

## **7. Hygiene in Versuchstierhaltungen**

### **7.1 Bedeutung des mikrobiologischen Status von Versuchstieren**

Dem Hygieneniveau von Versuchstieren kommt eine herausragende Bedeutung zu, da interkurrente Infektionen, die während der Experimentalphase auftreten, die wissenschaftliche Aussagekraft der Tierversuche in erheblichem Umfang einschränken (Baker, 1998). Versuchstierkundliche Hygienedefizite sind tierschutzrechtlich relevant und widersprechen guter wissenschaftlicher Praxis. Hohe mikrobiologische Qualitätsniveaus können in der Regel nur in solchen Versuchstierhaltungen langfristig gehalten werden, die entsprechende bauliche Voraussetzungen (z.B. Sterilfiltration der Zuluft, Sterilisation der Käfigmaterialien in Durchfahrautoklaven, Personalschleusen) erfüllen und bei denen geeignete Hygieneregeln in konsequenter Weise befolgt werden. Bei der Planung von Versuchstierhaltungen muss berücksichtigt werden, dass das bauliche Konzept ganz maßgeblich über den Hygienestatus entscheidet.

### **7.2 Mikroflora von Versuchstieren**

Säugetiere sind physiologischerweise mit einer Vielzahl unterschiedlicher apathogener Mikroorganismen (mehrere 100 verschiedene Spezies, vorzugsweise Bakterien) besiedelt, die in ihrer Gesamtheit als autochthone Flora bezeichnet wird. Die autochthone Flora siedelt auf Haut und Schleimhäuten und macht einen signifikanten Anteil des Darminhaltes aus. Alle Vertreter der animalen autochthonen Flora sind nicht pathogen, d.h. diese Mikroorganismen können dem Trägartier keinen Schaden zufügen. Über die autochthone Flora hinaus können Versuchstiere aber ebenfalls mit solchen Mikroorganismen besiedelt sein, die obligatorisch oder bei entsprechender Gelegenheit wie z.B. einer Immunsuppression (opportunistische Erreger) Krankheiten verursachen können. Mikroorganismen, die in ihren Trägartieren Krankheiten induzieren können, werden als pathogen bezeichnet. Die mikrobiologische Standardisierung von Versuchstieren kann daraufhin abzielen, die gesamte autochthone Flora zu eliminieren oder kann lediglich das Ziel verfolgen, die jeweilige Palette Spezies-spezifischer pathogener Mikroorganismen zu kontrollieren (van Zutphen et al., 1995).

### **7.3 Versuchstierkundliche Hygieneniveaus**

Entsprechend der Unterscheidung in autochthone Flora und pathogene Mikroorganismen können bei Versuchstieren folgende Hygienestufen unterschieden werden (van Zutphen et al., 1995, Weiss et al., 2003):

- Gnotobiotische Tiere: Gnotobiotische Tiere tragen weder eine autochthone Flora noch pathogene Organismen. Bei gnotobiotischen Tieren, und nur bei solchen Tieren, kann von einer mikrobiologischen Standardisierung gesprochen werden.
- Spezifiziert Pathogen Freie (SPF) Tiere: Bei SPF-Tieren liegen keinerlei Informationen über die Zusammensetzung der komplexen autochthonen Flora vor. Aus diesem Grunde kann bei SPF-Tieren auch nicht von einer mikrobiologischen Standardisierung gesprochen werden. Von einem SPF-Hygienestatus wird dann gesprochen, wenn regelmäßig bestimmt wird, welche pathogenen Mikroorganismen die Versuchstiere tragen. Bei der überwiegenden Anzahl von Tierversuchen wird der Einsatz von SPF-Versuchstieren gefordert. Dabei ist anzumerken, dass SPF-Tiere in den wenigsten Fällen völlig frei von pathogenen Mikroorganismen sind; in diesem Sonderfall spricht man von einem spezifisch Pathogen-freien Hygienestatus. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle werden SPF-Tiere ein spezifiziert Pathogen-freies Hygieneniveau aufweisen sein, d.h. es ist genau bekannt, welche pathogenen Mikroorganismen vorhanden sind.
- Konventionelle Tiere: Bei konventionellen Tieren liegen weder Informationen über die autochthone Flora vor, noch ist bekannt, welche pathogenen Organismen die Tiere tragen.

#### **7.4 Gnotobiotische Tierhaltung**

Von einer gnotobiotischen Tierhaltung wird gesprochen, wenn die mikrobiologische, insbesondere die bakterielle, Besiedlung der Versuchstiere genau bekannt ist. Es werden keimfreie und assoziierte Gnotobioten unterschieden.

##### **Keimfreie Gnotobioten**

Gnotobiotische Tiere können einerseits völlig keimfrei sein. Keimfreie Gnotobioten hatten noch nie Kontakt mit einem viralen, bakteriellen oder parasitologischen Mikroorganismus, d.h. es fand noch nie eine Interaktion des Versuchstiers mit einer mikrobiologischen Lebensform oder einem Virus statt. Keimfreie Tiere weisen physiologische und anatomische Besonderheiten auf. So ist der Blinddarm (Caecum) deutlich vergrößert und die Darmwand verdünnt (hypotroph). Auch der Darminhalt zeigt eine besondere Konsistenz auf; er ist flüssiger und weicher und zeigt ein verändertes Redoxpotential im Vergleich zu nicht keimfreien Tieren. Die mit der Keimfreiheit verbundenen anatomischen und physiologischen Besonderheiten führen häufig zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen; insbesondere der vergrößerte Blinddarm führt zu einer deutlichen Verkürzung der Lebenserwartung keimfreier Tiere.

### **Assoziierte Gnotobioten**

Um die aufgeführten physiologischen und anatomischen Besonderheiten keimfreier Tiere zumindest teilweise auszugleichen, werden keimfreie Tiere häufig assoziiert. Dies bedeutet, dass die keimfreien Tiere mit einem qualitativ genau bekannten Bakterienspektrum besiedelt werden. Zur Assoziierung werden fakultativ oder obligat anaerobe Mikroorganismen (z.B. Laktobazillen oder Sporenbildner) eingesetzt. Die Flora, die zur Assoziierung eingesetzt wird, umfasst in der Regel nur wenige Bakterienspezies. Bei Assoziierung der Versuchstiere mit 1 bzw. 2 bzw. 3 Bakterienspezies spricht man von mono-, di- oder tri-assozierten Tieren. Zum Teil werden jedoch auch sehr komplexe aus ca. 10 Bakterienspezies zusammengesetzte Bakterienfloren (z.B. Schaedlerflora, Wensinck-Flora) zur Assoziierung eingesetzt. Solche komplexen Floren sind in der Lage, eine Besiedelung der Tiere mit weiteren Bakterienspezies in gewissem Umfang zu verhindern. Man bezeichnet sie deshalb auch als „colonization resistant flora (CRF)“ Assoziierte Gnotobioten können nicht eigenständig entwickelt werden, sondern müssen immer aus keimfreien Tieren hergeleitet werden.

