

Recommandations
pour la mise en place
et le fonctionnement
d'un établissement
d'expérimentation animale
utilisant
des rongeurs et des
lagomorphes.

GUIDE PRATIQUE

Recommandations pour la mise en place et le fonctionnement d'un Etablissement d'Expérimentation Animale utilisant des rongeurs et des lagomorphes.

Ont collaboré à l'élaboration de ce document :

- **Bernard Andrieux**, Ministère de la Recherche
- **Laurence Bernard-Touami**, Institut Jacques Monod, Université Paris 7
- **Virginie Dangles-Marie**, Centre de recherche Institut Curie
- **Christophe Ferreira**, Université Paris 5
- **Valérie Geoffroy**, Inserm U606, Université Paris 7
- **Cécile Goujet-Zalc**, SEAT, CNRS UPS 44
- **Françoise Helms**, Bureau de la Recherche, Université Paris 7
- **Anne Janin**, Inserm U728, Université Paris 7
- **Anne Joutel**, Inserm U740, Université Paris 7
- **François Lachapelle**, Bureau Expérimentation Animale Inserm
- **Isabelle Le Parco**, Institut Jacques Monod CNRS UMR 7592, Université Paris 7, Paris 6
- **Sébastien Paturance**, CDTA, Orléans, CNRS
- **Marika Pla**, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris 7
- **Brigitte Rault**, Bureau Expérimentation Animale Inserm
- **Armelle Van Es**, Institut de la Clinique de la Souris, Illkirch

Ont collaboré à l'expertise de ce document

- **Denise Aubert**, ENS Lyon
- **Anna Bogdanova**, Université de Lille 1
- **Cécile Calleja**, INRA Strasbourg
- **Jean-Marie Héliès**, Université de Strasbourg
- **Monique Pressac**, Université Paris 5

Sommaire

<i>I - CADRE REGLEMENTAIRE</i>	6
I.1 Les textes	6
I.2 L’Etablissement d’expérimentation animale	6
I.3 Les personnels	6
I.4 Les registres	7
<i>II - LOCAUX ET EQUIPEMENTS</i>	8
II.1 Principales caractéristiques des locaux	8
II.2 Entretien et décontamination des équipements et des locaux	9
II.2.1 Préambule	9
II.2.2 Principaux agents désinfectants et stérilisants	9
II.2.3 Autoclavage	11
II.2.4 Contrôles de stérilisation et de désinfection.....	11
II.3 Equipements	12
II.3.1 Equipements généraux	12
II.3.2 Hébergement des animaux.....	13
<i>III - GESTION SANITAIRE DES ANIMAUX</i>	17
III.1 Statut sanitaire des animaux	17
III.2 Contrôles sanitaires	18
III.2.1. Rappel de quelques définitions et généralités	18
III.2.2. Programme de surveillance sanitaire	18
III.2.3. Organisation des contrôles sanitaires.....	19
III.2.3.1 - <i>Choix des animaux</i>	19
III.2.3.2 - <i>Nombre d’animaux</i>	20
III.2.3.3 - <i>Périodicité des contrôles sanitaires et agents pathogènes à rechercher</i>	21
III.2.4. Méthodes de dépistage.....	22
III.2.4.1 - <i>Sérologie</i>	22
III.2.4.2. - <i>Autopsies et analyses histologiques</i>	23
III.2.4.3 - <i>Cultures bactériennes</i>	24
III.2.4.4 - <i>Examens microscopiques</i>	24
III.2.4.5 - <i>Techniques de biologie moléculaire</i>	25
III.2.4.6 - <i>Cas particuliers</i>	25
III.2.5 Conduite à tenir devant un résultat positif	26
III.2.6 Exemples	28
III.2.6.1 - <i>Détection du virus MHV en fonction du mode d’hébergement</i>	28
III.2.6.2 - <i>Détection du virus Mouse Parvovirus à l’aide de deux méthodes diagnostiques (test ELISA et PCR)</i>	28
III.2.7 Conclusion	29
III.3 Maintien du statut sanitaire des animaux	30
III.4 Gestion des introductions d’animaux et de matériel biologique	31
III.4.1 La quarantaine	31
III.4.2 L’introduction d’animaux.....	32
III.4.3 Introduction de matériel biologique.....	32
III.5 Règles de confinement pour les animaux infectés et génétiquement modifiés	33

IV- ANNEXES.....	35
<i>Annexe 1 Description des niveaux de confinement à mettre en œuvre dans des établissements d'expérimentation animale où sont utilisés des agents biologiques pathogènes ou OGM.</i>	<i>35</i>
<i>Annexe 2 : Interférences des principaux agents infectieux avec les résultats expérimentaux.....</i>	<i>38</i>
<i>Annexe 3: Contrôle sanitaire / exemples d'agents pathogènes murins à rechercher.</i>	<i>45</i>
<i>Annexe 4 : Exemple d'information à recueillir lors de transferts d'animaux</i>	<i>47</i>
<i>Annexe 5 : Dossier type "Armoire ventilée".....</i>	<i>50</i>
<i>Annexe 5.1 Fiche signalétique.....</i>	<i>50</i>
<i>Annexe 5.2. Contrôle et maintenance.....</i>	<i>51</i>
<i>Annexe 5.3. Mode d'emploi.....</i>	<i>52</i>
<i>Annexe 5.4 Mode opératoire : Changement des filtres</i>	<i>52</i>
<i>Annexe 6: Références bibliographiques.....</i>	<i>53</i>

Introduction

En France, un Etablissement d'Expérimentation Animale est une structure dont le statut juridique est défini par le décret 87-848 du 19 octobre 1987. Ce terme recouvre des entités qui peuvent avoir des missions variées et donc des niveaux d'exigence et de contrainte différents les uns des autres. Ces missions peuvent concerner aussi bien la génération, la conservation et l'hébergement d'animaux que leur distribution, ou se réduire parfois à la simple réalisation de protocoles expérimentaux.

L'objectif de ce document est de fournir au responsable d'un Etablissement d'Expérimentation Animale, ainsi qu'aux utilisateurs de cet Etablissement, des informations sur les principes de base concernant l'hébergement des rongeurs et des lagomorphes afin de garantir une expérimentation animale de qualité. Le document proposé fait tout d'abord le point sur les aspects réglementaires auxquels est soumis un Etablissement d'Expérimentation Animale, aborde ensuite les principes d'aménagement et d'entretien des locaux, pour finir sur les moyens de contrôle et de maîtrise du statut sanitaire des animaux. Le lecteur trouvera également en annexe un ensemble de données techniques.

I - CADRE REGLEMENTAIRE

I.1 LES TEXTES

Depuis 1987, le décret n° 87-848 [1] définit les conditions dans lesquelles peuvent être pratiquées les expériences sur des animaux vertébrés. Il a été modifié par le décret 2001-464 du 29 mai 2001 et complété par le décret 2005-264 du 22 mars 2005 [2, 3]. Ces textes sont inclus dans la partie réglementaire du code rural [4]. Enfin, trois arrêtés de 1988 définissent les modalités d'application de ces décrets [5, 6, 7].

I.2 L'ETABLISSEMENT D'EXPERIMENTATION ANIMALE

L'ensemble qui comprend les pièces destinées à héberger les animaux, les pièces de stockage et de service qui sont liées et les pièces où se déroulent les expérimentations (que ces pièces soient contiguës ou éparées), constitue un Etablissement d'Expérimentation Animale (Etablissement). Tout Etablissement doit être agréé par arrêté du préfet du département après la visite conjointe des locaux avec les ministères de tutelle et avis favorable des services déconcentrés du ministère de l'agriculture (direction départementale des services vétérinaires, DDSV). Cet agrément repose sur la conformité des locaux aux dispositions de l'arrêté du 19 avril 1988 [5] : conception, qualité, gestion, espaces, registres..., et la formation appropriée des personnels. L'agrément limite les domaines d'activité, les espèces animales utilisées et les protocoles mis en œuvre. Il est délivré pour cinq ans et renouvelable sur demande écrite.

