

Bull. Acad. Vét. de France, 1988, 61, 125-134

Modalités sanitaires d'accueil et de maintenance des animaux de laboratoire*

par H. MAURIN-BLANCHET** et Michèle PAUCHARD***

RÉSUMÉ

Avant d'aborder les aspects pratiques du contrôle de l'état sanitaire des animaux, tant à l'arrivée que dans l'unité d'élevage ou de maintenance, il est procédé à un nécessaire rappel de la nomenclature utilisée, basée sur leur état microbiologique.

Une finalité se dégage : faire concorder les conditions de l'environnement d'accueil avec celles existant à l'origine, les procédures à respecter étant d'autant plus exigeantes que le statut microbiologique initial est plus strictement défini.

Après l'évocation de cas particuliers d'analyses propres aux espèces les plus utilisées, il est fait allusion aux équipements spécifiques selon le statut sanitaire des animaux à héberger, aux problèmes de la prophylaxie médicale et au rôle de l'homme au sein de l'unité animale, le chercheur, le visiteur ou le technicien.

Quelques règles essentielles de contrôle sont rappelées en fin d'exposé.

Mots clés : Animaux de laboratoire - Statut sanitaire - Contrôles - Contagion.

SUMMARY

SANITARY REQUIREMENTS FOR RECEPTION AND MAINTENANCE OF LABORATORY ANIMALS

Before considering the practical aspects of the sanitary control of animals, either at their arrival or in the animal unit, devoted to breeding or

* Cette communication a été présentée une première fois le vendredi 4 décembre 1987, lors de la Journée Technique de la Société Française d'Expérimentation Animale au C.N.R.S., 91160 Gif-sur-Yvette, intitulée : « Prophylaxie sanitaire en animalerie », et non publiée.

** Service vétérinaire, Centre de Recherches I.N.S.E.R.M., Hôpital St-Antoine, 184, rue du Faubourg-Saint-Antoine - 75571 Paris Cedex 12.

*** Responsable d'animalerie, I.N.S.E.R.M. U. 152 (Pr J.P. LEVY), pavillon Gustave-Roussy, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques - 75674 Paris Cedex 14.

* *Les clichés présentés ont été réalisés par le Service Photographique du Centre de Recherches I.N.S.E.R.M. (Y. ISSOULIÉ).*

maintenance, it is necessary to recall the terminology in use based on their microbiological status.

A compulsory aim is to assure a concordance of environmental conditions at the arrival with those known to have existed originally. The procedures to be observed are even more compulsory with respect to the microbiological status which has to be strictly defined.

After having mentioned the particular analysis proper to the species mostly utilized special reference is made to various equipments used according to the animal's sanitary status, as to the prophylactic medical problems posed.

Finally, the role of investigators, visitors or animal technicians is described. Some main rules of control are recalled at the end of the paper.

Key words : Laboratory animals - Sanitary status - Control - Contagion.

INTRODUCTION

Il convient de souligner en avant-propos que les notions ou procédures qui vont vous être présentées ont fait l'objet de nombreux développements dans la littérature scientifique spécialisée, tant dans l'aspect microbiologique que dans celui de la conception et de la réalisation de barrières sanitaires.

Nous nous sommes donc volontairement limités à l'évocation de certaines d'entre elles en tentant d'éclairer le côté pratique ou les aléas techniques de celles-ci selon les espèces animales en cause.

Cette étude a été conduite en collaboration avec Mlle Michèle PAU-CHARD, dont l'expérience en matière d'élevage et de maintenance de souris en zone protégée est certaine et reconnue.

Un certain nombre de critères vont émerger à l'occasion de notre exposé, et entre autres :

- les conditions sanitaires de l'environnement d'accueil ;
- le statut sanitaire des animaux dans l'établissement d'origine ;
- les espèces animales en cause ;
- la durée d'hébergement des animaux dans l'animalerie d'accueil, élément lié directement à la finalité recherchée : l'élevage ou l'expérimentation, elle-même à court, moyen ou long terme.

