigheden. In goed overleg met de vergunninghouder en onderzoekers, zijn we gestart met het opzetten van een germfree faciliteit binnen de CDP. Samenwerking met onze collega's van het Centraal Dierenlaboratorium Nijmegen (CDL) was hierbij onontbeerlijk. In dit artikel geven we uitleg over wat 'germfree' inhoudt en beschrijven we hoe we tot realisatie van de germfree faciliteit zijn gekomen (afb. 1).



Afbeelding 1: Afbeelding van de germfree ruimte.



Afbeelding 2:
Muizen in
Isolator.

Afbeelding 3:
Invoercontainer
gevuld.

Wat is germfree?

Zoogdieren dragen vanaf de geboorte verschillende micro-organismen in zich en bij zich. Germfree dieren hebben deze micro-organismen niet. Germfree betekent letterlijk kiemvrij. Om de germfree status te behouden, moeten germfree dieren continu in isolatoren gehuisvest worden om te voorkomen dat ze in contact komen met bacteriën, virussen of parasieten uit de omgeving (afb. 2). Door de afwezigheid van micro-organismen zijn germfree dieren geschikt voor het verkrijgen van antwoorden op vraagstellingen waarbij zorgvuldige controle van het microbiologisch milieu gewenst is. Door één bepaald micro-organisme toe te dienen, bijvoorbeeld oraal of door de bron in de kooi te plaatsen kan een onderzoeker deze bestuderen zonder dat er enige invloeden van andere micro-organismen aanwezig zijn. Als een micro-organisme is toegediend zal het dier niet meer germfree zijn maar een gnotobiont. Een gnotobiont is een dier waarvan precies bekend is welke micro-organismen aanwezig zijn.

Hoe worden dieren germfree gemaakt?

In feite zijn alle zoogdieren in de fase dat ze in de baarmoeder zijn germfree. Germfree dieren kun je dus verkrijgen door ze op steriele wijze uit de baarmoeder te halen (via hysterectomie) en ze daarna niet bloot te stellen aan micro-organismen uit de omgeving. De hysterectomie wordt uitgevoerd op drachtige moeders die niet germfree zijn. De hysterectomie houdt in dat de baarmoeder (uterus) van een drachtige vrouw in zijn geheel wordt uitgenomen (ectomie) met daarin de volgroeide pups. De baarmoeder wordt in zijn geheel overgebracht naar een isolator die germfree is bevonden. Dit wordt gedaan via een dompelbad met een desinfectans. De pups worden in de isolator uit de baarmoeder gehaald en bij een foster moeder gelegd tot de speenleeftijd.

Germfree huisvesting

Om dieren germfree te houden worden ze gehuisvest in een luchtdichte isolator met een speciaal HEPA filter dat er voor zorgt dat er geen micro-organismen de isolator in komen. De isolator dient van tevoren volledig steriel te zijn voordat de germfree dieren worden ingevoerd. Steriel maken kan via het behandelen van materialen met verneveld perazijnzuur of via autoclaveren (hitte). De voorkeur gaat uit naar autoclaveren omdat deze procedure meer zekerheid biedt dan de per-azijnzuur methode. Veel materialen kunnen geautoclaveerd worden, maar niet alle materialen. Voorbeelden van materialen die niet geautoclaveerd kunnen worden zijn: bestraald dieet voer vanwege verlies aan voedingswaarde en gevulde waterflessen vanwege het feit dat deze niet in de autoclaaf invoercontainer passen (afb. 3).

Door goede ervaringen in het verleden met Metall und Plastik isolatoren (www.Optima-packaging-group.de; afb. 4) hebben wij deze gekozen om de eerste germfree muizen in te huisvesten. Deze isolator wordt op een tafel bevestigd en als een ballon opgeblazen. De isolator heeft een luchttoevoer en werkt zonder elektriciteit. Via een HEPA filter wordt steriele lucht in de isolator geblazen en via een glycerolslot wordt vuile lucht uitgeblazen. Aan de isolator is een sluis bevestigd voor invoer en uitvoer van dieren en materialen. De isolator heeft één paar handschoenen. Wij houden als maximale bezetting van deze isolator dertien type 1L Tecniplast (www.tecniplast.it) kooien aan. De kooien worden op de bodem geplaatst in twee rijen achter elkaar. Vanwege de beperkte ruimte binnen de isolator hebben wij ervoor gekozen deze alleen voor experimentele groepen te gebruiken en niet voor de fok.