L'Etablissement est placé sous la responsabilité d'un directeur qui répond du bien-être des animaux et du bon fonctionnement des installations.

I.3 LES PERSONNELS

La législation, qui encadre étroitement l'expérimentation animale, formule des exigences de formations qui sont adaptées aux différents types d'activité des personnels.

Actuellement, on distingue quatre types de formations réglementaires :

- **La formation de niveau I**, destinée aux personnes responsables de projets de recherche qui doivent demander (formulaire cerfa 50-4340) auprès de la DDSV de leur lieu d'activité une "autorisation d'expérimenter sur l'animal vivant". Cette autorisation, personnelle, ne peut être obtenue que sous condition de suivi de cette formation de niveau I et d'une formation initiale d'au moins quatre années d'études supérieures dans les sciences biologiques, ou de deux années d'études supérieures et de cinq années d'expérience professionnelle sous la responsabilité d'une personne bénéficiant d'une autorisation d'expérimenter. L'autorisation d'expérimenter est accordée pour cinq ans dans des limites concernant les domaines, types d'activité et espèces animales utilisées. Elle est renouvelée auprès de la DDSV sur demande écrite de l'expérimentateur. Celui-ci doit également mentionner par écrit toute modification éventuelle de son activité.

- **La formation de niveau II**, destinées aux personnes qui participent directement aux expérimentations sur les animaux de laboratoire. Néanmoins, la pratique des personnes ayant suivi la formation de niveau II ne peut se faire que sous la direction et le contrôle d'une personne titulaire d'une autorisation d'expérimenter dont la responsabilité doit se limiter au contexte d'une équipe.

- **La formation de niveau III**, destinée aux personnels chargés de l'entretien et de l'hébergement des animaux. S'ils participent à l'expérimentation sur animaux vivants, ils devront avoir suivi au préalable une formation de niveau II.

- **La formation particulière à la chirurgie**, obligatoire pour les personnes autorisées à expérimenter qui sont responsables de protocoles incluant des interventions chirurgicales. Les personnels techniques réalisant des actes chirurgicaux sont encouragés à suivre cette formation, mais celle-ci n'est pas exigible dans la mesure où ils pratiquent obligatoirement sous la responsabilité d'une personne formée et autorisée pour la chirurgie.

Si seules les formations réglementaires sont exigibles, il est bien sûr fondamental d'être formé correctement avant d'entreprendre des protocoles impliquant des animaux.

À cette fin, il est recommandé de participer à des formations spécialisées qui permettent à la fois un apprentissage initial et une actualisation des savoir-faire.

I.4 LES REGISTRES

Le registre des entrées-sorties permet d'assurer une traçabilité des animaux utilisés [7]. Il doit être établi aussi bien pour les animaux acquis que pour les animaux nés dans l'Etablissement.

Les Rongeurs peuvent être identifiés par lot dans la mesure où le nombre d'animaux par lot est indiqué sur le registre; ils ne sont alors répertoriés qu'au moment du sevrage. En tête du registre doivent figurer le nom de l'Etablissement, la nature des activités exercées (expérimentation animale), le nom du directeur de l'Etablissement, le nom et la qualification de la personne assurant la responsabilité de l'entretien des animaux hébergés. Le registre doit comporter autant de chapitres qu'il y a d'espèces animales détenues. Il doit être conservé pendant cinq ans.

Le registre de visite sert à consigner tous les événements liés au fonctionnement de l'Etablissement: programme de prophylaxie, anomalie de la climatisation ou de la régulation des paramètres physiques, mortalité anormale des animaux, séquence de désinfection des locaux, entretien des machineries, visites de personnes invitées et dysfonctionnements divers. Il doit être conservé au moins cinq ans.

Le registre des médicaments sert à consigner les entrées et les sorties des médicaments dans le cadre exclusif de la réalisation des protocoles expérimentaux [8]. Ce registre doit être conservé pendant dix ans. Sa tenue est sous la responsabilité d'une personne autorisée à expérimenter qui aura été désignée, par courrier, comme le responsable médicaments auprès de la Direction Départementale des Services Vétérinaires et de l'AFSSAPS.

II - LOCAUX ET EQUIPEMENTS

II.1 PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES LOCAUX

Les différents types de pièces à prévoir dans une animalerie sont:

- Des pièces d'hébergement, de préférence séparées pour chaque espèce animale,
- Des pièces d'hébergement confiné pour les animaux transgéniques ou infectés,
- Un local isolé de quarantaine ou d'acclimatation,
- Des salles d'expérimentation ou d'autopsie séparées des pièces de stabulation,
- Des locaux séparés pour entreposer la nourriture et les litières,
- Un local séparé pour entreposer les cages propres et le matériel nécessaire à l'animalerie,
- Une laverie.

Le revêtement des locaux et du mobilier doit être en matériaux résistants, étanches, facilement lavables et désinfectables. Les accès (portes et fenêtres) doivent protéger l'animalerie de toute intrusion et évasion.

Le système de ventilation et de traitement de l'air (climatisation et filtration) doit permettre de fournir de l'air pur et de le renouveler. Ce renouvellement permet de réduire les odeurs et de diminuer la concentration de gaz toxiques (ammoniac), de poussières (copeaux de sciure) et d'agents pathogènes, sans pour autant induire de courants d'air. Dans les locaux d'hébergement des lapins, il est nécessaire de placer des préfiltres pour éviter la saturation des filtres du système par les poils des animaux. Le système de ventilation et de traitement de l'air devrait être indépendant pour chaque pièce de l'animalerie.

Concernant les conditions d'ambiance à respecter pour le bien-être des animaux, des lignes directrices sont consultables dans l'Annexe A de la Convention STE 123 [9]. A titre d'exemple, il est recommandé d'assurer un renouvellement d'air compris entre 8 et 20 volumes/heure selon la densité d'animaux hébergés et le mode d'hébergement, de maintenir une humidité comprise entre 45% et 65%, une température constante et compatible avec la biologie et la physiologie de chaque espèce (20 à 24°C pour les rats et souris; 15 à 21°C pour les lapins).

II.2 ENTRETIEN ET DECONTAMINATION DES EQUIPEMENTS ET DES LOCAUX

II.2.1 Préambule

Le maintien des locaux dans un état de propreté irréprochable constitue bien entendu un élément clé dans le maintien de l'état sanitaire des animaux. A cet égard, l'utilisation d'un matériel de nettoyage dédié à chaque pièce permet d'éviter les contaminations croisées.

Le **nettoyage** permet l'élimination physique des matières étrangères (poussière, saletés, matières organiques...)

La **décontamination** consiste à éliminer les micro-organismes pathogènes.

Un agent **détergent** (ou agent de surface, détersif, surfactant) est un composé chimique, doté de propriétés tensioactives le rendant capable d'enlever les salissures. L'utilisation d'un agent détergent (détersion chimique) est un élément d'hygiène fondamental puisqu'il permet d'éliminer une grande partie des bactéries présentes sur les surfaces nettoyées.

Un agent **désinfectant** ou **germicide** inhibe ou détruit les micro-organismes tels que bactéries, virus, ou protozoaires à l'exception des spores bactériennes. Un désinfectant est utilisé pour des supports inanimés alors qu'un **antiseptique** inhibe la croissance des micro-organismes sur les tissus vivants.

Un agent **stérilisant** détruit toutes les cellules vivantes, les spores viables et les virus.