### **Technik der Herstellung von gnotobiotischen Tieren**

Aus unterschiedlichen Gründen gelang es nicht bei allen Versuchstierspezies, keimfreie Tiere zu erzeugen. Bei den Spezies Maus und Ratte ist die Entwicklung keimfreier Tiere jedoch gelungen. So werden heute eine Vielzahl keimfreier Maus- und Rattenstämme gehalten. Die ersten keimfreien (Baby-) Tiere wurden dabei durch Hysterektomie (Kaiserschnitt) unter sterilen Bedingungen entwickelt und „mit Hand“ aufgezogen. Auf diese aufwendige Art der Herstellung keimfreier Tiere ist man heute nicht mehr angewiesen. Da zahlreiche versuchstierkundliche Einrichtungen über keimfreie Mäuse und Ratten verfügen, können diese Tiere genutzt werden, um neue Tierstämme auf keimfreies Niveau zu heben. Dazu werden die auf keimfreies Niveau zu verbringenden Tiere entweder in Embryonenform (Embryotransfer) oder unmittelbar vor der zu erwartenden Geburt als Baby (Hysterektomie) in das keimfreie Milieu eingeschleust. Bei Einschleusung von Embryonen werden diese im keimfreien Milieu auf Empfängertiere übertragen und von diesen ausgetragen. Bei Einschleusung von Babies übernehmen keimfreie Ammen die Jungenaufzucht.

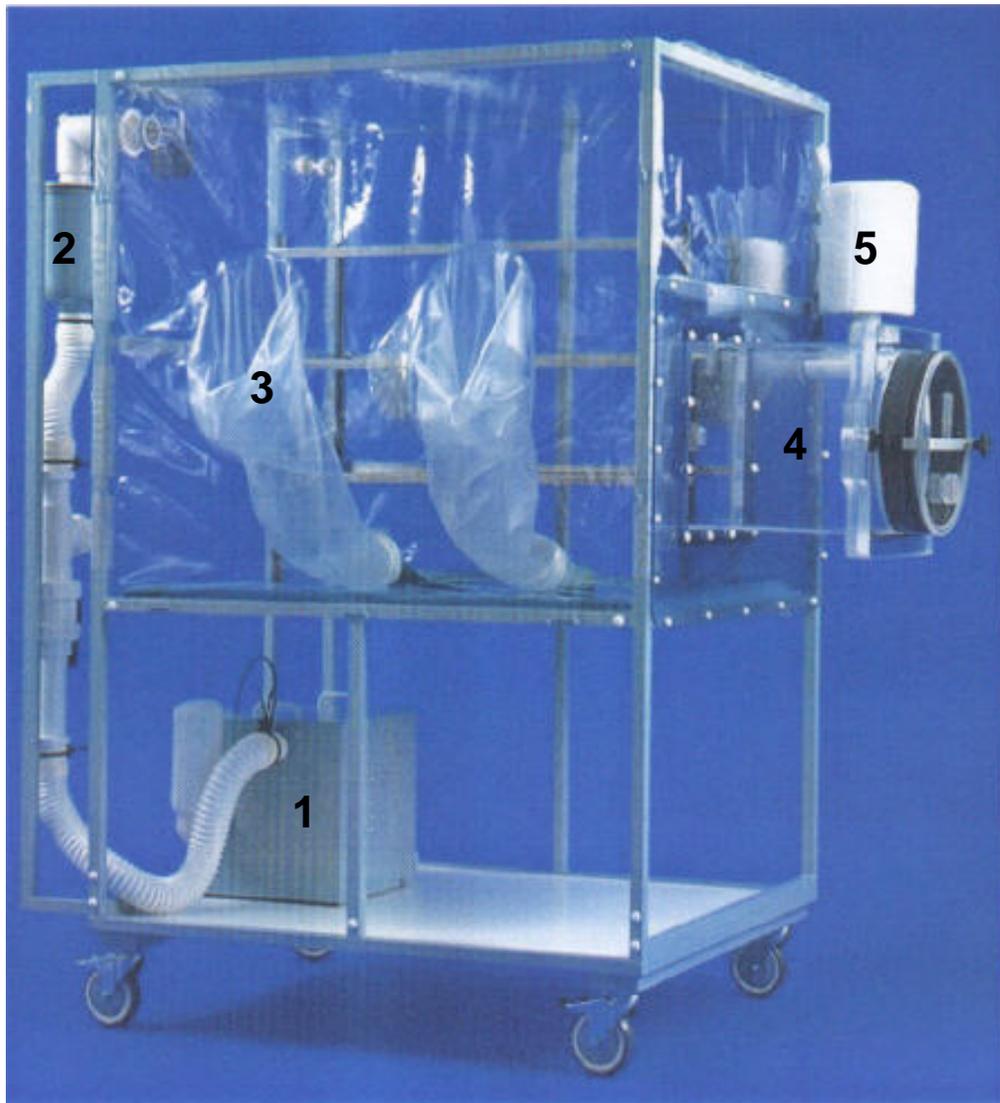
### **Tierexperimentelle Nutzung gnotobiotischer Tiere**

Trotz des erheblichen technischen Aufwands, der mit der gnotobiotischen Tierhaltung verbunden ist, ist dieses Hygieneniveau durchaus weit verbreitet. Allerdings ist die Palette gnotobiotisch verfügbarer Maus- und Rattenstämme wenig breit. Die gnotobiotische Technik wird zur tierexperimentellen Untersuchung immunsuppressiver Therapieformen und zur Erforschung der intestinalen Ökologie eingesetzt. Auch die Haltung stark immungeschwächter Tiere wie z.B. von

SCID-Mäusen (severe combined immunodeficiency: kombinierter B- und T-Zellmangel) erfolgt unter gnotobiotischen Bedingungen am sichersten.