Le but à atteindre étant le suivant : réaliser l'adéquation de ces différents paramètres.

Les différents chapitres de notre exposé vont donc aborder successivement : la nomenclature sanitaire des animaux de laboratoire et ses implications, les aspects pratiques des contrôles, les à-côtés de ces vérifications d'ordre sanitaire ayant trait aux vaccinations des animaux, aux conditions d'hébergement et à la circulation des personnes.

LES NOTIONS DE RAPPEL

Nous avons jugé utile le rappel de quelques considérations destinées à replacer l'animal dans son contexte sanitaire.

Il s'agit de la nomenclature française récapitulée en 1972 par A. PERROT [9], complétée, en 1977, par le Groupe de Travail de l'Association Française pour la Gnotoxénie [2 et 3]. Ceci nous permet de scinder les animaux, reçus ou maintenus, en deux groupes bien distincts :

— ceux qui possèdent une flore microbienne *connue* ou *a fortiori* absente ;

— ceux qui hébergent une flore dont la connaissance peut être partielle ou nulle. Un tableau récapitulatif simplifié permet de resituer en annexe cette classification d'ordre sanitaire.

Parmi ces derniers, nous serons amenés à privilégier ultérieurement les individus ou effectifs réputés « exempts de tout organisme pathogène spécifique », pour l'espèce considérée (E.O.P.S.).

Dans le premier groupe, la chaîne de l'isolation doit être obligatoirement maintenue depuis l'isolateur d'origine à celui d'accueil : il ne peut y avoir d'interruption de la « barrière », donc de mise en contact avec un environnement non stérile, faute de voir disparaître les caractéristiques biologiques pour lesquelles, justement, ce type d'animal a été choisi.

Il convient donc de se soumettre à un protocole précis, mettant en jeu l'utilisation de hottes à flux laminaire pour le transfert aseptique des animaux à partir de containers de transport préalablement décontaminés, ainsi que l'emploi, par exemple, de portes dites « D.P.T.E. » dispositif pour transfert étanche — N.D. La Calhene S.A.).

Ce processus sous-entend également la vérification périodique de l'étanchéité des installations, et des contrôles de la constance du statut micro-biologique des animaux hébergés, dans le temps : un colloque de la « S.F.E.A. » a été consacré en 1977 à ces aspects.

Dans le deuxième groupe, le plus usuel, nous avons à distinguer deux catégories d'animaux, les « hétéroxéniques » et les « conventionnels », mais aussi deux attitudes :

— La première, heureusement de plus en plus rare, consiste à admettre, vis-à-vis de l'animal traditionnel ou conventionnel, que TOUT PEUT ARRIVER, et d'accepter de supporter un pourcentage de pertes ou d'échecs expérimentaux plus ou moins élevé.

Cette position est peu défendable, pour les risques qu'elle implique :

a) Transmission éventuelle de maladie(s) à l'ensemble de l'effectif, voire à l'homme, en cas de zoonose.

b) Condamnation à plus ou moins brève échéance de la poursuite d'un élevage convenable.

c) Non-validation des résultats d'une expérimentation, surtout s'il s'agit d'expériences à long terme.

d) Obligation de recommencer l'expérience et donc d'utiliser davantage d'animaux, indépendamment de l'incidence économique que cela entraîne.

Il est bon, à cette occasion, de rappeler qu'il convient d'éviter, dans une même salle, le mélange d'espèces, et aussi celui d'animaux de statuts sanitaires différents.

— La seconde attitude consiste à mettre en œuvre un certain nombre de contrôles sanitaires.

LES ASPECTS PRATIQUES DES CONTROLES

Ces contrôles peuvent se borner à des vérifications de garanties données à la source, un éleveur qualifié étant susceptible de fournir sur demande ou catalogue les preuves souhaitées. Ceci ne dispense pas d'une inspection des lots à l'arrivée.

En fait, les modalités pratiques dépendent en grande partie de l'espèce en cause : ainsi, certaines espèces sont désormais élevées dans de très bonnes conditions sanitaires, c'est le cas notamment des souris et des rats, à statut « E.O.P.S. » ou « C.O.B.S. ». On se reportera utilement au tableau annexe pour la définition de ces sigles.