Il n'y a pas de désinfection ou de stérilisation efficace sans nettoyage humide préalable à l'aide de détergents.

II.2.2 Principaux agents désinfectants et stérilisants

Il est à noter que plusieurs facteurs peuvent modifier l'efficacité des agents présentés dans le tableau 1, présence de matières organiques (sang, sérum, expectorations), température, humidité relative, concentration et temps de contact. C'est pourquoi il est impératif de suivre les recommandations des notices techniques pour obtenir une action optimale de ces produits.

Tableau 1: Propriétés d'action des principaux agents désinfectants et stérilisants [d'après 10, 11]

Désinfectant	Usages	Avantages	Inconvénients
Alcool (éthanol à 70°)	Désinfectant à niveau d'activité intermédiaire* Désinfection des surfaces	Sans résidus Ne tache pas Pas de péremption	Volatil (en contradiction avec le temps de contact long requis pour l'activité désinfectante) Inactivé par les matières organiques Peut durcir le caoutchouc ou détériorer les colles
Hypochlorite de sodium (eau de Javel)	Désinfectant à niveau d'activité intermédiaire Désinfection des surfaces	Faible coût Actif sur le prion (concentration et temps de contact à adapter)	Corrosif pour les métaux Inactivé par les matières organiques Irritant pour la peau et les muqueuses Durée de conservation limitée pour la solution diluée Sensible à la lumière et à la chaleur
Glutaraldéhydes	Formulations à 2 % Désinfection de haut niveau pour équipement sensible à la chaleur	Non corrosifs pour les métaux Actifs en présence de matières organiques La stérilisation peut se faire en 6 à 10 heures.	Extrêmement irritants pour la peau et les muqueuses La durée de conservation diminue lorsqu'il est dilué (efficacité de 14 à 30 jours selon la formulation) Coût élevé
Composés phénoliques	Désinfectants à niveau d'activité faible ou intermédiaire** Nettoient les sols, les murs et le mobilier	Laissent un film résiduel sur les surfaces Disponibles sur le marché avec ajout de détergents pour un nettoyage désinfection en une seule étape	Peuvent être absorbés par la peau ou le caoutchouc Un usage répété peut rendre collants certains revêtements de sol synthétiques.
Composés d'ammonium quaternaire	En raison de leur pouvoir détergent, ils entrent dans la composition de nombreux produits détergents désinfectants pour sols, surfaces et mobilier. Désinfectants à faible niveau d'activité	Non corrosifs	Utilisation limitée comme désinfectants car peu actifs sur les virus et les spores bactériennes
Formaldéhyde	Sous forme gazeuse, décontamination des locaux en l'absence d'animaux, décontamination du matériel en sas	Faible coût Actif en présence de matières organiques	Cancérogène Toxique Très irritant Odeur piquante Nécessité de calfeutrer les pièces pendant le processus de décontamination Inactif sur le prion (son action le protège même de méthodes ultérieures d'inactivation).
Peroxyde d'hydrogène	sous forme vaporisée, décontamination des locaux (présence possible des animaux selon la concentration utilisée), décontamination du matériel en sas	Oxydant puissant Action rapide Absence de résidus (se décompose en eau et oxygène) Actif sur les œufs d'oxyures et le prion (selon la concentration utilisée) Compatible avec la décontamination du matériel électronique	Incompatible avec les matériaux absorbants (ex cellulose) Nécessité d'un générateur de vapeur
Acide peracétique	Utilisé sous forme gazeuse pour la décontamination des isolateurs	Décomposition inoffensive (eau, oxygène, acide acétique, peroxyde d'hydrogène)	Coût élevé Peut être corrosif pour certains métaux (aluminium en particulier) et certaines matières plastiques (polycarbonates) Activité réduite en présence de matières organiques

*Désinfectant de niveau d'activité intermédiaire : tue les bactéries végétales, la plupart des virus et des champignons mais non les spores

**Désinfectant de faible niveau d'activité : ne tue pas les mycobactéries et les spores

II.2.3 Autoclavage

L'**autoclavage** est une méthode de stérilisation par chaleur humide (l'agent stérilisant étant la vapeur d'eau saturée sous pression) qui permet de stériliser aliment, litière, eau, matériel, et d'inactiver certains déchets (infectieux et/ou OGM) avant leur élimination. Il nécessite un équipement spécifique (autoclave) dont l'achat et le fonctionnement représentent un coût important et dont l'utilisation est réglementée: révision décennale de l'appareil et formation spécifique des utilisateurs (**formation agréée de conducteur d'autoclave**).

Lors de son utilisation il faut choisir le cycle adapté au type de matériel à stériliser (ex : 120°C pendant 20mn pour les cages autoclavables ou l'aliment) et vérifier le bon déroulement de ce cycle (température et durée du plateau de stérilisation). Cette méthode permet l'inactivation des prions (cycle de 18 mn à 134°C).

II.2.4 Contrôles de stérilisation et de désinfection

Les contrôles peuvent se situer à deux niveaux : d'une part en vérifiant le bon déroulement du processus de stérilisation (contrôle des paramètres physiques et chimiques) et d'autre part en contrôlant la stérilité des matériels. Ces contrôles sont réalisés à l'aide d'indicateurs biologiques ou chimiques.

- Indicateurs biologiques

Il s'agit de bandelettes ou ampoules imprégnées de spores bactériennes non pathogènes qui sont introduites **avant stérilisation** dans l'endroit jugé le moins accessible aux agents stérilisants.

A l'issue du processus de stérilisation, les indicateurs sont mis dans des milieux de cultures appropriés susceptibles d'assurer le développement optimal des spores. L'absence de développement de spores témoigne alors de l'efficacité de la procédure de stérilisation.

Après stérilisation, des boîtes de gélose sont mises au contact des surfaces à tester ou ouvertes à l'air ambiant. L'absence de développement de micro-organismes permet de vérifier l'efficacité du processus de décontamination du matériel et des surfaces.

- Indicateurs chimiques

L'utilisation de bandes, bandelettes ou ampoules **introduites avant stérilisation** permettent, par leur changement de couleur, de contrôler les paramètres physiques nécessaires à la stérilisation, mais ne permettent pas de confirmer la destruction totale des germes et des spores.

II.3 EQUIPEMENTS

II.3.1 Equipements généraux

On entend par équipement:

- Le circuit et le système de traitement de l'air,
- Le système de traitement de l'eau,
- Le matériel de stabulation (bac de cages, grilles, couvercles et biberons, isolateurs, portoirs, armoires ventilées),
- Les hottes de change,
- Le matériel de laverie (machine à laver les cages, machine à laver les biberons...),
- Le matériel de décontamination et de stérilisation.

Le maintien d'un bon état sanitaire des animaux hébergés dépend du bon fonctionnement de ces équipements et de leur entretien rigoureux.

La protection des animaux comme celle des expérimentateurs nécessite des locaux dédiés et un matériel adéquat. La manipulation de produits toxiques, chimiques ou radioactifs doit suivre la réglementation en vigueur.

Les équipements doivent faire l'objet d'une maintenance appropriée. Il est également important de mettre en place des dispositifs d'alarme, de secours et de procédures d'urgence en cas de panne. C'est pourquoi il est préconisé d'établir, pour chaque équipement, un dossier technique dont l'objet principal est de fournir :

1. Une fiche signalétique de l'appareil comprenant les marque et modèle, la date de mise en service, le responsable (nom et coordonnées) à contacter pour le service de maintenance en cas de panne (et n° contrat maintenance si besoin), la localisation/implantation et les caractéristiques techniques particulières,
2. Une fiche "contrôle et maintenance" dans laquelle figurent les procédures de mise en service, nettoyage, entretien et contrôle du bon fonctionnement/efficacité ainsi que (si c'est opportun) les produits, réactifs ou consommables nécessaires à son fonctionnement,
3. Une fiche "mode d'emploi",
4. Une fiche "consignes de sécurité" ou "modes opératoires particuliers" si nécessaire,
5. Une fiche "documents associés" contenant (ou indiquant précisément où les trouver) les divers documents utiles se rapportant à l'appareil. Exemple : plan d'ensemble, contrat de maintenance, documents réglementaires ...

