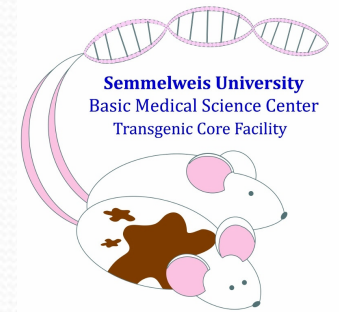


SPF transzgenikus állatház működtetése

Bényei Balázs

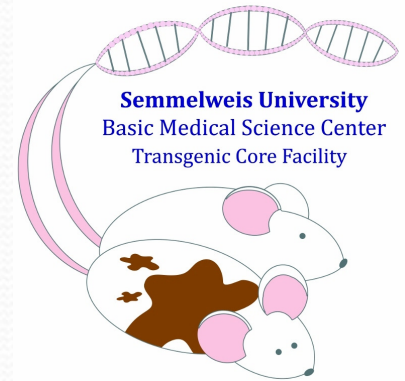


- Az állatház küldetése:
 - GM kolóniák fenntartása, kísérleti állatok előállítása;
 - Genetikailag nem módosított (vad típusú) kolóniák fenntartása, tenyésztése;
 - Kísérleti helyszín biztosítása.
 - Az állatokat védjük a környezeti ártalmaktól. Ennek megfelelően épül az állatház és kidolgozzuk a technológiát.

Állattechnológia

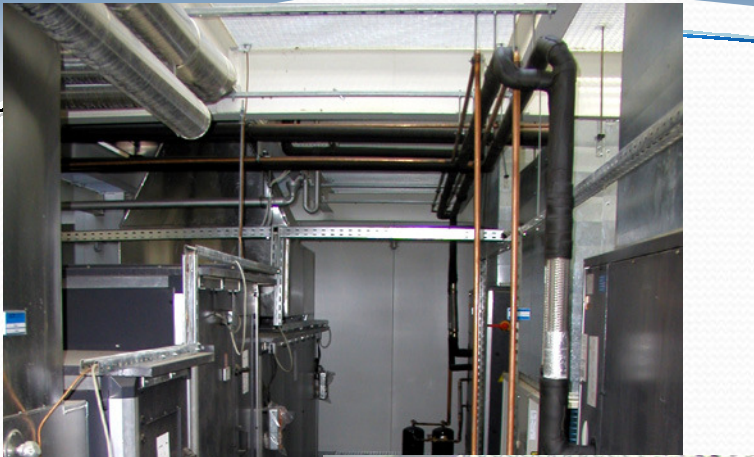
Modern állatházak:

- Légmentesen zárt, klimatizált. Légnyomás SPF: csökken a szoba – kültéri irányban, 5-10 pascal. Konvencionális: megfordítva. Állandó hőmérséklet, 20-22 fok. Szűrt levegő és víz.



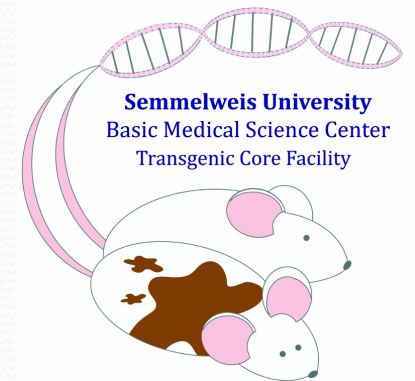








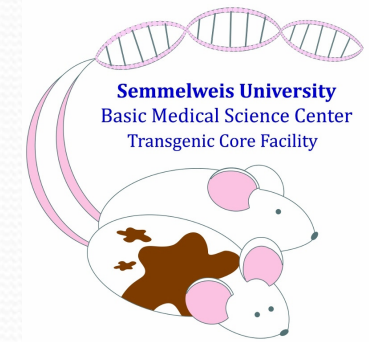
Menedzsment



Állatház vezető feladatai:

- Üzemeltetés (állatok beszerzése és ellátása; hulladék kezelés; épületgépészeti felügyelet; takarítás stb.)
- Humán erőforrás (munkaügy).
- Higiénia felügyelet

Menedzsment



Üzemeltetés:

- Állatok vásárlása: a felhasználó feladata, a megrendelőt a vezető szignálja.
- Táp beszerzése, hasznosítás szerint. Általános és GM tápok. Fogyasztás a Ts 10%-a. Ivóvíz biztosítása (10%).

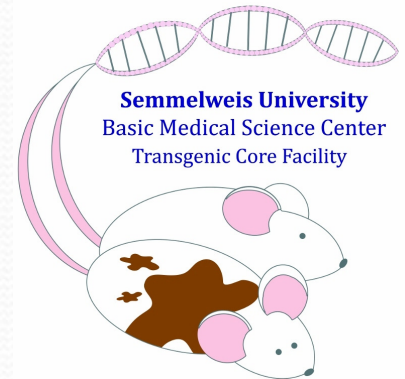
Hulladék kezelés:

- Nem veszélyes-hulladék (tenyésztési selejt, szennyezett alom). Veszélyes hulladék (kezelt állatok, éles-szűrő tárgyak).

Gépészeti felügyelet:

- Légtechnika (hőm. 18-22 fok, páratartalom 55% „farokgyűrűsödés”, légcseré 15x, légnyomás különbségek 10 pascal)
- Megvilágítás (fényciklus 12-12 óra, fényintenzitás 1000 lux mennyezetmagasságban)

Menedzsment

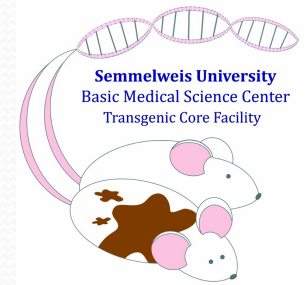


Humán erőforrás (munkaügy).

- Gondozói létszám: 3 fő higiéniai szintenként.
„Állattechnológusok”

Higiénia felügyelete:

- Higiénia rendszabályok kidolgozása
- Rendszeres mintavétel a státusz ellenőrzésére. Ld. később.

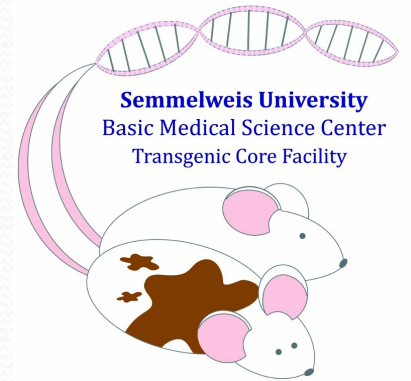


Higiéniai státusz: fertőző állatbetegségektől való mentességi állapot.

Az alacsonyabb higiéniai státuszú állatházak mellett üzemelő tiszta állatházi SPF státusz megőrzése a legnagyobb kihívás. Az állatházat a fertőző ágensek állandó „nyomás” alatt tartják. „kapu”

Szigorú higiéniai rendszabályokkal fenntartható.

Higiéniái státusz fenntartása

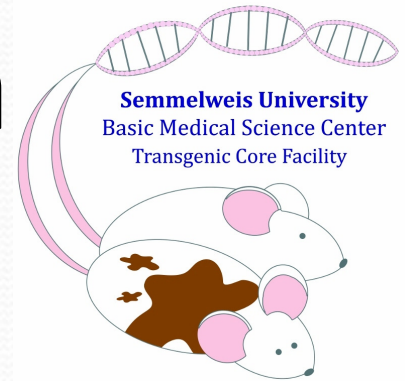


A higiéniai szintek elkülönítéséhez három, egymással nem közlekedő terület szükséges.

SPF – MD – konvencionális (befogadó).

Forgalom (állat és anyag) egyirányú

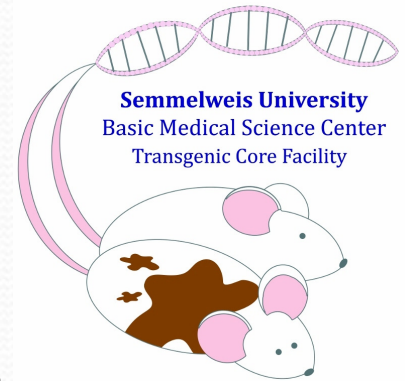
Állatházak higiéniája



Állatházak higiéniai szintjei:

- Konvencionális
- Ellenőrzött konvencionális
- Minimal Disease (MD)
- **Meghatározott kórokozóktól mentes (SPF)**
- Ismert kórokozóval fertőzött (gnotobiotic)
- Csíramentes (Germ free)

Állatházak higiénéiája



Miért SPF?