### **Technik der gnotobiotischen Versuchstierhaltung**

Der gnotobiotische Hygienestatus kann nur durch eine absolute Barriere gewährleistet werden. Bei absoluten Barrieren wird die Tierhaltung so hermetisch von der Umgebung abgetrennt, dass das Eindringen von Mikroorganismen sicher verhindert wird. Als absolute Barriere werden üblicherweise Isolatoren aus luftdichten, transparenten, flexiblen PVC-Hüllen eingesetzt. Damit die Tiere innerhalb der Isolatoren hantiert werden können, müssen Handschuhe in luftdichter Weise in die Hülle integriert sein. Der Isolator muss weiterhin über eine Be- und Entlüftung verfügen. Die Belüftung erfolgt aktiv über einen Ventilator, die Entlüftung erfolgt passiv. Hierdurch entsteht im Isolator ein Überdruck gegenüber der Umgebung; diese Druckverhältnisse sind sehr wichtig zur Aufrechterhaltung des gnotobiotischen Hygienestatus. Selbstverständlich muss die Zuluft vor Einleitung in den Isolator sterilfiltriert werden. Um bei Lüftungsausfällen den Rückstrom unsteriler Luft über das Abluftsystem in den Isolator zu verhindern, wird die Abluft durch eine „Falle“ geleitet (Ablufffalle), die eine Umkehr der Strömungsrichtung der Abluft sicher verhindert. Alle Versorgungsmaterialien (Futter, Wasser), die in den Isolator eingebracht werden, werden zunächst in Zylindern durch Autoklavierung sterilisiert und dann unter sterilen Bedingungen in den Isolator eingeschleust. Die Materialschleuse stellt somit ebenfalls einen essentiellen Teil der Keimfrei-Isolatortechnik dar. Die Sterilisierung der Schleuse erfolgt chemisch durch Peressigsäure; vor Schleusenöffnung wird die Säure durch sterile Belüftung entfernt. Das Peressigsäure Sterilisationsverfahren wird ebenfalls benutzt, um die Isolatoren vor der Inbetriebnahme zu entkeimen.



**Abbildung 7.1: Isolator aus transparenter, flexibler PVC-Hülle zur Haltung gnotobiotischer Tiere**

Der Ventilator 1 versorgt den Isolator über den Sterilfilter 2 mit Frischluft. In die Isolatorhülle sind Handschuhe (3), eine Materialschleuse (4) sowie eine Abluftfalle integriert. Die Abbildung wurde freundlicherweise von der Firma Scanbur, Dänemark, zur Verfügung gestellt.

### **7.5 Spezifisch bzw. spezifiziert Pathogen-freie (SPF) Tierhaltung**

Obwohl nur die gnotobiotische Tierhaltung eine mikrobiologische Standardisierung gewährleistet, ist diese Haltungsform technisch und personell zu aufwendig, um tierexperimentelle Studien regelmäßig auf diesem Hygieneniveau durchführen zu können. Die Haltung der überwiegenden Mehrzahl von Versuchstieren erfolgt deshalb gemäß des sogenannten SPF-Hygienekonzepts. In SPF-Versuchstierhaltungen muss regelmäßig auf die Präsenz pathogener Mikroorganismen untersucht werden. Dabei existieren Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) bezüglich der Spezies-spezifischen Palette der pathogenen Erreger, bezüglich der Untersuchungsintervalle, bezüglich der Untersuchungsmethodik sowie

bezüglich des Probenumfangs zur Konstatierung des SPF-Status (Nicklas et al. 2001). Es muss jedoch als problematisch bewertet werden, dass die akkurate Einhaltung der FELASA-Empfehlungen zur Zeit nicht von unabhängigen Instanzen kontrolliert wird. Vielmehr liegt es im Ermessen des Tierhaltungs-Managements, ob überhaupt, und falls ja wie genau, die zur Deklaration des SPF-Status erforderlichen Untersuchungen auch tatsächlich durchgeführt werden. SPF-Tierhaltungen müssen in der Lage sein, ein Hygienezeugnis zu erstellen, aus dem hervorgeht, welche pathogenen Mikroorganismen im Tierhaltungsbereich anzutreffen sind und welche eben nicht. Aus den aufgeführten Gründen steht und fällt die Zuverlässigkeit solcher Zertifikate mit der Integrität des jeweiligen Tierhaltungsmanagements.

### **Gründe für die starke Verbreitung des SPF-Hygienekonzepts**

Die überwiegende Mehrzahl von Tierversuchen wird an spezifiziert Pathogen-freien Versuchstieren durchgeführt. Hierfür können nachfolgende Gründe angeführt werden:

- Sehr virulente tierpathogene Mikroorganismen können durchaus zu Infektionskrankheiten bei Versuchstieren und auch zu Tierverlusten führen. So wurden beispielsweise vor wenigen Jahrzehnten ganze Maushaltungsbereiche durch epidemische Ausbrüche muriner Pocken hinweggerafft. Die „Killer“ unter den Versuchstierkeimen sind heute allerdings aufgrund entsprechender Bekämpfungsmaßnahmen eher selten geworden. Die in der heutigen Zeit überwiegend anzutreffenden Versuchstierinfektionen verlaufen zumeist klinisch inapparent.
- Unter Stressbedingungen (bedingt durch z.B. tierversuchsbedingte Belastungen oder suboptimale Haltungsbedingungen) können auch ansonsten harmlose Versuchstier-pathogene Erreger zu klinisch apparenten Erkrankungen führen.
- Viele Versuchstier-pathogene Erreger können die Ergebnisse von Tierversuchen beeinträchtigen. So ist bekannt, dass z.B. tierische Verhaltensweisen, Wachstumsraten, Organgewichte, oder Immunreaktionen durch interkurrente Infektionen der Versuchstiere mit tierpathogenen Erregern beeinflusst werden.
- Bestimmte Versuchstier-pathogene Erreger können zur Kontamination biologischer Materialien (wie Gewebekulturen, Zelllinien, transplantable Tumoren, biologische Produkte etc.) führen und die Qualität dieser Produkte maßgeblich beeinträchtigen.
- Einige Versuchstier-pathogene Erreger können Zoonosen verursachen und stellen somit eine Gefährdung des tierpflegerischen oder wissenschaftlichen Personals dar (z.B. LCMV, Hantan, Listeria). Es muss jedoch angemerkt werden, dass das Auftreten gefährlicher Zoonose-Erreger in Versuchstierhaltungen in der heutigen Zeit nur eine untergeordnete