Un exemple de dossier pour des armoires ventilées est fourni en [annexe 5](#).

II.3.2 Hébergement des animaux

1. Les objectifs

L'hébergement des animaux doit garantir le bien-être des animaux tout en répondant aux exigences sanitaires et expérimentales. Aussi les cages doivent satisfaire aux critères suivants: transparence (surveillance visuelle des animaux), étanchéité, facilité de nettoyage et de désinfection, résistance aux chocs et aux procédés de nettoyage/désinfection. Différents types de matériaux plastiques (polycarbonate, polysulfone, polyetherimide...) répondent à ces exigences et sont utilisés par les fabricants qui proposent une gamme variée de cages.

2. Les cages

La cage de base, classique, est constituée d'un bac plastique à fond plein, qui sera garnie de litière, recouvert d'une grille en acier inoxydable comprenant une mangeoire et un emplacement pour le biberon. D'un point de vue sanitaire, la dissémination des pathogènes entre des cages de ce type est moins contrôlée (aérosols en particulier), c'est pourquoi on parle de **cage ouverte** (à comprendre ouverte sur l'environnement). La cage classique est souvent utilisée dans le cadre d'un hébergement conventionnel avec en moyenne un change par semaine. Il est cependant possible d'ajouter un couvercle plastique équipé d'un filtre : on parle alors de **cage à couvercle filtrant (fig. 1)**. Le filtre rajoute une barrière physique supplémentaire entre la cage et l'extérieur, réduisant ainsi les risques de contamination des animaux et de l'environnement et la diffusion d'allergènes. En contrepartie, le renouvellement de l'air dans la cage est réduit, avec pour conséquence une élévation des paramètres environnementaux (température, humidité, taux d'ammoniacque et taux de dioxyde de carbone) plus rapide qu'en cage ouverte; d'où la nécessité, avec ce dispositif, d'adapter en conséquence la fréquence du change (1 à 2 fois par semaine selon la densité en animaux).

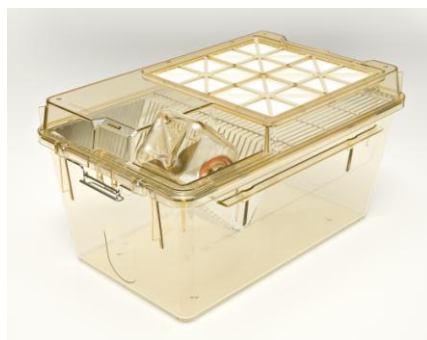


Figure 1 : Cage à couvercle filtrant

3. Les modes d'hébergement

Les cages peuvent être placées sur un portoir simple, dans une armoire ventilée (= enceinte protégée), sur un portoir ventilé ou encore dans un isolateur.

Le portoir simple (fig.2) est généralement constitué d'étagères en acier inoxydable sur lesquelles sont déposées les cages (ouvertes ou à couvercle filtrant). C'est un équipement élémentaire et économique.



Figure 2 : Portoir simple

L'armoire ventilée (fig.3) est une solution intéressante pour la protection sanitaire ou permettre des cycles inversés, même si sa capacité d'hébergement reste limitée comparée à son volume d'encombrement. Elle ajoute une barrière physique entre les cages (micro environnement) et la pièce (macro environnement). Elle est souvent constituée de plusieurs compartiments qui permettent d'isoler des groupes de cages. Elle est munie d'un système de ventilation active propre et doit être impérativement équipée d'un système d'alarme en cas de panne de ce système car toute défaillance interrompant le renouvellement d'air dans les cages peut devenir fatale pour les animaux si elle n'est pas détectée et corrigée rapidement (attention aux week-ends !).



Figure 3 : Armoire ventilée

Avec **le portoir ventilé (fig.4)**, les cages à couvercle filtrant sont ventilées individuellement (IVC = Individually Ventilated Cage) car elles sont, chacune, raccordées à un circuit général qui fournit et extrait en permanence de l'air filtré (filtre HEPA) **(fig.5)**. Les paramètres d'environnement à l'intérieur des **cages ventilées** sont ainsi améliorés par rapport aux cages à couvercle filtrant statique et la fréquence du change peut être ainsi diminuée. Ce système permet une densification du nombre de cages au mètre carré, diminue les risques d'allergies du personnel et de contamination des animaux et de l'environnement. Les cages peuvent être mises en pression positive ou négative selon la cible à protéger du point de vue microbiologique (animaux hébergés et manipulateur ou environnement). Avec ce dispositif, chaque cage est une unité microbiologique **(voir III.2.1)** à part entière à condition de respecter des procédures de manipulations strictes . La cohérence du système implique par conséquent de maintenir également sous barrière les animaux lors d'opérations à risque du point de vue sanitaire: c'est pourquoi le change doit être réalisé sous **hotte (fig.6)** et les manipulations sous PSM.

Figure 4 : Portoir ventilé



Figure 5 : Cage à couvercle filtrant pour portoir ventilé

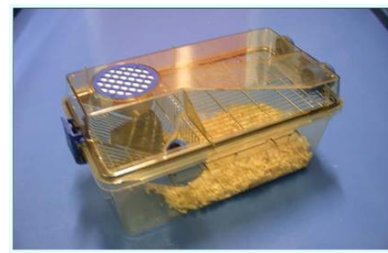


Figure 6 : Hotte de change



L'isolateur (fig.7) est une enceinte de protection à flux turbulent (bioconfinement) qui permet une protection absolue de l'animal, de l'utilisateur et de l'environnement : l'air qui entre dans l'isolateur et l'air évacué sont filtrés par un filtre HEPA ; la manipulation des animaux peut s'effectuer sans rupture du confinement puisque les animaux sont manipulés directement dans l'isolateur à l'aide de manchettes souples avec gants interchangeables. L'isolateur peut fonctionner en pression positive ou négative. La faible capacité d'hébergement en comparaison du volume d'encombrement, l'investissement important du point de vue financier et la charge de travail pour le personnel en limite l'utilisation pour des besoins particuliers (production d'animaux immunodéficients, confinement de niveau 3 ou 4)

Figure 7 : Isolateur



L'hébergement des lapins peut se faire en parcs ou en cages. Lorsque c'est possible, les animaux doivent être stabulés en groupes sociaux harmonieux. Les cages doivent avoir des dimensions et des équipements (tablettes) permettant aux animaux de faire de l'exercice, mais aussi de se cacher. Des sols pleins doivent être préférés aux sols grillagés, pour prévenir les lésions des pattes. Si le choix est fait d'un hébergement sur litière absorbante (sciure de bois non résineux ou papier absorbant), celle-ci doit être changée deux à trois fois par semaine pour limiter les dégagements d'ammoniac. Les zones d'hébergement lapin doivent répondre aux contraintes liées à l'espèce (température, préfiltrations des extractions pour éviter le colmatage des filtres par les poils...

III - GESTION SANITAIRE DES ANIMAUX

Les modalités d'hébergement des animaux dépendent des espèces, du statut sanitaire recherché et des contraintes de sécurité qui découlent des protocoles mis en œuvre: infection par des micro-organismes, induction de modifications génétiques, administration de produits toxiques aux animaux...