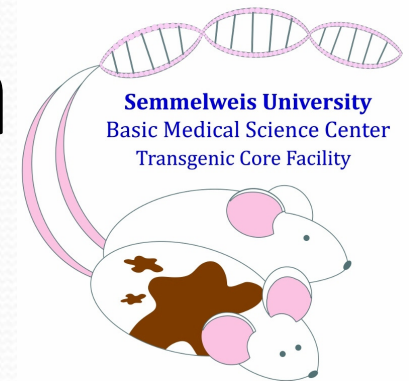
Publikáció – az állatkísérletek ismételhetősége

Feltételek: Standard (management), gen. háttér, kor, ivar és **higiéniai státusz**

Előnyök:

- A biológiai variancia ↓
- Fals eredmények lehetősége ↓

Állatházak higiénéiája



Zoonózisok:

- Rotavírus: gastroenteritis
- Ectromelia (Mouse poxvírus): bőrön himlőszerű tünetek
- Lymphocytás choriomeningitis vírus: influenzaszerű tünetek, később meningitisz lehet, paralízis és kóma
- Szalmonella: hasmenés és hasi fájdalom
- Hantavírus: láz, hányás, köhögés, izomfájdalmak, veseelégtelenség, borzongás, légúti tünetek (tüdőödéma), halálhoz vezethet
- Leptospira: fejfájás, borzongás, láz, vetelés, kiütések testszerte, halállal végződhet. Idült formában vesekárosodás.
- Streptobacillus moniliformis (ptk harapás): lázas tünetek, gyulladások, kiütések a végtagokon, artritisz.

Állatházak higiéniaja

Állatházi standardok: USA, Institute for Laboratory Animal Research (ILAR)

TABLE 6.1 Typical "Core" Agents Monitored in Research Facilities^a

Agent	Mice	Rats	Guinea Pigs	Hamsters
Kilham rat virus		+		
Minute virus of mice	+			
Mouse hepatitis virus	+			
<i>Mycoplasma pulmonis</i>		+		
Pneumonia virus of mice	+	+	+	+
Rotavirus	+			
Sendai virus	+	+	+ ^b	+ ^b
Sialodacryoadenitis virus (rat coronavirus)		+		
Simian virus 5			+ ^b	+ ^b
Theiler's murine encephalomyelitis virus	+			

^a"Core" agents for each species are indicated by plus signs.

^bInfection with related parainfluenza viruses can cause false-positive results of tests for Sendai virus and simian virus 5 (Parker et al., 1987).

Állatházak higiéniája

- Mouse hepatitis virus (MHV)
- Mouse parvovirus (MPV)
- Minute virus of mice (MVM)
- Reovirus-3 (Reo-3)
- Pneumonia virus of mice (PVM)
- Epizootic diarrhea of infant mice (EDIM)
- Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)
- Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)
- Ectromelia (mouse pox)
- Sendai virus
- Sialodacryoadenitis virus (SDAV)
- Rat parvoviruses
- *Mycoplasma pulmonis*
- Pinworms
- Fur mites
- *Helicobacter* spp. are excluded from selected animal rooms.



Állatházak higiénája

Állatházi standardok:

Kórboncatni és szövettani vizsgálat?

Bakteriológia?

Parazitológia?



Állatházak higiénája

Állatházi standardok:

Európa, Federation for Laboratory Animal Science Associations
(FELASA)

- Ajánlások: higiéniai státusz ellenőrzése, standard továbbképzési javaslat (B és C).
- „C” bizonyítvány nélkül állatkísérletet folytatni nem szabad.

Időszakos higiéniai vizsgálatok (negyedéves és féléves, 6 hetes)

- Minta száma > 10 állat (sentinel)
- Viroológia, bakteriológia, parazitológia és kórbonctan/kórszövettan
- Költsége: kb. 40 ezer Ft/állat

Sentinel fogalma: „őrszem”. Biztosan SPF státuszú egyed, melyet fáradt almon tartanak.

Állatházak higiénája

Sentinel kritériumok

Kora: 8-12 hét, 6-12 hétig „fertőzik”

Ivara: nőstény (egy dobozban 2-3 db, pozitív esetben kontrollként)

Törzs: Balb/c, CD₁ vagy NMRI.

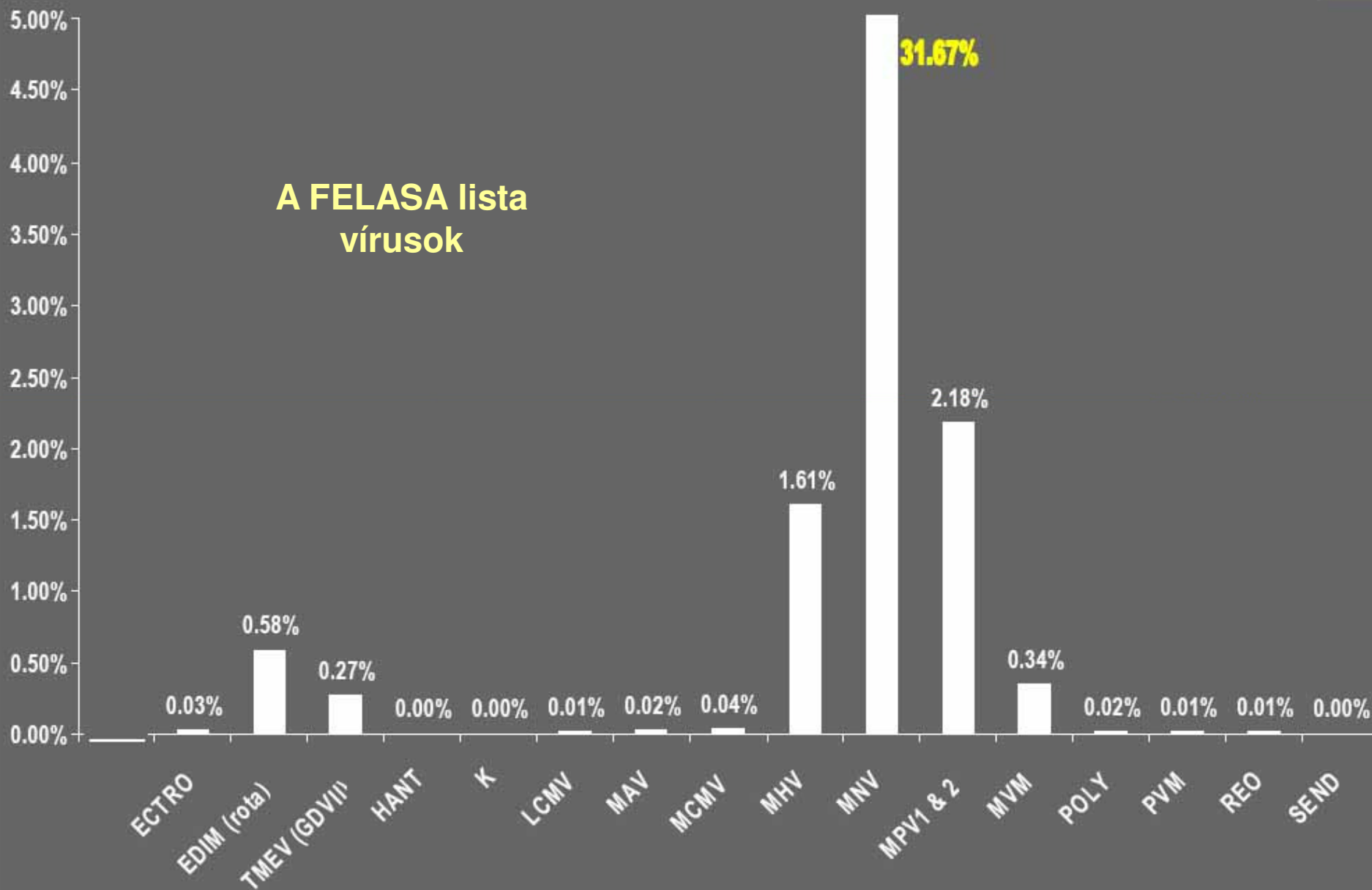
Elhelyezése: állványonként 2 doboz, az alsó sorban. IVC állványon többet.