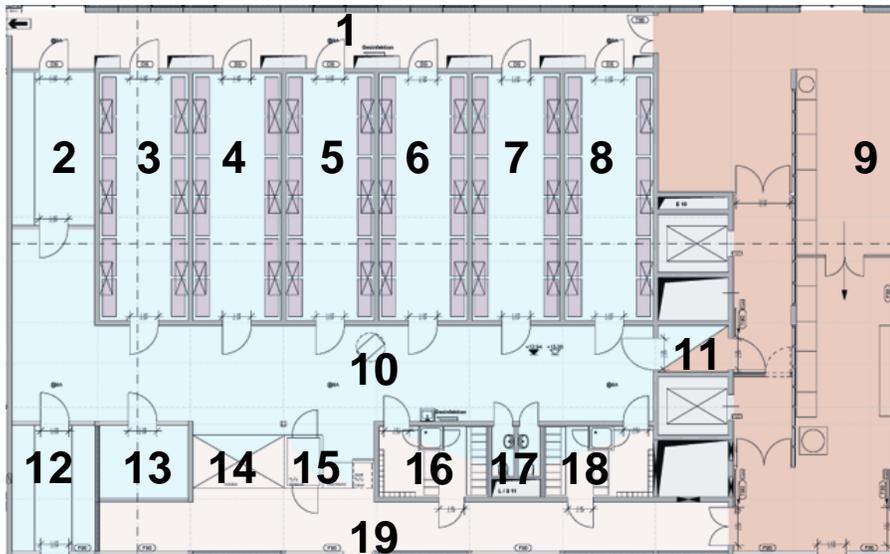
Rolle spielt. Bei der Heimtierhaltung besteht ein deutlich größeres Risiko der Übertragung von Infektionskrankheitserregern vom Tier auf den Mensch.

### **Technische, bauliche und organisatorische Umsetzung des SPF-Hygienekonzepts**

Das SPF-Hygienekonzept wird in erster Linie durch eine Barrierentechnik realisiert. Dabei wird ein einzelner oder i. d. R. eine Gruppe von Tierhaltungsräumen durch eine Hygienebarriere von der Umgebung abgeschottet. Die Hygienebarriere umfasst dabei folgende Komponenten:

- Lüftungsbarriere: Die Zuluft von SPF-Tierhaltungen wird i.d.R durch Schwebstofffilter von Kleinstpartikeln gereinigt. Schwebstofffilter können Kontaminationen der Zuluft mit Bakterien, Viren oder Pilzen sehr sicher abfangen.
- Materialbarriere: Für die Tierversorgung notwendige Versorgungsmaterialien wie frische Käfige und Futter werden i.d.R. vor Einschleusung in den SPF-Tierhaltungsbereich behandelt. Dies erfolgt üblicherweise durch einen in die Barriere integrierten Durchfahrautoklaven. Das Autoklavierungsprogramm wird so gewählt, dass zumindest eine sichere Desinfektion der Käfighaltungseinrichtungen gewährleistet ist. In vielen Fällen wird sogar eine Sterilisierung des Materials durchgeführt, obwohl dies prinzipiell nicht zwingend erforderlich wäre. Die Materialbarriere umfasst ebenfalls die mikrobiologische Kontrolle des für die Tiere erforderlichen Trinkwassers. Häufig wird gewöhnliches Leitungswasser zum Tränken der Tiere eingesetzt. Die Kontaminationsgefahr, die von gewöhnlichem Trinkwasser für Versuchstiere ausgeht, ist in Deutschland als äußerst gering einzustufen; da solches Wasser einer standardisierten intensiven mikrobiologischen Qualitätskontrolle unterliegt (Trinkwasserverordnung). In vielen Fällen wird das in SPF-Tierhaltungen zur Tiertränke eingesetzte Wasser zusätzlich desinfiziert oder gar sterilisiert. Zur Trinkwasser-Desinfektion werden meist die Methoden der UV-Bestrahlung, Azidifizierung, Chlorierung oder Ozonierung verwandt eine -Sterilisierung kann durch Autoklavierung erreicht werden.
- Personalbarriere: Ganz allgemein ist der Personalzutritt zu SPF-Tierhaltungen auf das unerläßliche Maß zu reduzieren. Der Zutritt zu SPF-Tierhaltungen erfolgt über Personalschleusen, in denen Schutzkleidung angelegt wird. Zum Teil erfolgt der Zutritt durch Luftduschen, die Staubpartikel und die daran eventuell gebundenen Mikroorganismen vom Personal entfernen. Bei einem Teil der SPF-Anlagen kann der Zutritt erst nach einem obligatorischen Duschvorgang erfolgen. Der Nutzen dieses „Zwangseinduschens“ ist jedoch umstritten, da hierdurch lediglich eine Keimreduktion jedoch keine Desinfektion erreicht wird.
- Tierzugangsbarrriere: Die Aufnahme neuer Tierstämme in SPF-Tierhaltungen kann selbstverständlich nicht unkontrolliert erfolgen. Zu groß ist die Gefahr, dass durch solche Vorgänge neue Tierpathogene die Hygienebarriere überwinden. Prinzipiell gilt, dass in eine SPF-

Tierhaltung nur Tiere einer anderen SPF-Tierhaltung aufgenommen werden können. Gemäß des SPF-Hygienekonzepts muss die den Tierstamm abgebende Tierhaltung in der Lage sein, ein mikrobiologisches Zeugnis über pathogene Mikroorganismen zu erstellen. Das Management der den Tierstamm aufnehmenden Tierhaltung kann nun entscheiden, inwiefern es dem mikrobiologischen Zeugnis vertraut und inwiefern der angegebene Hygienestatus kompatibel zur eigenen Haltung ist. Üblicherweise werden Neuzugänge mit verlässlichen und günstigen Hygienedaten quarantänisiert und erst nach der Verifizierung des hygienischen Status erfolgt eine Aufnahme in den SPF-Bereich. Bei ungünstigem Hygienezeugnis wird eine Sanierung des Hygienestatus des Tierstamms durch Embryotransfer durchgeführt. Dabei wird der Tierstamm in Form von Embryonen, die sich noch nicht in die Gebärmutter eingenistet haben (Präimplantationsembryonen), in den SPF-Barrierenbereich eingeschleust und dort auf geeignete Empfängertiere übertragen. Durch den Embryotransfer kann die Einschleppung von Tier-pathogenen Erregern in einen SPF-Haltungsbereich am sichersten unterbunden werden.