III.1 STATUT SANITAIRE DES ANIMAUX

L'obligation faite par la réglementation de maintenir les animaux dans des conditions satisfaisantes et l'intérêt scientifique de maîtriser les interférences entre le statut microbien des animaux et les expérimentations, a amené les professionnels à définir cinq statuts sanitaires différents qui sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Classement des différents statuts sanitaires et des types d'hébergement auxquels ils sont associés.

Statut sanitaire	DEFINITION	Hébergement
1- Holoxénique = conventionnel	Statut des animaux hébergeant une flore microbienne susceptible de renfermer des organismes pathogènes pour l'espèce.	Conventionnel
2- Hétéroxénique = SPF (Specific Pathogen Free) = EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques) = IOPS (Indemne d'Organismes Pathogènes Spécifiques)	Statut des animaux exempts des agents pathogènes majeurs associés à une liste. Le plus souvent celle établie par la FELASA *.	Zone protégée
3- Hétéroxénique SOPF (Specific Opportunistic and Pathogen Free)	Statut des animaux qui n'hébergent ni agent pathogène ni agent opportuniste. Ce statut a été spécialement créé pour les rongeurs immunodéficients.	Recommandé en isolateur en condition stérile
4- Gnotoxénique	Animaux axéniques porteurs d'un ou plusieurs micro-organismes connus non pathogènes.	Isolateur en condition stérile
5- Axénique = germ-free	Animaux indemnes de micro-organismes détectables.	Isolateur en condition stérile

* Recommandations de la «Federation of European Laboratory Animal Science Associations» [12]

Le **statut axénique** est principalement recherché pour le maintien et la décontamination des lignées, le statut **Gnotoxénique**, est surtout recherché en microbiologie.

L'obtention et le maintien des différents statuts présentés dans le tableau 2 passent par un environnement contrôlé (notion de barrière) et par la mise en place d'un programme de surveillance sanitaire des animaux.

III.2 CONTROLES SANITAIRES

III.2.1. Rappel de quelques définitions et généralités

- Une **unité microbiologique** est une entité microbiologiquement indépendante dans laquelle, par convention, tous les animaux possèdent le même statut sanitaire. Selon l'organisation de l'Etablissement, il peut s'agir de la structure dans sa totalité, d'une seule pièce d'hébergement, d'une armoire ventilée, d'un isolateur...
 - La **prévalence** est le pourcentage d'animaux porteurs d'un pathogène donné dans une population.
 - Une **infection** résulte de la présence et de l'activité d'un agent bactérien ou viral.
 - Une **infestation** est une maladie résultant de la présence et de l'activité d'un agent parasitaire.
 - Une **épizootie** est une maladie qui affecte simultanément un grand nombre d'animaux.
 - Une **enzootie** est une maladie qui sévit en permanence dans une population animale.
 - Une **zoonose** est une maladie qui se transmet de l'animal à l'homme et vice-versa.
 - Un **agent opportuniste** est une bactérie, un virus, un champignon ou un parasite normalement non pathogène, mais qui peut le devenir dans certaines circonstances (immunodéficiences innées ou acquises des animaux, surcontamination). Les opportunistes les plus fréquents sont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp.
 - Un **porteur sain** est un animal qui ne présente pas de signe clinique de maladie infectieuse (infection contrôlée) mais qui est potentiellement contaminant. Le nombre d'animaux infectés est souvent très supérieur au nombre d'animaux qui présentent des signes cliniques.
 - Un **réservoir** est un animal porteur pérenne d'un agent pathogène.
- ⇒ Un **vecteur** est un support animé ou inanimé qui permet le transport et/ou la transmission d'un agent pathogène.

III.2.2. Programme de surveillance sanitaire

Il existe quatre raisons fondamentales de réaliser des contrôles sanitaires :

- ✦ Le risque zoonotique,
- ✦ Les performances zootechniques,
- ✦ Les interférences possibles avec les résultats expérimentaux (cf. annexe 2),
- ✦ Les transferts d'animaux ou de matériels biologiques entre les Etablissements.

Chaque Etablissement fixe son niveau de qualité sanitaire (définition d'une liste de micro-organismes indésirables = liste d'exclusion) et met en place des mesures préventives (barrières) afin de l'obtenir et de le maintenir. Le programme de surveillance sanitaire permet de vérifier l'efficacité de ces mesures et permet de savoir si le niveau sanitaire fixé est atteint.

L'observation quotidienne des animaux, obligation première du programme de surveillance sanitaire, n'étant pas suffisante pour détecter des infections ou infestations inapparentes, il est nécessaire de la compléter par la recherche régulière de pathogènes au moyen de méthodes de diagnostic appropriées et à partir d'un échantillon représentatif de la population à surveiller.

Un échange d'informations (résultats expérimentaux non reproductibles, faible taux de reproduction, taux de mortalité élevé, diarrhées ...) entre tous les personnels de l'Etablissement fait également partie intégrante d'un programme de surveillance sanitaire efficace.

III.2.3. Organisation des contrôles sanitaires

Un programme de surveillance sanitaire doit définir le nombre et la qualité des animaux à tester, la périodicité des contrôles à mettre en œuvre, ainsi que la liste des pathogènes à rechercher. Cette liste doit s'appuyer sur les recommandations de la FELASA [12]. **La liste proposée n'est pas une liste d'exclusion obligatoire**, elle définit un ensemble d'agents qu'il est recommandé de dépister, et est susceptible d'être modifiée en fonction de l'évolution des connaissances.

III.2.3.1 - Choix des animaux

Les animaux contrôlés doivent être représentatifs de l'unité microbiologique à surveiller. Il est possible de choisir :

1. Des animaux prélevés au hasard dans l'unité.

Néanmoins il faut savoir que toute modification génétique ou expérimentation sur un animal peut altérer sa réponse immunitaire et donc induire des résultats faux négatifs ou faux positifs lors des analyses basées sur la recherche d'anticorps spécifiques.

2. Des animaux sentinelles.

Cette option présente l'avantage d'éviter le sacrifice d'animaux "précieux". Les animaux sentinelles sont des animaux de lignées non consanguines qui doivent avoir un statut sanitaire SPF, voire SOPF, avant leur introduction dans l'unité à tester. Au moment du contrôle, ils doivent être âgés au minimum de 6 à 8 semaines (pour la sérologie les anticorps d'origine maternelle doivent avoir disparu), et avoir été hébergés au moins 6 voire 9 semaines, dans l'unité à tester. Ils peuvent être mis soit en contact direct avec les autres animaux (passage dans différentes cages avec les risques de dissémination de pathogènes et d'agression que cela comporte), soit en contact indirect par la méthode du "dirty bedding" qui consiste à ajouter dans la cage des animaux sentinelles de la litière souillée provenant des autres cages. Cette méthode peut être optimisée en ajoutant, en plus, des aliments et de l'eau de boisson issus de ces autres cages. Le mode d'exposition indirecte n'est cependant pas très performant pour mettre en évidence certains agents pathogènes comme les virus Sendai, LDV ou CAR Bacillus dont la transmission se fait par contact direct avec l'animal infecté. Dans le cas d'un hébergement conventionnel, il est plus judicieux de placer les animaux sentinelles en bas des portoirs, endroit où l'exposition aux agents pathogènes est optimale.

III.2.3.2 - Nombre d'animaux

Le nombre d'animaux à tester est à adapter, nous allons le voir, en fonction du type d'hébergement et de la taille de l'unité à contrôler. Il est important de noter que si ce nombre est insuffisant, des résultats négatifs ne seront pas représentatifs de la situation sanitaire de la population.