D'autres espèces sont souvent maintenues dans des conditions moins strictes, ainsi des hamsters, des cobayes ou des lapins.

C'est le cas également pour certains élevages de chiens, de chats, de porcs ou de primates.

Bien que le terme ne soit pas homologué, car imprécis, on parlera de conditions « conventionnelles propres ».

Les examens à l'arrivée et la preuve de garanties suffisantes ne doivent pas dispenser d'une période de quarantaine ou de récupération, mise à profit éventuellement pour pratiquer des analyses plus poussées.

Qu'entend-on par examen des animaux à l'arrivée ?

Il convient de vérifier les lots (quantités, qualité intrinsèque, poids, sexe) et de vérifier les documents d'accompagnement, y compris les certificats de vaccination en règle, pour les carnivores domestiques notamment, eux-mêmes dûment identifiés.

Un examen individuel est souhaitable, avec de nécessaires précautions, pour des animaux conventionnels.

A titre d'exemple, examen de la cavité buccale des *lapins* (incisive cassée), des oreilles (gale auriculaire), palpation de l'abdomen et examen de la région anogénitale (myxomatose, diarrhée, trichobezoar dans l'estomac).

Détection, chez le *cobaye*, par palpation, d'abcès mésentériques dus à la « pseudo-tuberculose ».

Le protocole d'accueil tiendra compte évidemment de l'espèce animale en question ; pour ce faire, on se reportera à des connaissances de pathologie propre aux animaux de laboratoire, telles qu'elles peuvent être récapitulées dans l'*Aide-Mémoire de Pathologie des Animaux de Laboratoire*, rédigé en 1985, par nos collègues, le Pr Yves RICHARD et le Dr J.C. GUILLON [11], ouvrage qui a reçu le Prix des Donateurs de l'Académie Vétérinaire de France en 1986.

La période de quarantaine et la mise en route de contrôles sanitaires

Sa durée sera d'autant plus longue que le risque d'introduction d'une maladie est grand, notamment lorsque l'espèce animale est réputée vecteur potentiel de zoonoses, ce qui peut être le cas notamment de *singes* importés.

On mettra à profit cette période pour faire procéder à des examens systématiques plus complets. Prenons quelques exemples de recommandations d'analyses.

a) Chez le *chien* : selon R. WESTON et coll. [14], examen des excréments en vue de la détection des endoparasites. Recherche des œufs d'helminthes (*ascaris* ou *ankylostomes*), des larves ou ookystes de protozoaires.

b) Chez le *singe macaque Rhesus*, la même publication préconise une période d'isolement de douze semaines durant laquelle auront lieu les examens cliniques et de laboratoire, avec gants et masque, sur l'animal tranquilisé, tels que : tentative de détection de la tuberculose et du virus « B » (*herpès simiæ*), recherches parasitaires, y compris amibes, *giardia* ou *œsophagostomes*, et des agents infectieux de l'entérite (*salmonelles*). Ces examens seront pratiqués dès le lendemain de l'arrivée, et, si un traitement a été entrepris, un contrôle de stérilité sur prélèvements est à instituer à la huitième semaine.

La détection d'agents microbiens pathogènes pourra être rendue plus aisée, grâce à l'usage de « tests bactériologiques », tels que le système « API », qui permet, à partir de coprocultures, d'identifier en microtubes et rapidement, des germes (*entérobactéries*, *shigelles* ou *salmonelles*, par exemple).

L'identification des agents, viraux notamment, à l'origine d'infections inapparentes ou latentes, n'est pas généralement à la portée de l'utilisateur des animaux.