Korlát: Egyes fertőzések átvitele bizonytalan (pl. MPV, Helicobacter).

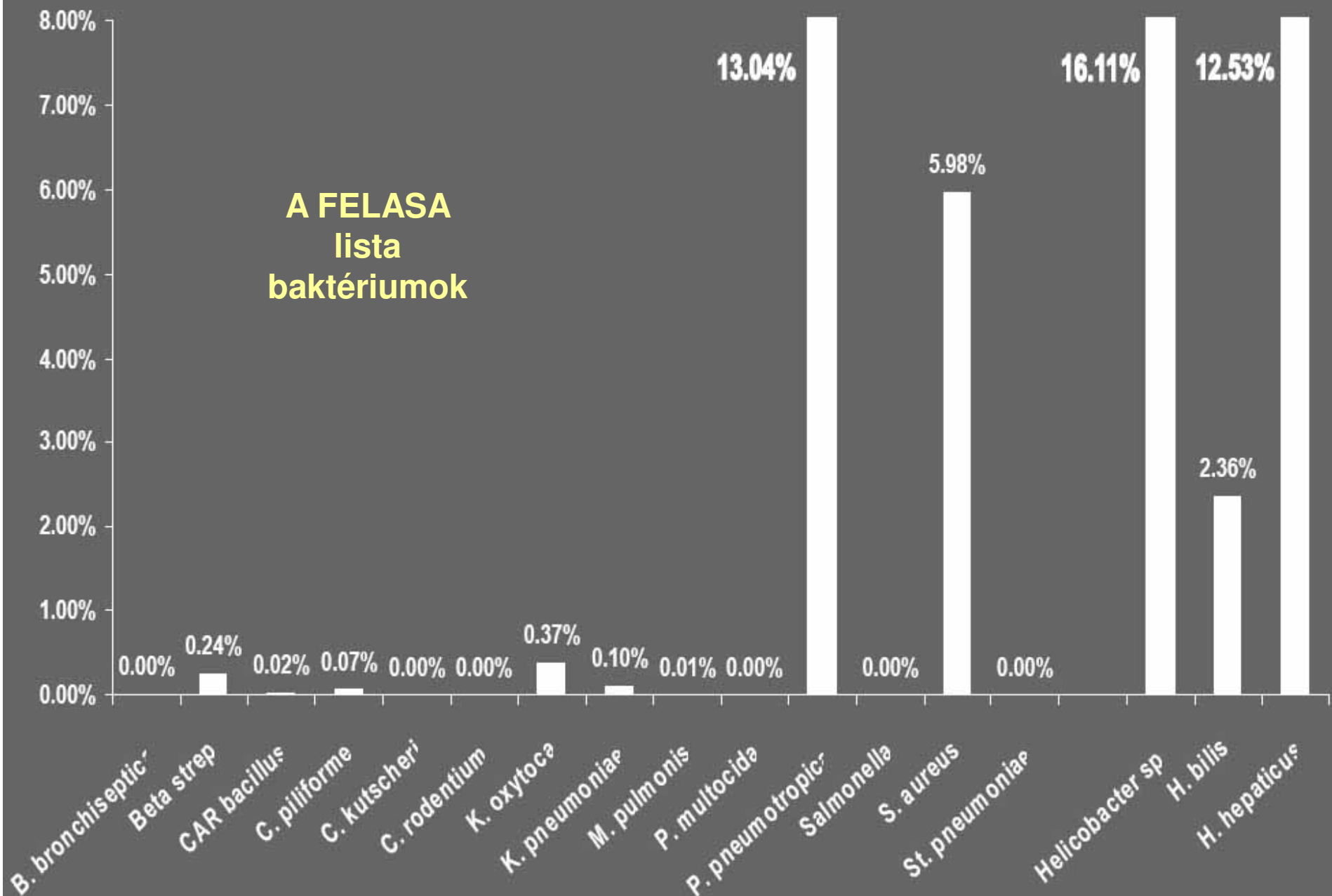
Állatházak higiénéiája

- MPV felismerésére:
 - Inbred vonalak (pl. C57Bl/6) rezisztensek
 - 12 hetes kor felett nem fertőződik meg
 - Ketrektársak fertőzése nem 100%-os.
- MNV felismerésére:
 - A vírus jelenléte egyes vonalakban (CD1, C57Bl/6 stb.) szerológiailag nem mutatható ki.
 - Használt alommal nem fertőz 100%-ban.
- Helicobacter felismerésére:
 - Sentinel transzmisszió nem 100%-os

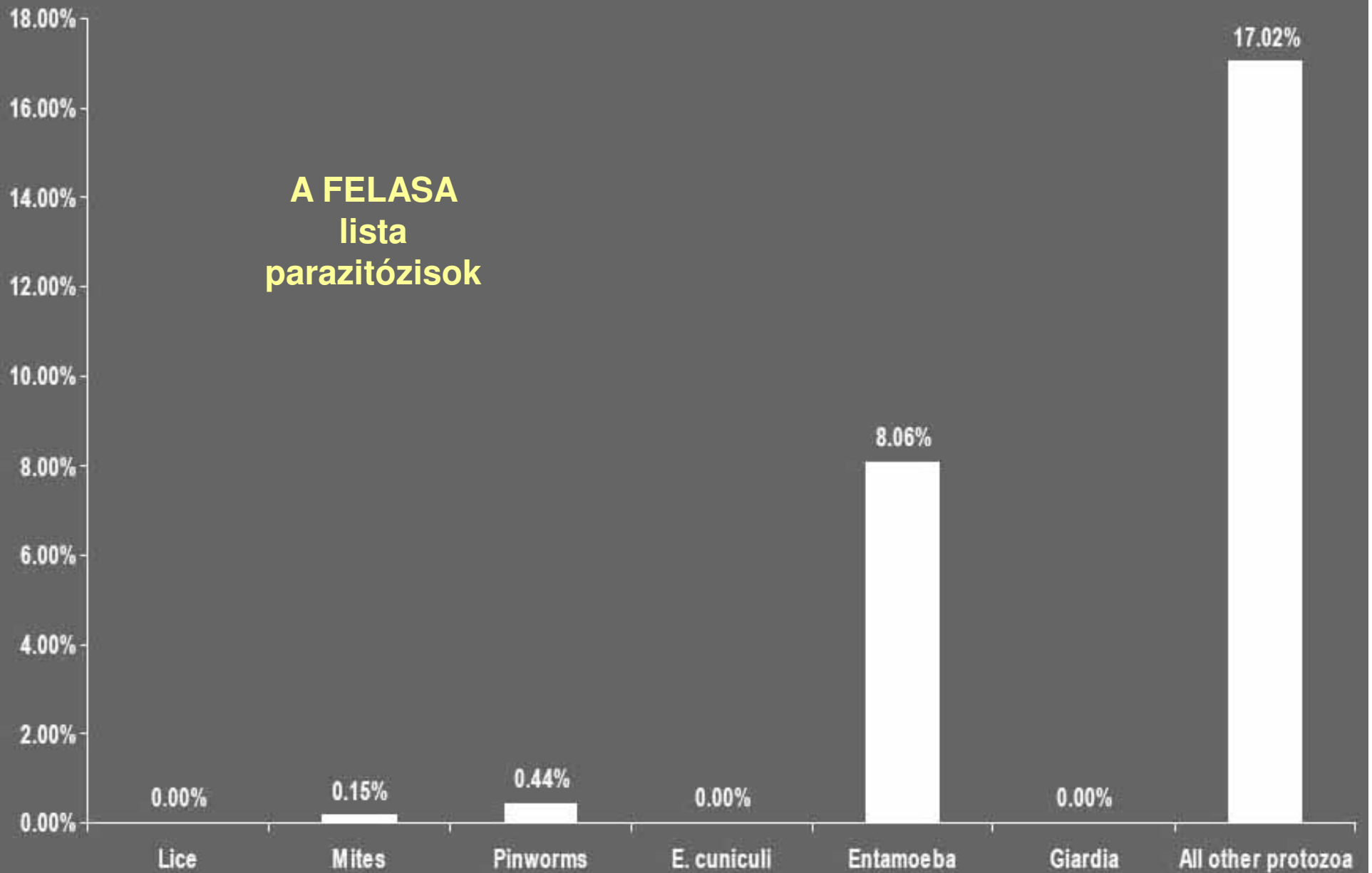
A FELASA lista vírusok



A FELASA lista baktériumok



**A FELASA
lista
parazitózisok**



Állatházak higiénája

A FELASA korlátjai:

- Európai standard
- Az ajánlás frissítésre szorul (MNV)

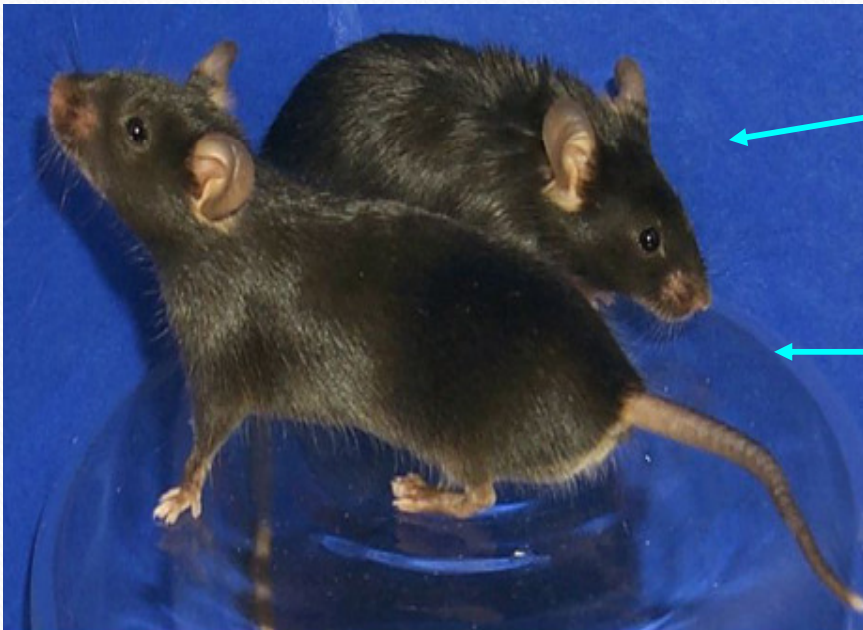
Vizsgálóintézet korlátjai:

- Vizsgálati módszerek (ELISA és IFA)
- Helicobacter (immunohisztokémia és PCR)

Bizonyítvány korlátjai:

- Humán tényezők (megbízható bizonyítvány? SPF eltérő értelmezése)

Higiéniai státusz fenntartása



Transzgenikus

Alomtestvér, nem
transzgenikus

Higiéniai státusz fenntartása



Egyszeres



Kétszeres



Háromszoros

Transzgenikus egér



Higiéniai státusz fenntartása

„egészséges” állat



Klinikai tünetet nem tapasztalunk.

Vizsgálóintézeti diagnosztika

Fertőzött (\neq beteg)

MHV

Helicobacter

Fonálféreg

Beteg állat



Higiéniái státusz fenntartása

- A törzs tenyésztés és fenntartás az SPF térben történik.
- A MD szinten is SPF állatok kerülnek elhelyezésre, itt használják fel.
- A konvencionális térbe érkeznek a GM állatok majd rederiválás útján jutnak az SPF térbe

Higiéniái státusz fenntartása

A fertőzés bejutásának lehetséges módozatai:

1. Állatokkal
2. Személyekkel
3. Tárgyakkal
4. Biológiai anyaggal
5. (külvilágból állatokkal)

Higiéniái státusz fenntartása

Barrier sáv:

Tárgyak, anyagok

- Autokláv
- Fertőtlenítő kamra
- Átadóablak

Személyi forgalom

- fekete/fehér öltöző vagy légzuhany



2004 4 7

Fertőtlenítő kamra

-Formalin

-Hidrogén peroxid



2004 4 7



Higiéniái státusz fenntartása

Állatimport:

- Trusted vendor
- A szállítódobozból mintavétel: vér és bélsár
- Karantén (az eredmény érkezéséig)
- GM vonalak csak rederiválás útján.
- (Kutatói együttműködés – megbízható?)

USA, egyetem

Japán, kutatóintézet

Anglia, egyetem

Anglia, vendor

Németország, kutatóintézet

USA, egyetem

USA, egyetem

Franciaország, kutatóintézet

Ausztria, egyetem

Németország, kutatóintézet

Franciaország, kutatóintézet

Franciaország, kutatóintézet

Franciaország, kutatóintézet

Németország, egyetem

Franciaország, kutatóintézet

USA, egyetem

Anglia, vendor

USA, egyetem

Németország, kutatóintézet

USA, egyetem

USA, egyetem

MVM, Parvo NS-1, MNV,

Clostridium piliforme, Syphacia ssp.

Staphylococcus ssp.

Entamoeba, Tritrichomonas

Helicobacter, Protozoa

MPV

MPV, MVM, szóratka, MNV

Helicobacter, Staphylococcus, Entamoeba muris, Chilomastix,
Hexamastix

MHV,

Helicobacter, protozoa

NS1, Pasteurella haemolytica, Beta hem. Streptococcus,
Helicobacter

Chilomastix, Helicobacter

MHV, MMV, GD VII, rNS-1, Trichomonas, Spironucleus

Helicobacter, Trichomonas

Helicobacter, Chilomastix

Helicobacter, Chylomastix, MCMV, Pasteurella pneumotropica,
MNV,

Entamoeba, Tritrichomonas

Myobia musculi

Tritrichomonas muris (non listed in FELASA)

Helicobacter

MVM, MNV, protozoa, MPV,

Higiéniái státusz fenntartása

Személyi forgalom szabályai:

- Otthoni állattartási korlátok
- Az állatház nem állatkert (Kállai)
- Személyi jelenlét minimalizálása
- Karantén szabály
- Személyi higiénia (lábzsák, labor öltözet, állatházi öltözet, tusolás, légzuhany)
- Idegen kutatók jelenléte.

Higiéniai státusz fenntartása

SPF státusz elvesztésének következményei:

- Vad kolóniák – fertőtlenítés, újra telepítés
- GM kolóniáknál szinte megoldhatatlan (származási helytől függően)
- Anyagi veszteség vonalanként 2-50 millió Ft.
- Rivális kutató csoportok.

Állattechnológia

új fejlesztésű eszközök:

IVC állványrendszer

Ipari mosogatógép

Alomürítő berendezés

Drága

Állattechnológia

Egyedileg szellőztetett állványrendszer előnye

- Zárt tér, kényszerszellőzés (30-60 csere/óra)
- Önálló higiéniai egység
- Ammónia, CO₂ és nedvesség alacsonyabb
- Alomcsere gyakoriság (kétheti)
- Fertőzés nem terjed ketrecek között
- Kisebb zaj a ketrecekben, stress
- Személyzet és környezet kímélő (por, ammónia)
- Magasabb súlynövekedés és vízfogyasztás