✦ **Hébergement conventionnel (en cages ouvertes)**

La formule proposée par l'ILAR (Institute for Laboratory Animal Research) définit le nombre des animaux à prélever au hasard dans une unité:

$$\text{Nombre d'animaux à prélever} = [\log 0,05 / \log N]$$

Où 0,05 correspond à un intervalle de confiance de 95% et N au pourcentage d'animaux non infectés.

Cette formule repose sur les hypothèses que la population à contrôler est supérieure à 100 animaux, que les animaux des deux sexes sont infectés de la même façon, et que l'agent infectieux est normalement distribué.

A titre d'exemple, pour détecter un agent infectieux présent avec une prévalence hypothétique de 30%, le nombre d'animaux à tester dans une unité est de:

$$[\log 0.05 / \log (1-0.3)] = 8,4 \text{ soit } 9 \text{ animaux.}$$

On choisira comme échantillon représentatif des animaux sevrés (âgés de 3 semaines), des jeunes adultes (entre 10 et 14 semaines) et des adultes âgés de plus de 6 mois [12]. Il faut veiller à ne pas prendre des animaux trop âgés car le taux d'anticorps non spécifiques augmente avec l'âge.

Les infections très contagieuses ayant une prévalence élevée (plus de 50%, comme généralement le MHV) pourront être détectées en testant un nombre d'animaux moins important que les infections peu contagieuses qui présentent, elles, une faible prévalence.

✦ **Hébergement en portoirs ventilés, en cages à couvercle filtrant**

Le prélèvement d'animaux au hasard selon la formule de l'ILAR n'est plus applicable car chaque cage est une unité microbiologique distincte. C'est pourquoi un programme de surveillance qui utilise des animaux sentinelles est le plus approprié. Le nombre d'animaux sentinelles à utiliser est toujours difficile à évaluer. L'objectif est de mettre les sentinelles en contact (direct ou indirect) avec le contenu d'un maximum de cages. Une sentinelle mise en contact avec les litières, l'eau de boisson et les aliments de l'ensemble des cages d'un portoir ventilé, permettra ainsi une évaluation satisfaisante du statut sanitaire des animaux de ce portoir.

✦ **Petit nombre d'animaux hébergés en isolateurs ou en armoires ventilées.**

Selon les lois statistiques, il faut tester un échantillon proportionnellement plus important dans une population de faible effectif par rapport à une population de grande taille pour dépister un agent présent avec la même prévalence dans chacune des deux populations. Dans une petite population, la probabilité de trouver un résultat positif en prélevant des animaux au hasard augmente avec le nombre d'animaux testés. Aussi, du fait de la taille réduite de la population à tester dans le cas des hébergements en isolateurs ou en armoires ventilées et du manque de place, il est recommandé d'introduire 3 à 5 sentinelles et de compenser ce faible nombre en les mettant en contact (direct et/ou indirect) avec le plus grand nombre possible d'animaux ou de litières, d'aliments et d'eau de boisson provenant de cages différentes.

III.2.3.3 - Périodicité des contrôles sanitaires et agents pathogènes à rechercher

Il est préconisé de réaliser des contrôles tous les 3 mois (il est à noter que dans le cas de transfert d'animaux entre établissements un bilan sanitaire de moins de 3 mois est généralement demandé par le destinataire). Cette fréquence peut être modulée selon le fonctionnement de l'Établissement, les pathogènes recherchés et la taille de l'échantillon testé. Par exemple, en cas d'introductions fréquentes d'animaux ou de matériels biologiques dans l'unité, tester 3 à 5 animaux par mois permet de détecter précocement une infection. De la même façon, la recherche du virus MHV, qui est très répandu et interfère fortement avec les résultats expérimentaux, peut être aussi programmée chaque mois.

Dans les Établissements où plusieurs espèces animales sont hébergées, le statut sanitaire de chaque espèce doit être évalué et le bilan sanitaire de chacune doit comporter les résultats positifs de l'ensemble. En effet, certaines infections asymptomatiques pour une espèce peuvent être particulièrement délétères pour une autre (*Bordetella bronchiseptica*, peu pathogène pour le lapin, est très pathogène pour le cobaye).

Chez les animaux axéniques et gnotoxéniques (hébergés en isolateur), il faut surtout rechercher les germes environnementaux (bactéries), car le risque d'introduire des virus ou des parasites est faible. Chez les animaux de statut SOPF, il faut élargir la recherche aux agents opportunistes (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pneumocystis carinii*, *Staphylococcus* sp ...).

Il est important de conserver un historique des résultats, particulièrement pour les agents pathogènes de faible prévalence (ex: *Mycoplasma pulmonis* dont la prévalence est généralement limitée à 30%) et en cas d'hébergement en portoirs ventilés (dissémination plus lente et limitée des agents pathogènes). Lors de transfert d'animaux, cet historique regroupant les résultats sur les 18 derniers mois doit pouvoir être mis à disposition des destinataires.

III.2.4. Méthodes de dépistage

III.2.4.1 - Sérologie

Basée sur la mise en évidence des anticorps, cette méthode est adaptée au dépistage des infections virales, mais elle est inappropriée pour détecter les infections bactériennes.

⇒ **Sensibilité et spécificité des tests sérologiques**

Les quatre situations exposées dans le tableau 3 peuvent se présenter à l'issue d'un test diagnostique : le test peut être positif ou négatif et l'animal testé peut être porteur (animal malade) ou non porteur (animal sain) du pathogène.

Tableau 3 : Cas possibles de résultats de tests sérologiques

	Animal malade	Animal sain
Test positif	Vrai positif	Faux positif
Test négatif	Faux négatif	Vrai négatif

En statistique, la **sensibilité** d'un test est sa capacité de donner un résultat positif lorsque l'animal testé est malade, et sa **spécificité** est sa capacité de donner un résultat négatif lorsque l'animal testé est sain. Ces valeurs sont généralement données en pourcentage.

Sensibilité= vrais positifs/ (vrais positifs +faux négatifs)

Spécificité= vrais négatifs/ (vrais négatifs+faux positifs)

Ainsi, plus un test est sensible plus le nombre de faux négatifs est faible et plus un test est spécifique plus le nombre de faux positifs est faible.

Les tests très sensibles sont surtout utiles pour s'assurer qu'une maladie n'est pas présente (notamment pendant la période de quarantaine).

Ensemble, la sensibilité et la spécificité d'un test donnent une appréciation de sa validité intrinsèque mais elles ne veulent rien dire prises séparément (par exemple un test avec une sensibilité de 95% n'a aucune valeur si sa spécificité n'est que de 10%).

La spécificité d'un test dépend principalement de l'antigène utilisé et de son mode de préparation (purification ...). Par exemple l'antigène NS-1 (protéine de l'enveloppe commune à tous les parvovirus) utilisé dans les tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ne permet pas de caractériser les différentes espèces de parvovirus mis en évidence.

En général, l'ELISA et l'IFA (immunofluorescence indirecte) sont des tests plus sensibles mais moins spécifiques que le test de l'HAI (hem-agglutination inhibition). D'autres techniques comme le western-blot sont performantes, mais ne sont pas utilisées en routine pour des raisons techniques et financières.

⇒ **Limites des tests sérologiques**

a. Cas de résultats négatifs :

Le résultat d'un test sérologique peut être négatif sur un animal infecté testé en période d'incubation, trop jeune, immunodéficient ou immunotolérant.

De plus, le fait de réaliser des pools de sérums peut faire passer le titre en anticorps ainsi dilués sous le seuil de détectabilité du test et conduire à un résultat négatif. C'est la raison pour laquelle il n'est pas conseillé de mélanger les sérums.

b. Cas de résultats positifs

Des résultats positifs peuvent être obtenus chez des animaux non infectés mais atteints d'une maladie auto-immune, ou inoculés avec du matériel biologique, ou encore porteurs d'anticorps maternels. On parle de faux positifs. L'existence de réactions croisées (par exemple entre le virus Sendai et Paramyxovirus humain, ou entre Hantavirus et Mycoplasma pulmonis peut également conduire à des résultats faux positifs. Enfin, des erreurs techniques (par exemple contamination de l'échantillon par un échantillon contrôle positif) sont toujours possibles.