**Abbildung 7.2: Plan einer SPF- Barrierentierhaltung**

Die Räume 3-8 dienen der Tierhaltung. In Raum 2 wird das Trinkwasser der Tiere angesäuert, in Flaschen abgefüllt und gelagert. In Raum 12 werden Embryotransfers zum Einschleusen neuer Tierstämme in die Tierhaltung durchgeführt. Raum 13 dient zu Dokumentationszwecken. In Raum 14 ist ein Durchfahrautoklav und in Raum 15 eine  $H_2O_2$ -Materialschleuse zum Einschleusen von Material in den Tierhaltungsbereich etabliert. Die Räume 16 und 18 stellen Personalschleusen dar, in Raum 17 sind WCs untergebracht. In Raum 9 befindet sich die Spülküche, die mit einer Bandspülmaschine ausgestattet ist. Die Schleuse 11 dient dem Ausschleusen von verschmutzten Materialien in die Spülküche. Der Flur 1 stellt in erster Linie den Fluchtweg dar. In Flur 10 werden die sterilisierten Versorgungsmaterialien für die Tierhaltung entnommen und auch gelagert. Flur 19 dient zur Beschickung von Autoklav und  $H_2O_2$ -Schleuse.

Die Räume 14-18 stellen die Hygienebarriere dar. Durch die Barriere geschützt werden die Tierräume 3-8, der reine Lagerflur 10, das Embryotransferlabor 12 und die Dokumentation 13. Der Planausschnitt wurde freundlicherweise von der Firma Doranth und Post Architekten, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

### **Zusätzliche Absicherung des Hygienestatus von SPF-Tierhaltungen durch den Einsatz von Mikroisolatorkäfigen**

Bei vielen SPF-Tierhaltungen erfolgt die Absicherung des Hygieneniveaus ausschließlich durch die Hygienebarriere. In der Vergangenheit hat sich jedoch gezeigt, dass SPF-Barrieren häufig durch pathogene Erreger überwunden wurden. Bei diesen Kontaminationsfällen kam es, nachdem die Hygienebarriere erst einmal überwunden war, zu einer raschen und vollständigen Durchseuchung des gesamten durch die Barriere geschützten Tierbestands. Es wurden deshalb Überlegungen angestellt, wie SPF-Bereiche über den Barrierenschutz hinaus hygienisch abgesichert werden könnten. Diese Anstrengungen führten zur Entwicklung von Mikroisolatorkäfigen. Übliche Nagetierkäfige bestehen aus einer luftdichten Käfigschale, die von einem Gitterdeckel verschlossen wird. Durch den Gitterdeckel kann ein freier Austausch von Partikeln zwischen Käfiginnerem und Umgebung stattfinden. Auf diesem Weg gelangen Partikel direkt von einem Käfig zum anderen und führen zu einer raschen Ausbreitung von Infektionen. Bei Mikroisolatorkäfigen wird der freie Partikelaustausch zwischen Käfigen unterbunden. Bei SPF-Tierhaltungen mit Mikroisolatorkäfigen ist prinzipiell jeder einzelne Käfig ein eigenes Hygienekompartiment. Im Gegensatz dazu stellen bei SPF-Barrierenhaltungen ohne Mikroisolatorkäfige die Gesamtheit aller hinter der Barriere gelegenen Käfige das Hygienekompartiment dar. Der Hygieneschutz von Mikroisolatorkäfigen kommt insbesondere dann zur vollen Geltung, wenn alle Manipulationen an Tieren nicht offen, sondern unter Sicherheitswerkbänken oder speziellen Umsetzstationen durchgeführt werden. Sicherheitswerkbänke (der Klasse II) und Umsetzstationen bieten durch einen vertikalen laminaren Strom steriler Luft einen mikrobiologischen Objekt- und Personenschutz. Durch den Einsatz von Mikroisolatorkäfigen in Kombination mit Sicherheitswerkbänken und Umsetzstationen erhalten SPF-Tierhaltungen eine mächtige Hygieneunterstützung. Zum einen können sie verhindern, dass pathogene Erreger, die die Barriere durchbrochen haben, an den Tierbestand gelangen und zu Infektionen der Versuchstiere führen. Zum anderen ist bei bereits erfolgter mikrobiologischer Kontamination von Versuchstieren die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Erreger so stark herabgesetzt, dass bei gutem Tierhaltungsmanagement prinzipiell die Möglichkeit besteht, die Kontamination durch gezielte Eliminierung infizierter Tiere und nicht durch die sehr aufwendige erneute Etablierung der SPF-Anlage zu beseitigen. Den gravierenden Vorteilen von Mikroisolatorkäfigen stehen ihre hohen Anschaffungs- und Unterhaltskosten sowie der durch das Umsetzen der Tiere unter speziellen Umsetzstationen personelle Mehraufwand entgegen.

gen. Da beim Einsatz von Mikroisolatorkäfigen prinzipiell der einzelne Käfig zur Hygieneeinheit wird, gestaltet sich Kontrolle des Hygienestatus von SPF-Anlagen mit solchen Käfigsystemen als problematisch. Es können zwei unterschiedliche Typen von Mikroisolatorkäfigen unterschieden werden, Filtertopkäfige und individuell ventilierte Käfige (IVCs).

Bei Filtertopkäfigen ist das Käfiggitter von einer Haube abgedeckt, in die ein Grobfilter integriert ist. Der Grobfilter verhindert den Partikelaustausch zwischen Käfiginnerem und der Umgebung sehr effizient und bewirkt somit eine beträchtliche Erhöhung des Hygieneschutzes. Der Grobfilter behindert aber auch den Luftaustausch, so dass aus Filtertopkäfigen Schadstoffe wie  $\text{NH}_3$  oder  $\text{H}_2\text{S}$ , die durch mikrobielle Zersetzung aus tierischen Ausscheidungen entstehen, wesentlich schlechter abgeführt werden, als dies bei ungefilterten „offenen“ Käfigen der Fall ist. Die Haltung von Tieren in Filtertopkäfigen geht deshalb häufig mit intermittierend hohen Schadstoffkonzentrationen einher. Dabei ist die Schadstoffkonzentration zum Zeitpunkt des Einbringens der Tiere in einen frischen Käfig gering und steigt bis zum folgenden Käfigwechsel allmählich an. Zur zumindest teilweisen Kompensation dieses Effekts werden Filtertopkäfige meist zweimal wöchentlich oder noch häufiger umgesetzt. Beim Umsetzen werden die Tiere von den verschmutzten in frische Käfige transferiert.