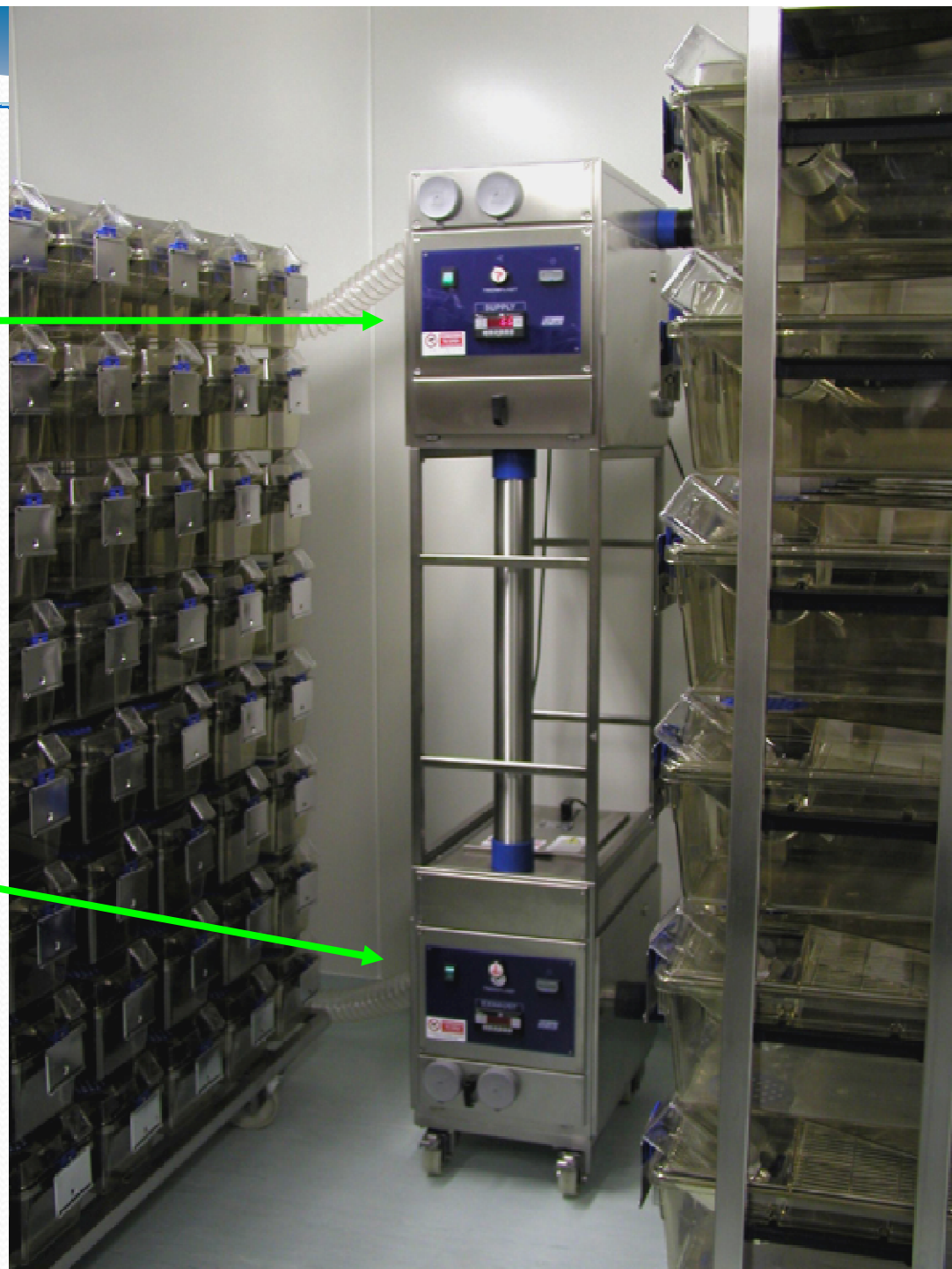
Szellőztető egység

Befúvó

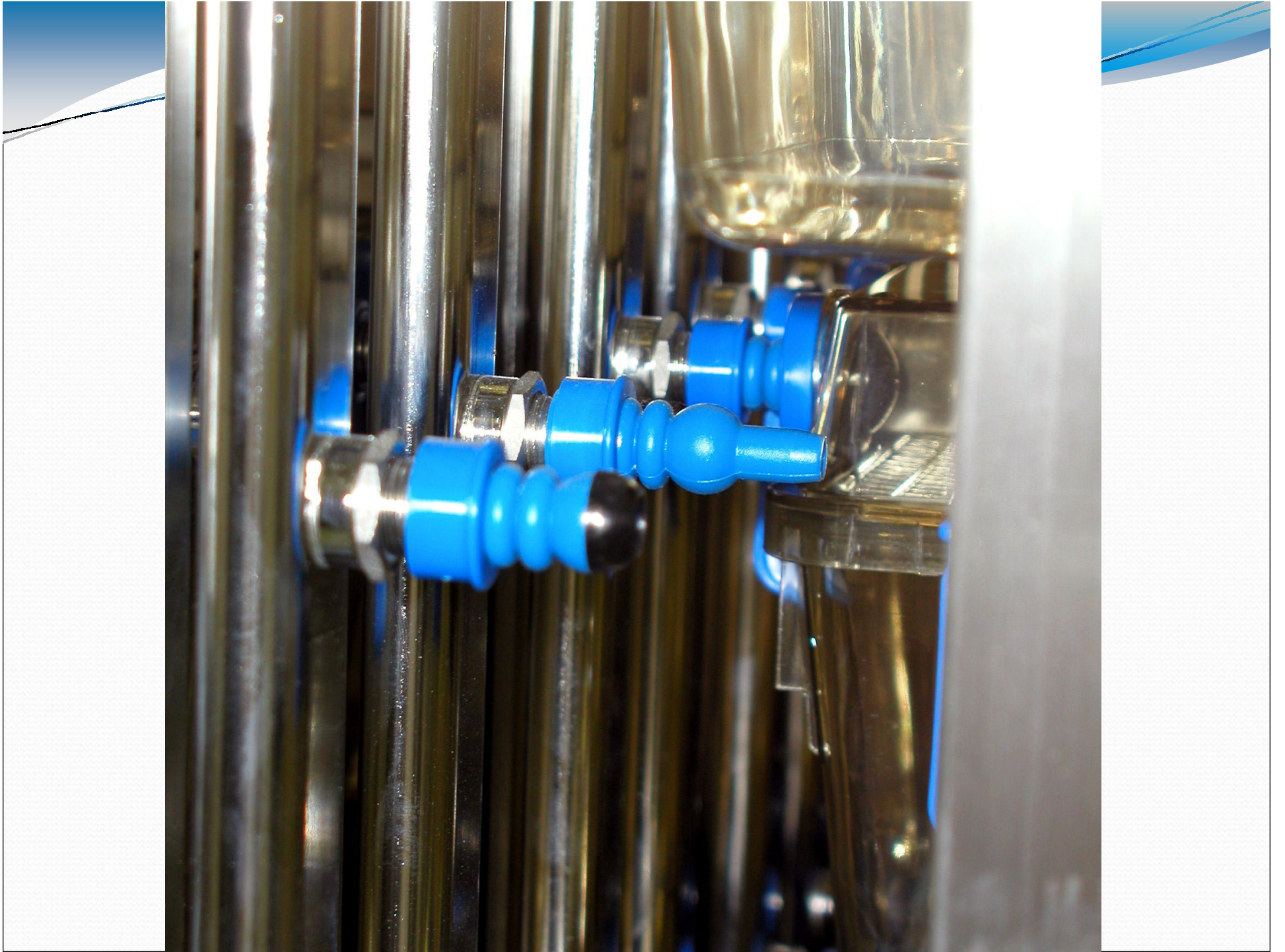
-Durva és Hepa filter

Elszívó

-Durva és HEPA filter









Állattechnológia

Ketrec csere lamináris
fülkében











2004 4 7

Alomürítő állomás





2004 4 7



2004 4 7



Super-dilac

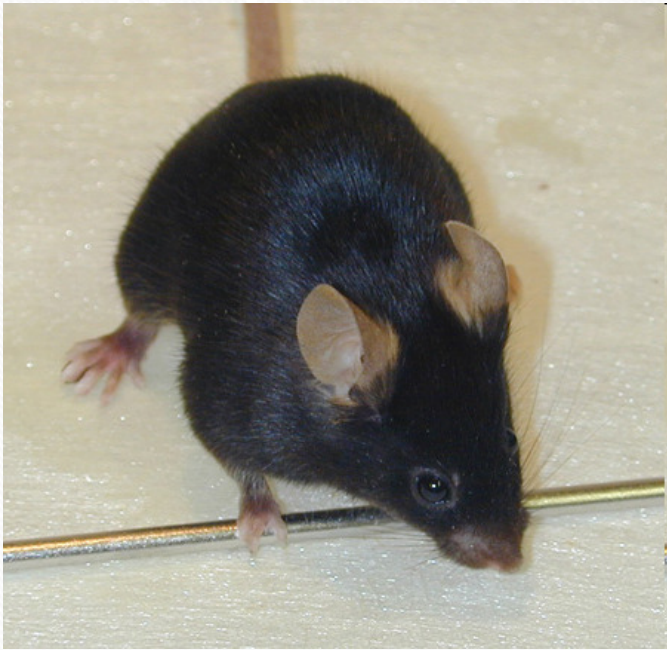








**PONTOS, NAPRAKÉSZ
NYILVÁNTARTÁS**



Ógja

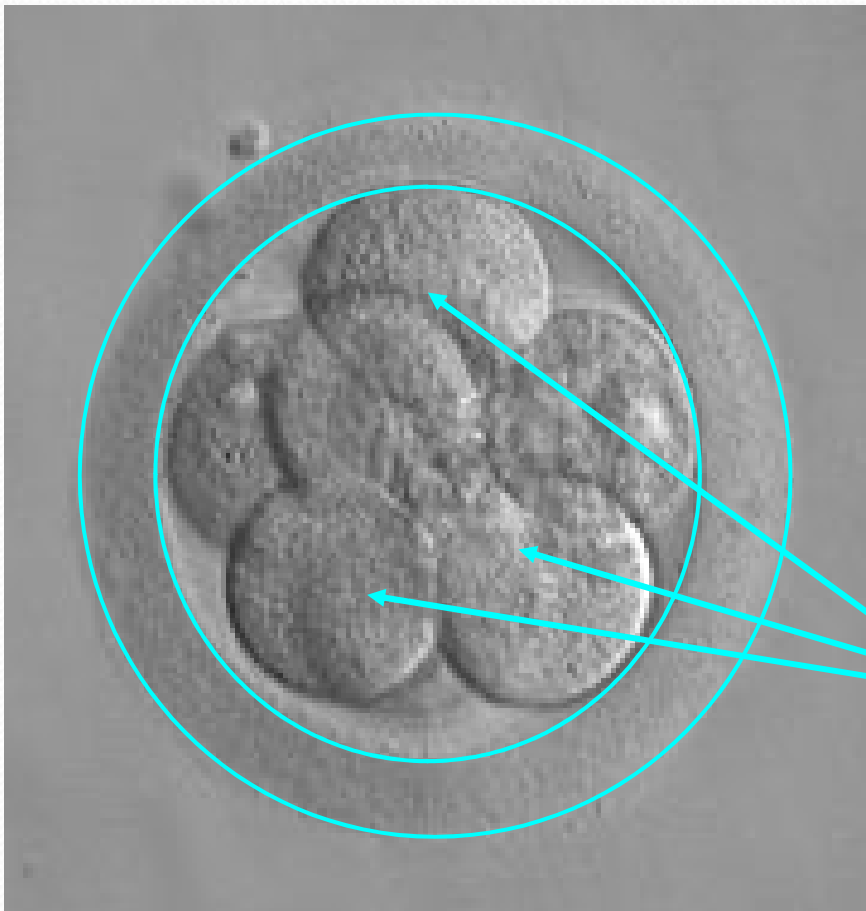