En résumé, en prenant en compte tous ces éléments, il apparaît qu'un seul résultat sérologique positif pour un agent pathogène donné n'est pas significatif et nécessite la mise en place de procédures de confirmation (utilisation d'une autre méthode diagnostique sur le même prélèvement, tests sur de nouveaux échantillons, contrôle recommandé par un autre laboratoire de diagnostic).

III.2.4.2. - Autopsies et analyses histologiques

Les animaux testés dans les contrôles, les animaux malades ou trouvés morts devraient être systématiquement autopsiés afin de mettre en évidence des lésions macroscopiques dont l'histopathologie, dans le cas de lésions pathognomoniques, pourra déterminer l'étiologie.

⇒ **Limites de l'autopsie et des analyses histologiques :**

Beaucoup d'agents pathogènes des animaux de laboratoire sont cliniquement silencieux et causent peu ou pas de lésions visibles (ex : Mouse Parvovirus, MHV) et ce d'autant plus que les animaux sont immunocompétents.

Il est possible de procéder à des colorations histologiques spécifiques (ex : Steiner pour la détection d'*Helicobacter* ou *Clostridium piliformis*) mais elles ne permettent pas toujours d'identifier les espèces bactériennes et sont lourdes à mettre en œuvre.

III.2.4.3 - Cultures bactériennes

Elles permettent l'isolement des micro-organismes par l'utilisation de milieux de culture sélectifs et non sélectifs pour la croissance. Les micro-organismes sont ensuite identifiés d'après leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques.

⇒ **Limites des cultures bactériennes**

Certains kits, type "galeries API", destinés aux cultures bactériennes humaines ne permettent pas d'identifier les souches bactériennes des animaux de laboratoire, telles que *Pasteurella* et *Citrobacter rodentium*. Ces galeries peuvent toutefois être utilisées pour une première approche d'identification.

Certaines bactéries sont très difficiles à cultiver, telles que *Clostridium piliformis*, *Helicobacter* sp. et *Streptobacillus moniliformis*. De plus, certains agents pathogènes ne sont pas retrouvés dans les lésions qu'ils ont induites (ex: *Citrobacter rodentium*).

III.2.4.4 - Examens microscopiques

La recherche des parasites externes et internes chez les animaux de laboratoire se fait par une combinaison de techniques: observation directe à la loupe binoculaire (pelage, contenu intestinal), technique de flottaison, scotch test. Pour les nématodes, il est nécessaire de croiser ces différentes techniques en raison des différentes phases de leur cycle de vie (adultes, larves et œufs) et des différents sites de colonisation chez leur hôte.

⇒ **Limites des examens microscopiques :**

Les animaux âgés sont moins sensibles aux endoparasites, c'est pourquoi il est préférable de choisir des animaux jeunes (3 à 5 semaines) pour la détection des parasites. La technique employée doit tenir compte du cycle de vie du parasite recherché: par exemple, le "scotch test" sur la région péri anale est inapproprié pour mettre en évidence les œufs d'*Aspicularis tetraptera* qui doivent être recherchés par examen direct du contenu cœcal ou par la technique de flottaison.

III.2.4.5 - Techniques de biologie moléculaire

Elles comprennent les techniques de PCR, RT-PCR, Q-PCR et puces à ADN ou ARN qui sont basées sur la mise en évidence directe du matériel génétique des pathogènes. Elles permettent d'obtenir une réponse rapide et spécifique et de savoir si un animal est porteur d'un pathogène défini (il est à noter que les animaux immunodéficients infectés sont des porteurs excréteurs chroniques). La PCR est actuellement la seule méthode pour identifier les espèces d'*Helicobacter*, dont *hepaticus*, *bilis* et *typhlonicus*. La PCR est à combiner avec les méthodes traditionnelles pour confirmer ou infirmer des résultats positifs (ex: pour le Parvovirus, la PCR à partir de nœuds lymphatiques mésentériques permet de confirmer un résultat positif en ELISA). Enfin la PCR permet de tester le matériel (cages) et l'environnement (filtres de la pièce d'hébergement).

⇒ **Limites des techniques de biologie moléculaire**

Ces techniques sont difficilement applicables en routine pour tester un grand nombre d'animaux et il faut connaître les tissus cibles pour chaque agent pathogène recherché. De plus, certains agents pathogènes peuvent persister à l'état latent dans l'organisme (excrétions intermittentes).

▪ Faux négatifs

On peut observer des résultats faussement négatifs si la qualité des échantillons n'est pas bonne (rendement insuffisant dans l'extraction des acides nucléiques, dégradation des acides nucléiques, présence de contaminants inhibant la réaction PCR...), si la méthodologie utilisée n'est pas correcte (amorces oligonucléotidiques choisies dans une séquence délétée) ou bien encore si le tissu analysé n'est pas approprié.

▪ Faux positifs

La moindre contamination de l'échantillon, dans la mesure où la PCR est une méthode très sensible, peut donner un résultat positif.

III.2.4.6 - Cas particuliers

Chez les rongeurs immunodéficients, innés ou acquis (après irradiation), ou chez les animaux génétiquement modifiés avec des répercussions sur le système immunitaire connues ou ignorées de l'expérimentateur, les techniques sérologiques sont inappropriées. Il faut dans ce cas utiliser des techniques de biologie moléculaire (type PCR et RT-PCR) et rechercher des lésions plus fréquemment que chez les animaux immunocompétents.

Chez les lapins, hébergés en groupes de taille réduite, la méthode la plus adaptée est l'analyse de sérums et de prélèvements (fèces, urine, sécrétions nasales...) issus de tout ou partie de la population hébergée.

Il peut exister une importante variabilité entre les résultats des différents laboratoires de diagnostic, c'est pourquoi il est recommandé à l'Etablissement de s'assurer de la "démarche qualité" des prestataires qui effectuent les tests : si le prestataire n'est pas certifié (ISO série 9000 ou EN 45001), il est judicieux de s'assurer qu'il suit au minimum les recommandations de la FELASA. La "démarche qualité" implique que les procédures soient écrites, détaillées et accessibles.

III.2.5 Conduite à tenir devant un résultat positif

Dans le cadre du programme de surveillance sanitaire, l'Etablissement doit avoir défini son propre plan d'urgence en cas de détection d'agents pathogènes; plan qui nécessite l'intervention d'une personne compétente capable d'interpréter les résultats des contrôles et de mettre en œuvre les mesures adaptées.

Il faut garder à l'esprit qu'un contrôle négatif ne garantit pas de manière absolue l'absence des pathogènes recherchés dans la population: il indique leur absence sur les animaux testés, d'où l'importance du choix de ces animaux pour représenter au mieux la population.

Pour déterminer la conduite à tenir dans le cas de résultat positif confirmé, il importe de prendre en considération les questions suivantes :

1) *Le micro-organisme mis en évidence, fait-il partie de la liste d'exclusion de l'Etablissement ?*

Chaque Etablissement détermine ses objectifs sanitaires et par conséquent sa liste d'exclusion de micro-organismes. Le programme de surveillance sanitaire peut ne pas se limiter à la liste d'exclusion. La détection, par exemple, d'un germe opportuniste est sans incidence sur le statut SPF des animaux, et, en pratique, il est inutile de réaliser une décontamination dans une animalerie conventionnelle suite à la présence d'amibes. De même, en l'absence de symptôme clinique, la présence de bactéries ne justifie pas systématiquement un traitement antibiotique.