Bij het CDL Nijmegen zagen we nieuwe type isolatoren staan van het merk Bell (www.Bell-isolation-systems.com; afb. 5). De Nijmeegse collega's hadden al ruimschoots ervaring met deze isolatoren opgedaan en waren er enthousiast over. Wij besloten om onze unit uit te breiden met dit type isolatoren. Kenmerken van de Bell isolatoren zijn:

- . de ballon hangt in een frame waardoor deze niet inzakt;
- . de isolatoren zijn voorzien van elektriciteit;
- . de lucht wordt via een pomp door een HEPA filter steriel in de isolator geblazen, en via een filter binnenin weer afgezogen. Er zit een accu onder de isolator die, in geval van een stroomstoring, de isolator draaiende kan houden gedurende ongeveer 24 uur.

Voordelen van deze isolator boven de Metall und Plastik isolator zijn: deze isolatoren worden compleet gemonteerd afgeleverd, je hoeft ze dus niet zelf op te bouwen. In deze isolator kan een rek worden geplaatst, zodat de isolator ruimte kan bieden aan vierentwintig kooien (type 1L Tecniplast). Deze isolator heeft twee paar handschoenen. Deze handschoenen kunnen eventueel vervangen worden terwijl de isolator in gebruik is.



Afbeelding 4: Metal und Plastik isolator.



Afbeelding 5: Bell isolator.



Afbeelding 6: Swabs, sporenstrips en cupjes.

Afbeelding 7: Transport sleeve.



Microbiologische controles

Onafhankelijk van het feit welke isolator wordt gebruikt, het is uiteraard van belang om te weten of de germfree dieren nog werkelijk germfree zijn. Om te controleren of er eventuele besmettingen in de isolatoren zijn hebben we in het begin wekelijks microbiologische controles uitgevoerd in de nieuw opgebouwde isolatoren. De wekelijkse microbiologische controle houdt in dat getest wordt op aanwezigheid van bacteriën. Nadat een isolator drie maanden in gebruik is geweest en wekelijks germfree is bevonden, hebben we de screeningsfrequentie omlaag gebracht naar eens per twee weken. Voor het uitvoeren van de controles is verse faeces nodig. Door het hanteren van de dieren aan de staartbasis op een ruif, zullen ze zich na korte tijd vanzelf ontlasten en dit wordt opgevangen in een steriel cupje. Deze worden per cupje in kleine papieren zakjes gedaan en vervolgens allemaal dubbel verpakt in een grote papieren zak. Op alle zakken wordt de benodigde informatie geschreven (Kooinummers, datum en isolator nummer). De informatie op de zakken wordt met een autoclaveerbare grafiet potlood gedaan. We verzamelen verse faeces van drie verschillende kooien per isolator. De andere controles die we hebben uitgevoerd zijn: het nemen van swabs op diverse plekken in de isolator vóórdat er dieren ingevoerd worden en het gebruik van zogenaamde sporenstrips tussen het voer en het beddingmateriaal in de invoercilinder. Sporenstrips zijn stripjes papier of aluminiumfolie waarop een standaard hoeveelheid sporen van *Bacillus stearothermophilus* zijn aangebracht. Dit micro-organisme heeft de meest hitteresistente sporen die bekend zijn. Worden deze gedood dan is het zeker dat ook alle andere sporen gedood zijn (afb. 6).