Celui-ci doit s'adresser à des laboratoires spécialisés, ou bien disposer de « kits » de détection fiables, encore, semble-t-il, peu répandus en France : c'est le cas de nos petits rongeurs de laboratoire, *rats* et *souris*, pour lesquels la virologie ne peut, actuellement, être faite en France, mais dans deux laboratoires spécialisés, agréés par l'I.C.L.A.S. (International Council for Laboratory Animal Science), l'un à Nimègue aux

Pays-Bas, l'autre à Hanovre, en Allemagne, à partir de sérums en ampoules stériles, congelés, prélevés de préférence sur des femelles anciennes reproductrices [12].

Signalons l'existence des « Murine Antibody Tests » (M.A.T.), pratiqués sur des prélèvement de sang ou de sérum, en vue de détecter la présence d'anticorps, témoins du passage d'agents infectieux, tels que ceux de l'ectromélie, du polyome, le MHV (mouse hepatitis virus), le Reo 3 (reovirus type 3), le PVM (pneumonia virus of mice) ou le virus de Sendai... Il s'agit de tests ELISA de « Bionetics Laboratory Products », et décrits par M. LA REGINA et coll. [4].

La mise en évidence des mycoplasmes fera appel au « mycotect » et au « mycospec » des Bethesda Research Laboratories, permettant, selon les indications du fournisseur, une détection en 5 jours et une identification en quelques heures.

Ces kits de détection sont plus connus désormais chez le *chat* : parmi les tests existants, citons le « Clinease FeLV test », permettant de révéler l'infection par le virus de la leucose féline, affection qui peut décimer les élevages de chats ou gravement affecter leur potentiel de défense contre les infections secondaires.

L'utilisation de révélateurs de l'infection

La vérification, dans le temps, de la permanence du bon état sanitaire d'effectifs d'animaux, outre les résultats des analyses, s'appuiera sur d'autres techniques : il est judicieux de maintenir, au sein d'individus à statut « E.O.P.S. » par exemple, dans les mêmes conditions techniques de stabulation, des animaux spontanément immuno-déprimés tels que des souris « nude », dont on observera attentivement l'état de santé et sur lesquelles seront pratiquées les analyses appropriées.

On peut aussi, dans certains cas, faire appel à des souris « axéniques » pour le contrôle de l'efficacité de la désinfection des locaux d'élevage : cette technique a été décrite en 1976, dans une publication du Dr A. PERROT [10].

Enfin, un certain nombre de tests dits de « stress » et de réactivité ont été préconisés en vue de diminuer les défenses de l'organisme et donc de révéler l'apparition de l'infection latente et d'accélérer son développement.

Dès 1967, R.M. FAUVE, au cours d'un Symposium International, a décrit ces tests qui furent appliqués à la souris « S.P.F.* » [1] par lui-même, à l'Institut Pasteur.

Il s'agit, entre autres, d'administration d'anti-inflammatoires, ou d'exposition aux radiations X ou gamma, de maintenance temporaire

* Specific Pathogen Free.

dans des conditions d'environnement « stressant » tel qu'un séjour à 37° C dans une étuve ventilée, pendant 24 heures.

La survie des animaux est une preuve d'un parfait état de santé de l'animal produit.

Nous avons gardé pour la fin de notre exposé quelques considérations sur trois points particuliers :

- le problème des *vaccinations chez les animaux de laboratoire* ;
- le rappel des *conditions d'hébergement et du matériel recommandé pour le logement des animaux à statut « protégé »* ;
- l'évocation du *risque humain pour l'animal*.

a) *Les vaccinations*

Elles sont recommandées chez l'animal conventionnel et plus spécialement chez les carnivores domestiques : un programme de vaccinations est à instituer pour *chats* et *chiens*, assurant une protection contre les maladies du jeune âge, associé à un déparasitage interne systématique.

Par exemple, pour le *chien*, maladie de Carré, hépatite virale de Rubarth, leptospirose, parvovirose et, si nécessaire, rage.

Par contre, même si les vaccins existent, il est discutable d'entreprendre de vacciner les petits animaux de laboratoire, et ce, pour les raisons suivantes :

- lourdeur du processus compte tenu du nombre généralement élevé des animaux et de la durée de vie limitée de ceux-ci ;
- interférence entre les réactions vaccinales (renforcement des réponses immunitaires par exemple) et les réponses dues à l'expérimentation entreprise, notamment en immunologie.