Alkalmazott táp. Élettani igények. GM és háttér interakció – reprodukciós problémák.

- Energiára evés, ad libitum, speciális tápok.

Alomanyag. Forgács, kukorica darálék. Fészekanyag.

Papír bújócső.

Az emlős embrió



Zona Pellucida – 4 féle glikoproteid

Szerepe: termékenyülés, fizikai és kémiai védelem

Vastagsága: 15-20 μ , fajtól függően

Blasztomérák

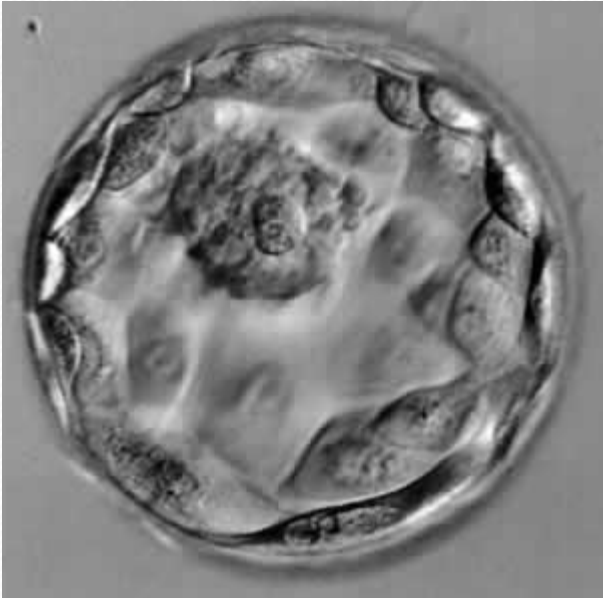
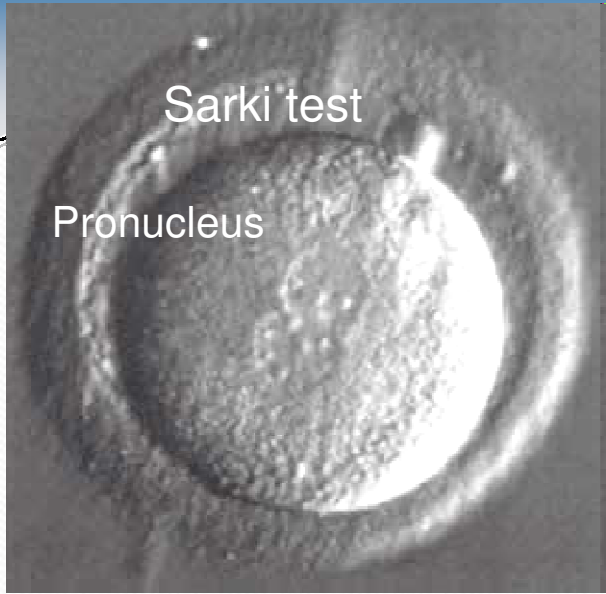
Embrió mérete: fajtól függően
80-160 μ