Verzorging

Wat maakt verzorging van germfree dieren anders dan van 'gewone' dieren? De verzorging en het werken in de isolatoren wordt met voorzichtigheid en vele controles gedaan. Lekkages en verkeerd handelen bij invoeren of uitvoeren van materialen kunnen direct gevolgen hebben voor de status van de dieren. Alles moet in het werk gesteld worden om te voorkomen dat micro-organismen kunnen binnendringen en zo de dieren besmetten. Als er een besmetting is geconstateerd zal de muizenkolonie van de desbetreffende isolator afgevoerd moeten worden. Om te voorkomen dat je de gewenste germfree lijn compleet kwijt raakt is het verstandig om een back-up aan te houden in een separate isolator. Hierdoor kan je direct de foklijn of het onderzoek opnieuw opstarten bij uitval van een kolonie.

Tot stand komen van de CDP germfree faciliteit

Binnen de CDP hebben wij een projectgroep gevormd voor het opzetten van de germfree faciliteit. Deze bestaat uit het hoofd van de CDP, proefdierdeskundigen, microbioloog, fokcoördina-

tor en de betreffende diervorzorgers/biotechnici. Voor het opzetten van de faciliteit zijn we naar het CDL Nijmegen gegaan om te kijken en te leren hoe daar de germfree unit is opgezet. Aan de hand hiervan zijn we begonnen met het schrijven van ISO – werkinstructies. Deze werkinstructies hebben we afgerond voordat de eerste germfree dieren binnen kwamen.

Opstarten en eerste ervaringen

Binnen de germfree unit beschikten we al over de theoretische kennis voor het faciliteren van de germfree dieren, maar hadden dit nog niet in de praktijk toegepast. Nadat we hands-on ervaring hadden opgedaan in Nijmegen zijn we begonnen met een proeffase. Hiervoor hebben wij twee Metall and Plastik isolatoren opgebouwd en opgeblazen met perslucht en perazijnzuur. Deze zijn drie dagen blijven staan en toonden geen lekkages. De isolatoren konden aangesloten worden op perslucht voor een continue luchtdoorstroming. Na 48 uur hebben we swabs afgenomen binnen in de isolatoren. Deze namen we op verschillende plekken af, zoals in de hoeken en op de randen. De swabs zijn naar de afdeling Medische Microbiologie van het UMCG gebracht en getest. Na een week hadden we de uitslagen terug, er was geen groei aanwezig van micro-organismen in de isolatoren. De isolatoren waren gereed om dieren te ontvangen.

Voor onze proeffase hadden wij tien germfree Swiss BALB/cJ muizen bij Nijmegen besteld. Deze zijn naar Groningen vervoerd in een transportsleeve (afb. 7). In deze sleeve kunnen de dieren germfree worden vervoerd in een compartiment met filter waar de kooien in geplaatst worden. Deze wordt van te voren opgeblazen met perazijnzuur en aangesloten op de isolator waar de muizen uit worden gehaald voor transport. Bij aankomst werd de sleeve aangesloten aan de ontvangende isolator. Met perazijnzuur werd het compartiment zonder de dieren opgeblazen. De dieren werden na 30 minuten inwerkingstijd van het perazijnzuur uit de sleeve gehaald via de binnenkant van de isolator en in de kooien overgezet.

Na het overzetten hebben we verse faeces afgenomen voor de eerste microbiologische controle van de dieren. De uitslag hiervan was: geen groei, wat voor ons betekende dat de dieren voor levering germfree waren. De tweede controle hebben we een week later uitgevoerd, om zo te bepalen of tijdens het transport en het invoeren van de dieren contaminatie was opgetreden. Ook hiervan was de uitslag: geen groei. Met deze tien muizen zijn we een fok gestart zodat we de tijd hadden om de dieren goed te kunnen volgen en te kunnen wennen aan het werken in de isolatoren.

We trokken gezamenlijk de conclusie dat we klaar waren om muizen germfree te huisvesten, germfree te fokken en om germfree experimenten uit te voeren. Deze eerste germfree muizen hebben we getermineerd. De intussen ingediende onderzoeksplannen waren gebaseerd op een andere muizenstam.