Cependant, nous citerons pour mémoire l'existence de vaccins contre la maladie de Sendaï, contre le virus de l'ectromélie, contre la myxomatose du lapin, ou encore contre « *bordetella bronchiseptica* » du cobaye [6 et 8].

b) *La maintenance d'un statut sanitaire « protégé » exige l'existence d'installations ou de locaux de qualité équivalente à celle de l'élevage d'origine*

Sans revenir ici sur la conception et la réalisation de la « zone » proprement dite, nous donnerons ici quelques exemples de cages ou équipements spéciaux, propres à constituer, autour de l'animal, un environnement protégé :

- l'isolateur et ses annexes (« incontournable » pour les gnotobiontes) ;
- les cages à couvercles filtrants, en association ou non avec les armoires ventilées pour la maintenance d'animaux à statut « E.O.P.S. » ;

— ou encore les portoirs équipés du PIV-system (positive and individually ventilated caging system) mis au point par Edwin LES au Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, E.U.), et qui permettent une ventilation et une reprise d'air au niveau de chaque cage.

c) *L'homme peut être le responsable de la contamination de l'animal*

Nous avons été à même de le constater à l'occasion d'un cas de tuberculose pulmonaire d'origine humaine chez des singes importés [7].

En général, il convient évidemment de restreindre au maximum les allées et venues des personnes dans les locaux de l'animalerie proprement dite.

Si l'on se réfère aux règles en vigueur au Jackson Laboratory, vis-à-vis des visiteurs et des employés, le port de badges de couleur différente est imposé. La couleur du badge est fonction du risque potentiel que la personne peut faire courir aux animaux et va déterminer quelles zones peuvent être visitées.

Un questionnaire et un interrogatoire par le vétérinaire responsable vont définir le degré du risque selon certains critères, tels que :

- le contact plus ou moins récent avec des animaux de laboratoire ou de compagnie ;
- le contact avec des colonies animales infectées, ou des agents infectieux, ou des tissus non fixés ou des cultures cellulaires. Leur introduction *a fortiori* est strictement réglementée.

J'ajouterai, en ce qui concerne les personnels travaillant au contact de l'animal, la nécessité de visites médicales régulières, dans l'intérêt des deux parties, et la pratique pour eux-mêmes de certaines vaccinations en fonction des risques encourus : B.C.G., tétanos, rage éventuellement.

En conclusion, nous reprendrons à notre compte les règles de contrôle édictées en 1984 lors des 6^{es} Journées Iffa-Credo, par A. LOMBARD [5] :

- Contrôle du *fournisseur* (contrat de « confiance » avec communication des résultats parasitaires, microbiologiques ou de réactivité) ;
- Contrôle, à l'*arrivée*, des animaux, et aussi, des conditions de transport (notion de rupture de barrière et de stress d'adaptation) ;
- Contrôle systématique des lots en élevage comme en stockage ;
- Contrôle des barrières de zone.

Avec cette notion que s'il est inutile d'utiliser une Cadillac pour labourer son champ, par exemple, mettre un animal gnotoxénique dans un milieu conventionnel, il faut tout faire par contre pour « éviter d'introduire le loup dans la bergerie » et se souvenir, avec E. LECLAINCHE, que « le troupeau sain est sacré* ».

* « Principes de Législation Sanitaire », Off. int. Epizooties, 1936.

Statut sanitaire des animaux de laboratoire

Rappel sommaire de terminologie (selon Groupe de Travail « A.F.P.G. »)

Animal à flore « connue » (gnotobionte) :

- Axénique ou sans germes (angl. : Germ-Free)
- Gnotoxénique : contaminé par un ou plusieurs germes connus

- Le milieu de vie : l'isolateur.

Animal à flore « inconnue » (agnotobionte) :

- Hétéroxénique
 - Héberge une flore microbienne *non pathogène*
 - E.O.P.S. ou I.O.P.S. (angl. : S.P.F., C.O.B.S.)
 - S.S.C. (ex : souris à statut sanitaire contrôlé)

- Le milieu de vie :

Milieu contrôlé du point de vue microbiologique.