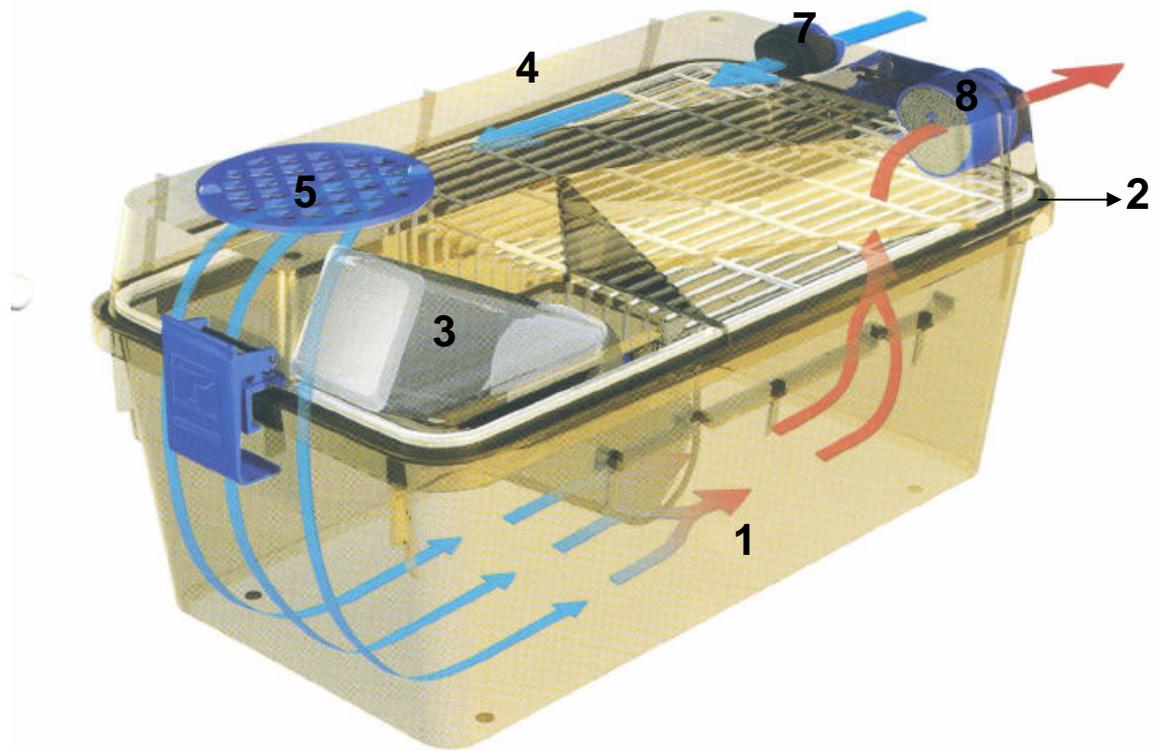
**Abbildung 7.3: Filtertopkäfig**

Der Käfig besteht aus der Käfigschale aus transparentem Kunststoff, dem Gitterdeckel, in den eine Raufe zur Aufnahme von Futter und Wasserflasche eingearbeitet ist, und der Haube, in die ein Grobfilter integriert ist.

In den letzten Jahren hat sich ein völlig neuartiges System von Mikroisolatorkäfigen stark verbreitet. Dabei handelt es sich um IVC-(individually ventilated cage) Systeme. Bei IVC-Systemen wird jeder einzelne Käfig individuell ventiliert. Dazu erforderliche Zu- und Ableitungslüftungskanäle sind direkt in das Käfighaltungsgestell integriert. Die Ventilatoren (meist Zu- und Abluft-

ventilator) befinden sich in einer separaten Lüftungseinheit, die entweder in das Tierhaltungsgestell integriert oder davon getrennt aufgestellt ist. Die Zuluft zum IVC wird sterilfiltriert. Bei der individuellen Ventilation der Käfige wird in der Regel eine ca. 50-fache stündliche Käfigluftwechselrate eingestellt. Hierdurch werden die im Käfige durch mikrobielle Zersetzung tierischer Ausscheidungen entstehenden Schadstoffe hocheffizient abgeführt. Wird die Abluft des IVC-Gestells direkt in das Abluftsystem des Tierhaltungsraums eingeleitet, werden auch die Konzentrationen von Schadgasen im Tierhaltungsraum deutlich reduziert. Deshalb kann in solchen Fällen die für Tierhaltungsräume üblicherweise geforderte 15-18-fache Raumlüftungsrate auf eine ca. 8-fache Rate herabgesetzt werden. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Tierraumlüftung nicht nur zur Ableitung von Schadstoffen sondern ebenfalls zur Temperaturkontrolle dient. Neuere Tierhaltungskonzepte sehen vor, die Belüftung der IVC-Einheiten nicht mehr durch einzelne, im Tierhaltungsraum aufzustellende, dezentrale Ventilatoren zu erreichen, sondern die IVCs zentral an die Gebäude-Belüftung anzuschließen. Die Zeit wird zeigen, ob sich das Konzept der zentralen IVC-Anbindung durchsetzen kann.

Die Vorteile der IVC-Haltung liegen -ähnlich wie beim Einsatz von Filtertopfkäfigen- in der besseren mikrobiologischen Abschirmung. Während es bei den lediglich passiv ventilierten Filtertopfkäfigen jedoch zu einer Akkumulation von Schadstoffen im Käfig kommen kann, kann dieses Problem beim aktiv ventilierten IVC-Gestell nicht auftreten. Das Mikroklima in IVC-Käfigen ist sogar besser als das von „offenen“ Haltungssystemen, bei denen ein passiver Luftaustausch durch die Käfiggitter erfolgt. So können bei offenen Haltungssystemen, bei denen üblicherweise einmal wöchentlich die Käfigeinstreu gewechselt wird, in Abhängigkeit von der Käfigbelegung durchaus kurz vor dem Umsetzen erhöhte  $\text{NH}_3$ -Konzentrationen auftreten. Im Gegensatz dazu werden bei IVC-Haltung auch kurz vor dem Umsetzen der Tiere keine erhöhten Schadstoffkonzentrationen beobachtet. Zum Teil wird deshalb erwogen, IVC-Käfige nur alle 14 Tage zu wechseln.