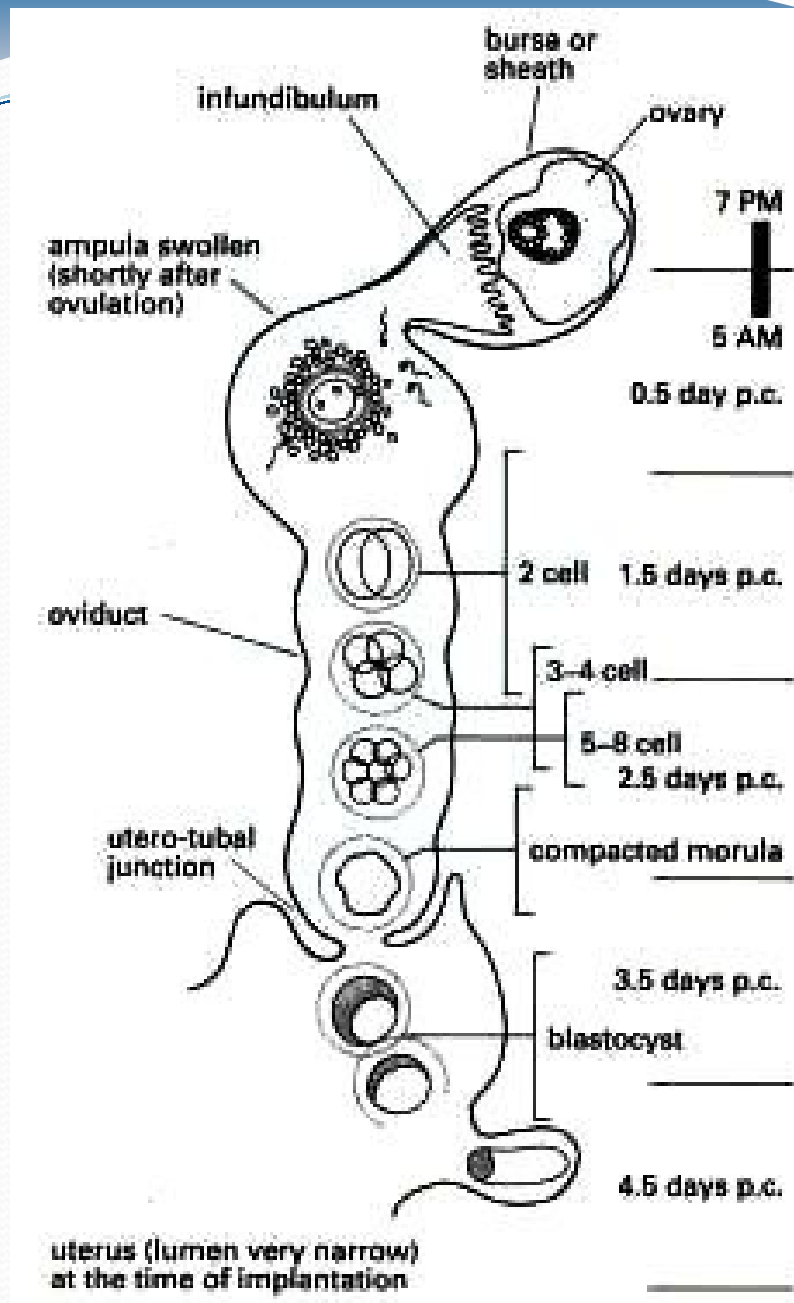
Embrió termelés

Embrió termelés fázisai:

- Donor nőstény és hím kiválasztása (genetikai és szapbiol szempontok)
- Donor nőstény szuperovuláltatása
 - 1- ciklus befolyásolása (PGF₂ α , progesztagén)
 - 2- tüszőérlelés indukálása (FSH, eCG/hCG)
 - 3- tüszőrepedés kiváltása (PGF₂ α , hCG)
- Termékenyítés (megtermékenyítés)
- Embrió kinyerése (ampulla, petevezető, méh)







Az egér embrió fejlődése a petevezetőben

Embrió mélyhűtés

Preimplantációs stádium (egysejtes – blasztociszta)
Tárolás LN₂-ben (-197 °C)

Előnyei:

- „steril”
- Állomány kipusztulása (betegség, tenyésztési hibák, „túlhasználás”)
- Állatházi havária (tűz, földrengés stb.)
- Beltenyésztett törzsek: „ősök” újraélesztése

Felhasználás:

- Génbank
- „Állat kereskedelem”

Hátránya:

„zsákbamaczka”

Embrió mélyhűtés

Alkalmazási területei:

- Humán (aspiráció és IVF, embrió és petesejt mélyhűtés)

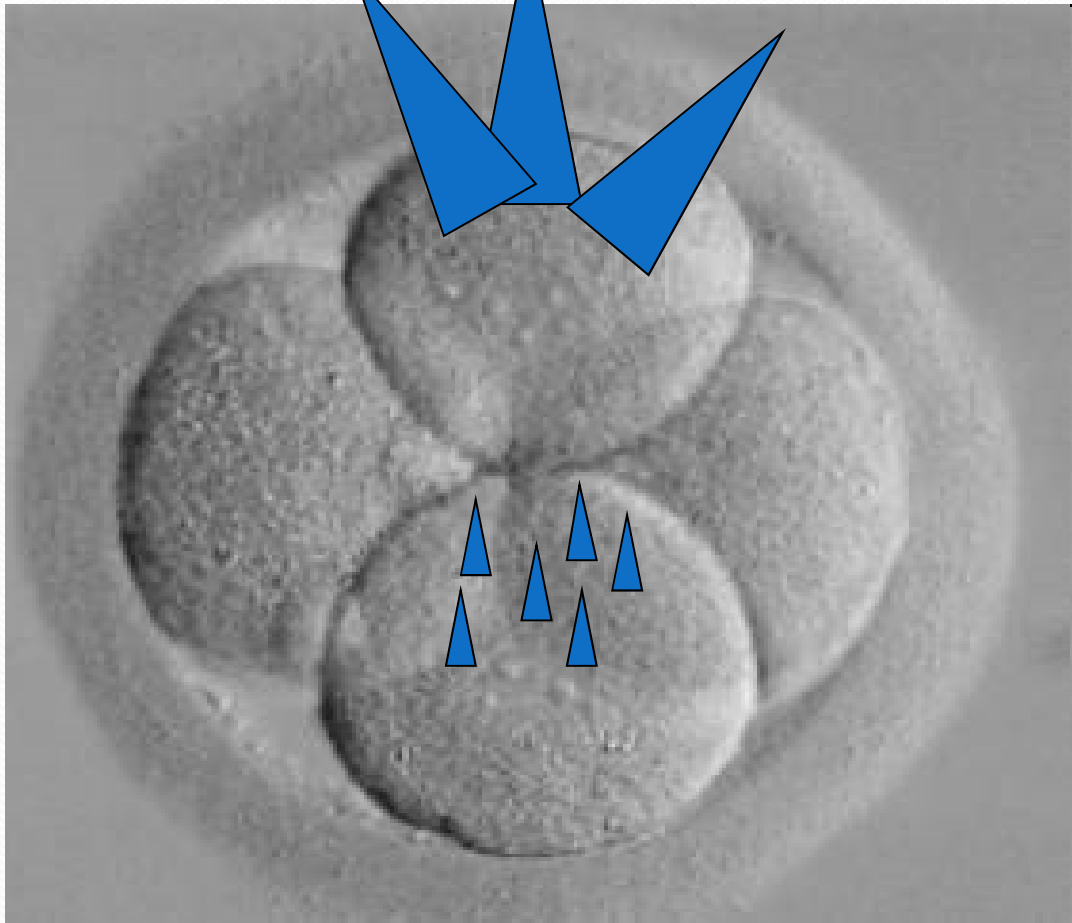
- Állat

Pet: macska, görény (kutya) alkalmatlan)

Gazdasági haszonállat: szmha, kiskérődzők (sertés)