- Holoxénique
 - Héberge une flore microbienne qui peut être pathogène.
 - Conventionnel.

- Le milieu de vie : local d'hébergement traditionnel.

E.O.P.S. : Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques.

I.O.P.S. : Indemne d'Organismes Pathogènes Spécifiques.

S.P.F. : Specific Pathogen Free.

C.O.B.S. : Cesarean Originated and Barrier Sustained.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FAUVE (R.M.). — S.P.F. Animals — Immunogenetics and comparative susceptibilities to disease (summary of speeches). International Symposium on Laboratory Animals, London, 1966 ; Symp. Series Immunobiol. Standard., vol. 5, p. 52 et 184 (Karger, Basel/New York, 1967).
- [2] Groupe de Travail de l'Association Française pour la Gnotoxénie (A.F.P.G.) - Axénie - Gnotoxénie - Holoxénie - Hétéroxénie : Définitions et commentaires. *Sci. Techn. Anim. Lab.*, 1977, n° 1, 7-8.
- [3] Groupe de Travail de l'Association Française pour la Gnotoxénie (A.F.P.G.) - Définition d'une souris hétéroxénique à statut sanitaire contrôlé (S.S.C.). *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1977, 2, n° 1, 9-11.

- [4] LA REGINA (M.), LEWIGRO (J.), STEFFEN (E.). — A comparison of three ELISA systems for the detection of mycoplasma pulmonis antibody in rats. *Lab. An. Sc.*, 1987, 37, n° 3, 331-334.
- [5] LOMBARD (A.). — Contrôle de la qualité microbiologique des animaux et des conditions d'environnement dans les études de toxicologie : nécessités et limites ? VI^e Journées d'Etudes Iffa-Credo (6-7 déc. 1984). Collection Fondation Marcel Mérieux, 173-192.
- [6] MATHERNE (C.M.), STEFFEN (E.K.), WAGNER (J.E.). — Efficacy of commercial vaccines for protecting Guinea pigs against bordetella bronchiseptica pneumonia. *Lab. An. Sc.*, 1987, 37, n° 2, 191-194.
- [7] MAURIN-BLANCHET (H.). — Illustration de problèmes particuliers à la lutte contre les maladies des animaux de laboratoire : Etude de deux cas cliniques chez des primates et des petits rongeurs. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1976, 85 (9-10), 1011-1022.
- [8] NIKKELS (R.J.), MULLINK (J.W.M.A.). — Bordetella bronchiseptica in Guinea pigs. Description of the disease and elimination by vaccination. *Z. Versuchstierk*, Bd. 13, S. 105-111, 1971.
- [9] PERROT (A.). — Terminologie générale des animaux de laboratoire selon leur état microbiologique. *Bull. A.T.A.L.*, 1972, 2, XIII-XXVII.
- [10] PERROT (A.). — Utilisation de souris axéniques pour le contrôle d'efficacité de la désinfection des locaux d'élevage. *Sci. Techn. Anim. Lab.*, 1976, I, n° 1, 37-42.
- [11] RICHARD (Y.). — Aide-mémoire de pathologie infectieuse des animaux de laboratoire. Suppl. au vol. XI, n° 1, 1^{er} trim. 1986, *Sci. Techn. Anim. Lab.*, 5.
- [12] VAN DER LOGT (J.T.M.). — Serological study on the prevalence of murine viruses in laboratory animal colonies, in France and in the Netherlands (1981-1984). *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1986, 11, n° 3, 197-203.
- [13] VERSTRAETE (A.P.). — Some aspects of the identification of viruses of laboratory rodents and lagomorphs. *J. Inst. An. Tech.*, 1979, 30, n° 1, 3-36.
- [14] WESTON (R.), RICHARDSON (G.). — Laboratory examinations : selected techniques and results. *J. Inst. An. Tech.*, 1977, 28, n° 1, 1-11.
-