**Abbildung 7.4: Schema der Luftführung in einem IVC-Käfig**

Der IVC-Käfig besteht wie der Filtertopkäfig aus der Käfigschale aus transparentem Kunststoff (1), dem Gitterdeckel (2), in den eine Raufe zur Aufnahme von Futter und Wasserflasche (3) eingearbeitet ist, und der Haube (4). Allerdings wird der Käfig über die Zuluftöffnung 7 und die Abluftöffnung 8 aktiv ventiliert. Der in die ansonsten geschlossene Haube integrierte Grobfilter 5 sichert die Käfigventilation bei Ausfall des Ventilationssystems des Käfigs. Die Abbildung wurde freundlicherweise von der Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

### **Inbetriebnahme von SPF-Tierhaltungseinheiten**

Vor der Inbetriebnahme von SPF-Tierhaltungen ist eine gründliche Raumesinfektion unbedingt erforderlich. Unter optimalen Bedingungen werden die Tierhaltungsräume mit Formaldehyd oder mit „trockenem“  $H_2O_2$  begast. Beide Methoden sind hocheffizient, prinzipiell kann eine Raumsterilisierung erreicht werden. Bei der Durchführung von Raumbegasungen mit Formaldehyd stellt sich jedoch das Problem des Aufwands der Legalisierung. Hierfür sind entsprechend geschulte Personen (Befähigungsscheininhaber) sowie eine behördlich ausgestellte spezielle Begasungserlaubnis erforderlich. Raumbegasungen mit  $H_2O_2$  erfordern einen geringeren Legalisierungsaufwand, hier erweisen sich jedoch die hohen Anschaffungskosten des Superoxid-Generators von Nachteil. Als Alternative zu Raumbegasungen können die Tierhaltungsräume auch durch Dampfbestrahlung und/oder Scheuerwischdesinfektion desinfiziert werden. Zur „lege artis“ Inbetriebnahme von SPF-Tierhaltungen werden keimfreie Tiere mit einer komplexen Co-

ionization-Resistant-Flora (CRF) wie der Schädler- oder der Wensinck-Flora assoziiert. Die CRF-assoziierten Tiere dienen nun als Empfängertiere bei Embryotransfers zur Einbringung weiterer Stämme in die SPF-Kolonie. Obwohl die CRF-Assoziierung eine Besiedelung mit weiteren Bakterien verzögern soll, ist die Akquirierung weiterer Bakterienspezies im Laufe der Jahre unausweichlich. Die Initiierung einer SPF-Kolonie auf CRF-Niveau ist jedoch eher die Ausnahme als die Regel. Meist werden SPF-Tierhaltungen aufgebaut, indem SPF-Tiere aus anderen Kolonien bezogen werden und diese dann als Empfängertiere bei der Einbringung weiterer Stämme in die SPF-Anlage mittels Embryotransfer dienen.

### **Möglichkeiten der Kontamination von SPF-Tierhaltungsbereichen**

In Anbetracht des beträchtlichen Aufwands, der damit verbunden ist, einmal kontaminierte SPF-Bereiche wieder zu sanieren, sollten alle Anstrengungen unternommen werden, den Hygienestatus von Tierhaltungen möglichst langfristig zu bewahren. Voraussetzung hierfür ist genaue Kenntnis möglicher Kontaminationsrouten.

#### **-Kontamination durch das Einbringen Pathogen-belasteter Versuchstiere**

Dieser Kontaminationsmodus ist der sicherlich häufigste von allen. Der Kontaminationsweg kommt zum tragen, wenn die Tierzugangskontrolle nicht gründlich genug durchgeführt wird. Gründe hierfür liegen häufig im Tierhaltungsmanagement (fehlende oder zu wenig stringente Eingangskontrolle). In diesem Zusammenhang muss nochmals betont werden, dass die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass mikrobiologische Zeugnisse fremder Institutionen nicht in vollem Umfang der Wahrheit entspricht. Letztendlich kann nur das kategorische Einbringen neuer Tierstämme im Rahmen von hygienisch einwandfrei durchgeführten Embryotransfers SPF-Bereiche relativ sicher vor diesem Infektionsweg schützen. Zumindest sollten zu importierende Tiere mit vermeintlich günstigem Hygienezeugnis zur Verifikation des Hygienestatus quarantänisiert werden.

#### **-Kontamination durch die Verwendung biologischer Materialien:**

Auch dieser Kontaminationsweg ist häufig zu beobachten. Versuchstiere dienen als Lieferanten von Seren, Ascitesflüssigkeit, Organen, Mikroorganismen, Tumoren, Zellen etc. Dieses biologische Material kann Viren, Mykoplasmen und intrazelluläre Bakterien enthalten, die tierpathogen sind. Bei Einbringung solcher kontaminierter Materialien in Tierhaltungen (z.B. im Rahmen tierexperimenteller Nutzung) kann dies zur Kontamination des Tierhaltungsbereichs führen. Der Infektionsweg kann einerseits unterbunden werden, indem die Präsenz infektiöser Mikroorganismen in biologischen Materialien im AP-Test (Antibody Production Test) oder durch Anwendung molekulargenetischer Methoden sicher evaluiert wird. Andererseits hat sich in der Vergangenheit bewährt, die Zucht und die

experimentelle Nutzung von Versuchstieren in unterschiedlichen Barrierenbereichen durchzuführen. Durch dieses Vorgehen können kontaminierte Experimentalhaltungsbe-  
reiche relativ leicht nach Keulung oder Auslagerung des kontaminierten Tierbestands und  
der Reinigung und Desinfektion des Bereichs mit Tieren der Zuchtbereiche repopuliert  
werden.

#### -Kontamination durch das Personal

Dieser Kontaminationsweg kommt dann zum tragen, wenn die Personalbarriere leck ist.  
Ursache hierfür kann fehlerhaftes Management (ungenügende Personalbarrierenmaßnah-  
men, ungenügende Information des Personals, Auswahl unzuverlässigen Personals, zu ge-  
ringe Autorität des Managements) sein. Häufig setzen sich aber tierexperimentelle Nutzer  
ganz bewusst über Hygieneregeln hinweg. Das Personal kann entweder direkt mit tier-  
pathogenen Mikroorganismen wie Salmonella sp., Mycobacterium tuberculosis, Pneumo-  
cystis carinii oder Staphylococcus sp. besiedelt sein und so eine mikrobiologische Gefähr-  
dung der Tierhaltungen darstellen. Wesentlich häufiger dient das Personal jedoch als Vek-  
tor für Mikroorganismen. Es ist deshalb sehr wichtig, eindeutige Hygienemaßnahmen für  
den Personalwechsel zwischen Tierhaltungen unterschiedlicher Hygieneniveaus zu etab-  
lieren. Da in mikrobiologischen Laboratorien und insbesondere in versuchstierkundlichen  
Diagnostiklabors häufig mit tierpathogenen Mikroorganismen hantiert wird, sollte Tier-  
pflegepersonal zu solchen Räumen keinen Zutritt haben. In diesem Zusammenhang muss  
auch erwähnt werden, dass Heimtiere häufig ein gefährliches Erregerreservoir für Labor-  
nager darstellen. Dem Tierpflege- und tierärztlichen Personal sollte die Haltung bestimm-  
ter Haustiere (Nager und Kaninchen) deshalb verboten werden.