Veszélyeztetett állatfajok

Embrió mélyhűtés



Makrokristály

Mikro kristály

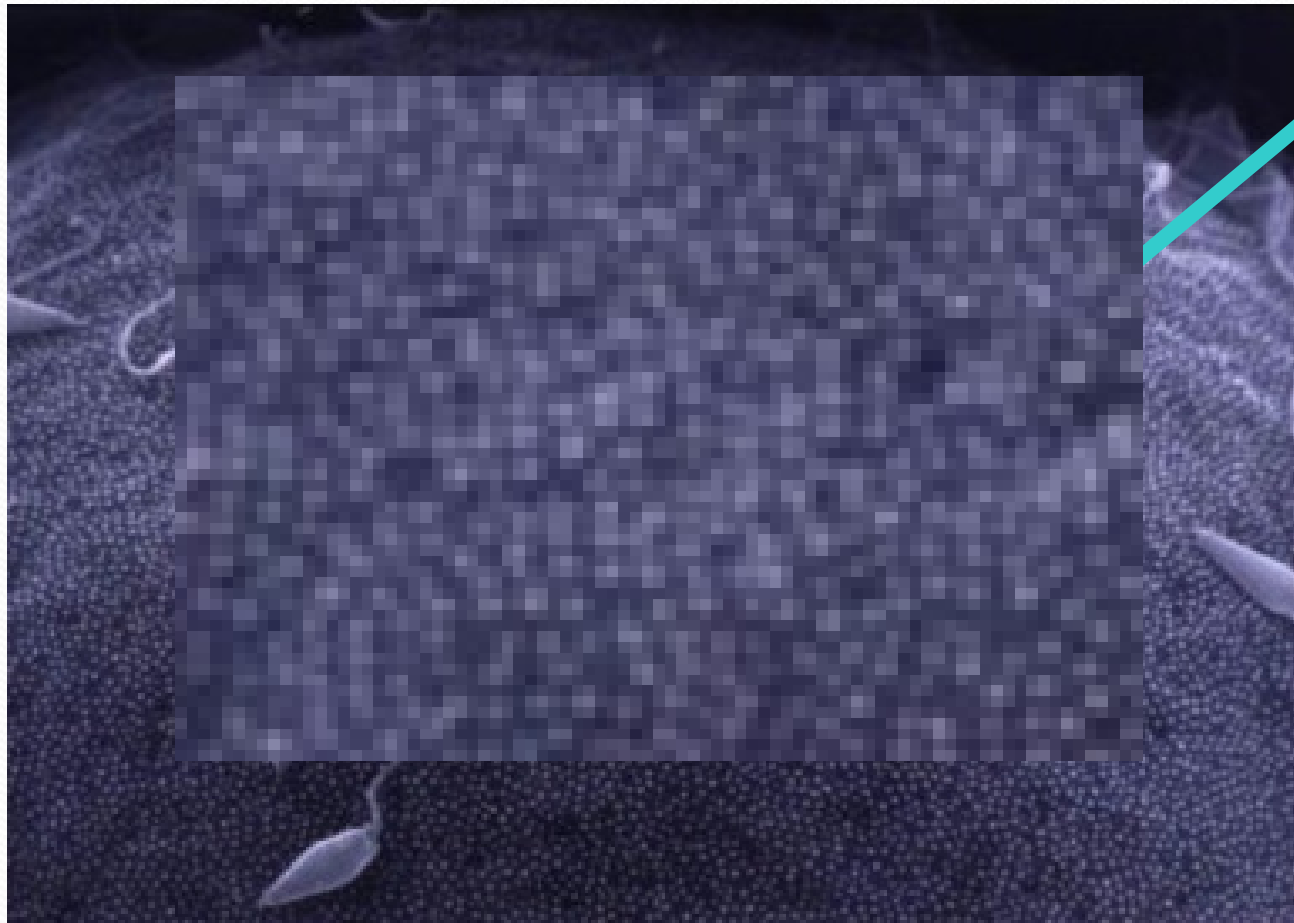
Embrió mélyhűtés



Mélyhűtésre való előkészítés:

- A mosófolyadékból tiszta folyadékba rakás (Dulbecco, M2, Zwitterion)
- Embrió válogatás (termékenyülés, elpusztult/élő sejtek aránya, ZP épsége)
- Tripszines kezelés (0,25% oldatban 60-90 sec)
- Tripszin hatásának felfüggesztése, tisztítás

Embrió mélyhűtés

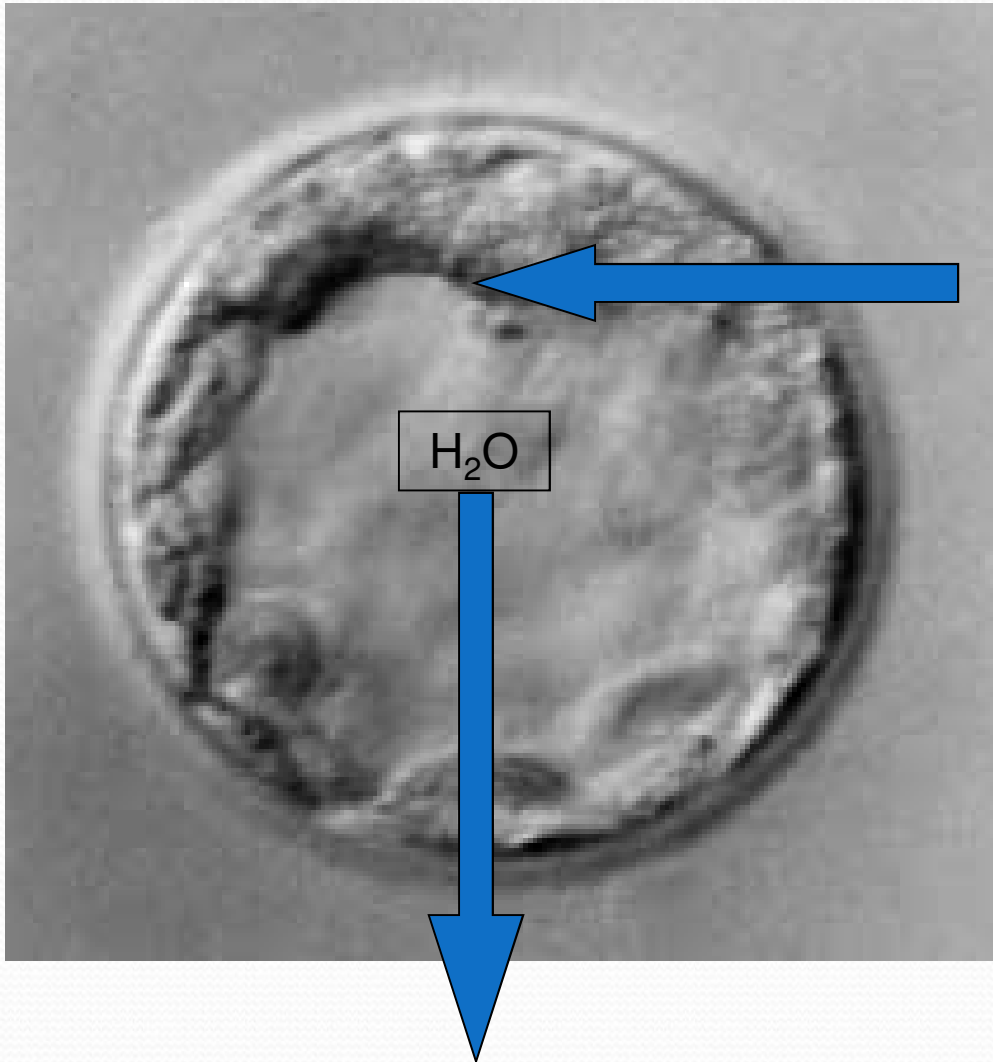


Pamutgombolyag
szerű felszín

Rücskös felület,
ahol kórokozók
tapadhatnak meg

A tripszin a felületi
réteget leemészt,
tükörsima lesz

Embrió mélyhűtés



Krioprotektív anyagok

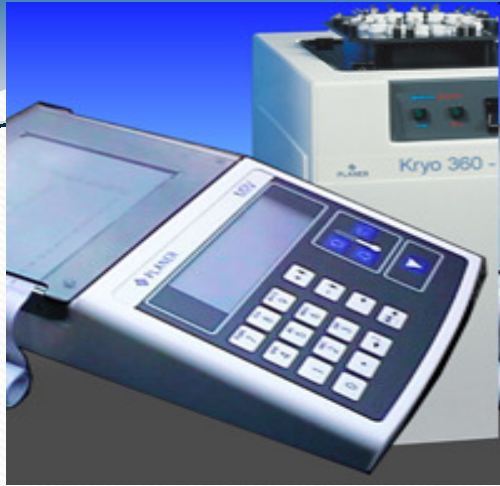
- Glicerín
- Etilén glikol (EG)
- Propilén glikol (PG)
- Dimetil szulfoxid (DMSO)
- Szaharóz (extraceluláris)

Elegyben

Oldat koncentrációk:

Gyors hűtés – 10%

Vitrifikáció – 40%



Embrió mélyhűtés

Gyors hűtés – PC vezérlésű alkohol/LN₂ közeggel hűtött kamrában vagy LN₂ tároló edénybe való lassú alámerítéssel.
Sebesség: -0,3 °C/perc, -30 °C-ig. Seeding -6 °C.

Vitrifikáció (szuper gyors hűtés) – üvegszerű amorf állapot, nincs kristály. Hőmérséklet és behatási idő. Közvetlenül LN₂-be márt.

Embrió mélyhűtés

Embrió tárolás:

- 20 embrió egység (egér)
- 0,25 ccm szalma, tubus
- Pontos jelölés, jegyzőkönyv
- Génbank céljára: 250-300 embrió
- Két, eltérő helyen levő konténerben



Embrió revitalizáció

Embrió „felolvasztás”

Cél: az embrió felébresztése, a krioprotektív anyagok kivonása.

- Air thawing (recept függő), meleg vízfürdő
- Szaharóz (ált. 1M, csökkenő koncentrációban) médiumban.
- Embrió alakváltozásai olvasztás közben (zsugorodik majd kitágul).