Ten behoeve van het eerste onderzoeksproject, hebben we bovengenoemde procedure gevolgd om een germfree Black/6 lijn in te voeren in onze germfree unit. De eerste nesten werden geboren na ongeveer drie weken, maar helaas waren de nesten grotendeels dood geboren of dood gebeten. Dit was dus een grote tegenvaller. Om dit probleem op te lossen hebben wij het volgende geprobeerd. Bij het visueel waarnemen van de dracht bij de vrouwen hebben we de mannen apart gezet zodat de man de pups niet dood kon bijten. Ook hebben we de vrouwtjes met rust gelaten door niet dagelijks de kooien aan te raken om te kijken of er nieuwe nesten geboren waren, maar dit alleen met de schoonmaak te controleren. De nesten bleven hierdoor wel leven en na het spenen werden de mannen weer bij de vrouwen ingezet. Na drie maanden met deze lijn te hebben gewerkt waren de dieren nog steeds germfree en hadden we uiteindelijk goede fokresultaten.

Calamiteiten

De procedures voor het werken met germfree dieren moeten nauwgezet gevolgd worden. De materialen die gebruikt worden zijn kwetsbaar. Calamiteiten liggen dus op de loer. We hebben »

een werkinstructie opgesteld zodat de medewerkers kunnen opzoeken hoe in het geval van een calamiteit gehandeld moet worden.

Tot nu toe hebben wij één calamiteit gehad. Haarscheurtjes werden ontdekt tijdens de reguliere werkzaamheden tussen de vingers van een handschoen van onze Bell isolator. Dit gebeurde op een vrijdag. De procedure 'handschoen wisselen' was nog niet geoefend en dat lukte ook niet meer voor het weekend. Als noodoplossing hebben wij de mouw en de handschoen op twee plekken afgebonden en de beschadigde plekken in de handschoen afgeplakt. Pas maandag konden de handschoenen worden verwisseld via een speciale methode. De nieuwe handschoenen die steriel (via perazijnzuur) de isolator ingevoerd zijn, kunnen de oude handschoenen van binnenuit naar buiten drukken zonder dat er een open verbinding ontstaat met de buitenlucht. Onderdeel van het calamiteitenprotocol is dat de microbiologische controles via faeces meer frequent plaatsvinden. De uitslag hiervan bleek negatief en door dit voorval hebben wij besloten om de handschoenen voortaan een keer per week met talkpoeder aan de binnenkant van de handschoen te behandelen om uitdroging tegen te gaan, en standaard de handschoenen twee keer per jaar te verwisselen (afb. 8).

Ten slotte

Sinds begin 2015 draait de germfree faciliteit volop met germfree muizen. De fok met onze eerste lijn liep in het begin wat stroef, maar dat heeft zich goed hersteld. We krijgen de fokresultaten nu goed afgestemd op de vraag van de onderzoekers.

Tot dusver zijn 68 faeces samples ingestuurd voor microbiologische controle. De resultaten zijn tot nu toe steeds negatief geweest. Dit hopen wij natuurlijk ook zo te houden.

Voor de toekomst willen we door toenemende vraag vanuit onderzoekers gaan uitbreiden naar een tweede unit waar nog eens zes isolatoren geplaatst kunnen worden. Dan zal de germfree faciliteit in totaal twaalf isolatoren hebben staan voor fok en experimenten.

Verder staat in de planning om binnen de CDP zelf ook lijnen germfree te gaan maken. Hiermee voorkomen we dat germfree muizen via (langdurig) transport naar de CDP moeten komen, waarbij kans op besmetting bestaat. We hopen dat we de CDP germfree unit kunnen blijven continueren en onze expertise kunnen blijven uitbreiden. We vinden het een mooie uitdaging om gezonde germfree muizen te kunnen blijven fokken, huisvesten en verzorgen voor wetenschappelijk onderzoek.

Afbeelding 8: Handschoenen Bell isolator

Fotografie: Afbeelding 1-6 en 8: Magda Kwanten; Afbeelding 7: Mark Ruijtenbeek.