#### -Kontamination durch Materialien und Gerätschaften

Dieser Kontaminationsweg spielt nur dann eine Rolle, wenn die Materialbarriere Lecks  
aufweist. Dies kann dann auftreten, wenn die in die Barriere integrierten Geräte zur Des-  
infektion oder Sterilisation von Materialien (wie Autoklaven oder Desinfektionsmittel-  
schleusen) Defekte aufweisen oder fahrlässigerweise umgangen werden. In diesem Zu-  
sammenhang ist auf die regelmäßige Wartung dieser Geräte und auf die Belehrung des  
Personals hinzuweisen.

#### -Kontamination durch die Zuluft

Auch Lecks in der Lüftungsbarriere können zur Kontamination von SPF-Tierhaltungen  
führen. Dieser Infektionsmodus kann insbesondere dann eine Rolle spielen, wenn die Zu-  
luft von SPF-Tierhaltungen keine Einzelanlagen darstellen. Auch bei Koexistenz von

SPF-Tierhaltungen und kontaminierten Tierhaltungsbereichen in unmittelbarer räumlicher Nähe muss auf diesen Infektionsweg geachtet werden.

#### -Kontamination durch Wildnager oder Gliedertiere

Wildnager haben in der Vergangenheit bereits sehr häufig zu mikrobiologischen Kontaminationen von SPF-Tierhaltungen geführt. Aus diesem Grund, aber auch, um genetische Kontaminationen zu vermeiden, müssen SPF-Tierhaltungen so konstruiert sein, dass das Eindringen von Wildnagern sicher ausgeschlossen ist. Inwiefern Gliedertiere als Vektoren für tierpathogene Erreger dienen können, ist nur schwer abschätzbar. Aus allgemeinen hygienischen und tierschutzrechtlichen Erwägungen sollten SPF-Tierhaltungen aber so konstruiert sein, dass Gliedertiere nicht oder nicht leicht eindringen können. Bei Befall sind unverzüglich Gegenmaßnahmen einzuleiten.

#### **Sanierung des Hygieneniveaus kontaminierter SPF-Tierhaltungen**

Die überwiegende Mehrzahl an SPF-Tieren wird heute in klassischen Barriereeinheiten ohne Mikroisolator Käfige gehalten. In solchen Anlagen sind relativ häufig Hygieneeinbrüche zu beobachten. Ist der Kontaminationsfall eingetreten, muss entschieden werden, ob und, falls ja, welche Sanierungsmaßnahmen zur Anwendung kommen. Ganz allgemein hat sich gezeigt, dass durch therapeutische Interventionen (wie beispielsweise der Einsatz von Antibiotika zur Eliminierung von bakteriellen Infektionen oder der Einsatz von Antiparasitika zur Beseitigung parasitärer Organismen) nur selten die Beseitigung einer Kontamination erreicht werden kann. Sehr effizient lassen sich Tierhaltungs-Kontaminationen dadurch bekämpfen, dass der gesamte kontaminierte Tierbestand gekeult oder ausgelagert wird, alle hinter der Barriere befindlichen Räume gründlich gereinigt und desinfiziert werden und die Tierhaltung anschließend wieder mit SPF-Tieren repopuliert wird. Diese Vorgehensweise ist jedoch sehr zeitaufwendig und impliziert eine temporäre Räumung der Tierhaltung.

#### **7.6 Konventionelle Tierhaltung**

Bei konventionellen Tierhaltungen liegen keinerlei Angaben zur Keimbesiedlung des Versuchstiers vor. Folglich kann bei konventionellen Versuchstieren nie ausgeschlossen werden, dass sie mit tier- oder human-pathogenen Mikroorganismen infiziert sind. Konventionelle Versuchstiere stellen somit immer ein hygienisches Risikopotential dar. Insbesondere können konventionelle Tierhaltungen als Infektionsquellen für Tierhaltungen mit höherem Hygieneniveau dienen. Die Wahrscheinlichkeit der Infektion konventioneller Versuchstiere mit Zoonoseerregern und die damit einhergehende potentielle Gefährdung des Betreuungspersonals kann in der heutigen Zeit als geringgradig eingestuft werden. In konventionellen Tierhaltungen, die nachweislich

mit tierpathogenen Erregern kontaminiert sind, müssen Tiererkrankungen oder –ausfälle nicht zwangsweise wesentlich häufiger vorkommen als in SPF-Tierhaltungsbereichen. Häufig handelt es sich bei den Erregern um Opportunisten, die keine Krankheitssymptome hervorrufen, solange keine zusätzlichen Stressoren wirksam sind. Werden solche Tiere jedoch im Rahmen von Tierversuchen zusätzlich belastet, so ist mit Erkrankungen und Todesfällen zu rechnen, die durch Infektionskrankheiten verursacht sind. Zudem wird die Aussagekraft der wissenschaftlichen Experimente beeinträchtigt sein. Aus diesen Gründen sind konventionelle Tierhaltungen in der heutigen Zeit eher kritisch zu bewerten. Nachweislich mit pathogenen Erregern verseuchte konventionelle Tierhaltungen sollten deshalb einer Hygienesanierung unterzogen werden und es sollte ein SPF-Hygieneniveau etabliert werden. Die Nutzung konventioneller Versuchstiere sollte sich auf Experimente mit geringer oder fehlender Belastung (z.B. Zuchtexperimente) beschränken.

Aus externen Tierhaltungen erhaltene konventionelle Tiere sind wegen des nicht auszuschließenden Infektionsrisikos mit größter Vorsicht zu behandeln. Werden solche Tiere überhaupt angenommen, so müssen sie in einem abgeschirmten Bereich quarantänisiert werden. Die Quarantäne sollte in einem Isolator- oder einem Mikroisolatorkäfigsystem mit negativem Druck erfolgen. Durch geeignete Hygienemaßnahmen muss die Verschleppung potentiell vorhandener Keime sicher ausgeschlossen werden. Erst nach Bestimmung des mikrobiologischen Status kann über den Verbleib konventioneller Tiere bestimmt werden.

Häufig befinden sich konventionelle Versuchstierhaltungen in Gebäuden, die über keine besonderen baulichen Ausrüstungen wie Autoklav, Personalschleusen, Materialschleusen u.s.w. verfügen. Aber auch baulich und technisch besser ausgerüstete Tierhaltungen sind zum konventionellen Typ zu rechnen, wenn die regelmäßige Bestimmung des Hygienestatus unterbleibt.

## **7.7 Literatur**

Baker DG (1998) Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Rev* 11: 231-266

Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B (2001) Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals* 36: 20-42

Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (eds) (1995) *Grundlagen der Versuchstierkunde*, Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York

Weiss J, Maeß J, Nebendahl K (eds) (2003) *Haus- und Versuchstierpflege*, Enke, Stuttgart