2) *Existe-t-il des interférences potentielles avec les expériences mises en œuvre ?*

Il incombe à chaque expérimentateur d'identifier avec la personne compétente les interférences possibles entre les pathologies et ses résultats expérimentaux.

3) *Des manifestations cliniques sont-elles présentes?*

4) *Existe-t-il un risque pour l'Homme ?*

En cas de réponse affirmative à l'une de ces questions, des mesures d'élimination du pathogène doivent être prises. Selon l'agent pathogène et son mode de transmission, il peut s'agir d'un traitement médicamenteux (ex : lors de parasitisme) ou d'un arrêt momentané de la reproduction (ex: en présence de MHV ou de virus Sendai).

La mesure d'élimination la plus efficace de l'agent pathogène est la décontamination des lignées (par césarienne aseptique, transfert d'embryons, FIV ou ICSI) associée à une désinfection du matériel et des locaux et à la mise en place d'un vide sanitaire (absence d'animaux pendant une durée adaptée à la survie dans le milieu du pathogène identifié).

⇒ **La césarienne aseptique**

Cette méthode consiste à pratiquer une hystérectomie aseptique sur une femelle, contaminée avérée ou supposée, et à faire élever les nouveaux-nés par une femelle nourrice de statut sanitaire contrôlé. Cette méthode nécessite une synchronisation entre l'hystérectomie (qui doit être pratiquée le plus près possible de la date présumée de mise- bas) et la mise- bas de la nourrice, dont les petits sont euthanasiés.

L'hystérectomie aseptique n'empêche cependant pas le passage éventuel de pathogènes à transmission verticale (de la mère au fœtus) comme *Mycoplasma pulmonis*.

⇒ **Le transfert d'embryons**

La méthode consiste à accoupler un mâle fertile avec une femelle superovulée par un traitement hormonal permettant d'augmenter le nombre d'ovocytes produits et de synchroniser son cycle ovarien avec celui de la femelle receveuse. Les oviductes contenant les embryons sont prélevés par l'expérimentateur, les embryons sont ensuite récupérés et lavés dans des bains successifs de milieu approprié de façon à ce que d'éventuels contaminants soient éliminés par dilution. Ils sont réimplantés par chirurgie aseptique dans l'infundibulum de la femelle pseudo gestante (obtenue par accouplement avec un mâle vasectomisé) de statut sanitaire contrôlé.

Le transfert d'embryon est la technique à privilégier pour décontaminer des lignées infectées par un agent pathogène passant la barrière placentaire (Helicobacter, Pasteurella, LCM, KRV...). Son efficacité vis-à-vis des mycoplasmes est plus incertaine.

⇒ **La fécondation in vitro (FIV)**

Le sperme est récolté sur des mâles de la lignée à décontaminer; il peut être utilisé directement ou congelé. Des ovocytes sont produits par des femelles superovulées et mis en contact direct avec le sperme. Après 48h à 72h de culture, les morulas sont réimplantées dans des femelles pseudo gestantes. Toutefois les rendements de FIV sont faibles et certaines lignées sont réfractaires.

⇒ **La fécondation in vitro par Intra Cellular Sperm Injection (ICSI)**

Cette méthode consiste à injecter la tête d'un spermatozoïde dans un ovocyte. Elle donne d'excellents rendements, toutefois elle nécessite un équipement lourd et une très bonne maîtrise de la micro-injection.

Dans tous les cas de contamination avérée, il faut rechercher l'origine de la contamination afin de prévenir les récurrences. La présence d'agents opportunistes, comme d'agents pathogènes, indique une rupture de barrière sanitaire et impose une révision des procédures de fonctionnement (circulation du personnel, tenue vestimentaire spécifique, nettoyage du matériel...).

Par ailleurs, une **cryoconservation systématique des lignées précieuses** est vivement recommandée de façon à pouvoir redémarrer rapidement l'élevage d'une lignée en cas de contamination.

III.2.6 Exemples

III.2.6.1 - Détection du virus MHV en fonction du mode d'hébergement

Dans le cas d'un hébergement en cages ouvertes (population supérieure à 100 animaux), la prévalence du MHV (agent pathogène très contagieux) sera d'au moins 50%. D'après la formule ILAR, le prélèvement au hasard de 5 animaux ($\log 0,05 / \log 0,5$) dans l'unité devrait être suffisant pour mettre en évidence l'infection.

Dans le cas d'un hébergement en portoirs ventilés, la dissémination des pathogènes étant plus lente, on peut considérer que la prévalence du MHV sera d'environ 10%. Si on applique la formule ILAR en remplaçant le nombre d'animaux par le nombre de cages (qui doit être supérieur à 100) et en considérant que dans chaque cage (unité microbiologique) 4 animaux sur 5 sont contaminés (soit 80%), la prévalence du MHV est donc $0.1 \times 0.8 = 0,08$.

$$\log 0,05 / \log (1-0,08) \approx 36 \text{ cages}$$

Il faudrait donc prélever une souris dans au moins 36 des cages du portoir pour détecter le MHV dans l'unité!! L'utilisation d'animaux (une ou plusieurs sentinelles) permettant de tester (par contact direct ou indirect) au moins 36 cages du portoir sera donc plus réaliste!

III.2.6.2 - Détection du virus Mouse Parvovirus à l'aide de deux méthodes diagnostiques (test ELISA et PCR)

Le tableau 4 présente les quatre situations possibles

Tableau 4

Cas	ELISA	PCR
1	+	+
2	+	-
3	-	+
4	-	-

Interprétation

- Cas 1 : l'animal testé a été exposé au Mouse Parvovirus et a eu le temps de développer un titre suffisant d'anticorps détectable par ELISA (une autre méthode sérologique, IFA ou HAI, pourrait le confirmer) et la PCR effectuée sur les nœuds lymphatiques a mis en évidence la présence du virus: **l'excrétion virale est très probable.**
- Cas 2 : l'animal a été exposé au Mouse Parvovirus et a eu le temps de développer un titre d'anticorps détectable par ELISA (une autre méthode sérologique, IFA ou HAI, pourrait le confirmer) et, le résultat PCR négatif indique que l'animal n'est **probablement pas excréteur du virus au moment du test.** Cependant, un animal adulte immunocompétent infecté par le Mouse Parvovirus peut présenter des phases intermittentes d'excrétion virale
- Cas 3 : l'animal n'a pas eu le temps de développer des anticorps détectables par ELISA ou est immunodéficient et le résultat PCR positif indique que l'animal est en infection aiguë (ou en infection chronique s'il est immunodéficient) : **l'excrétion virale est donc très probable.**
- Cas 4 : L'animal n'a pas développé un taux d'anticorps détectables par ELISA (une autre méthode sérologique, IFA ou HAI, pourrait le confirmer) et la PCR ne met pas en évidence la présence du virus : **l'animal n'est pas infecté.**

Cette illustration souligne l'importance, en période de quarantaine :

- a. De croiser les méthodes diagnostiques (pour éviter surtout les faux négatifs),
- b. De ne pas introduire trop vite les animaux (un minimum de 10 à 15 jours est indispensable pour l'observation d'une séroconversion),
- c. De connaître le statut immunitaire de l'animal (risque de faux négatif en sérologie pour un animal immunodéficient),
- d. De connaître les particularités de l'agent pathogène recherché: dans le cas du Mouse Parvovirus, il y a des périodes intermittentes d'excrétion virale chez un animal adulte immunocompétent infecté, le temps de séroconversion est long (minimum 6 semaines) et la souche C57Bl6 est résistante à ce virus (peu ou pas de séroconversion).

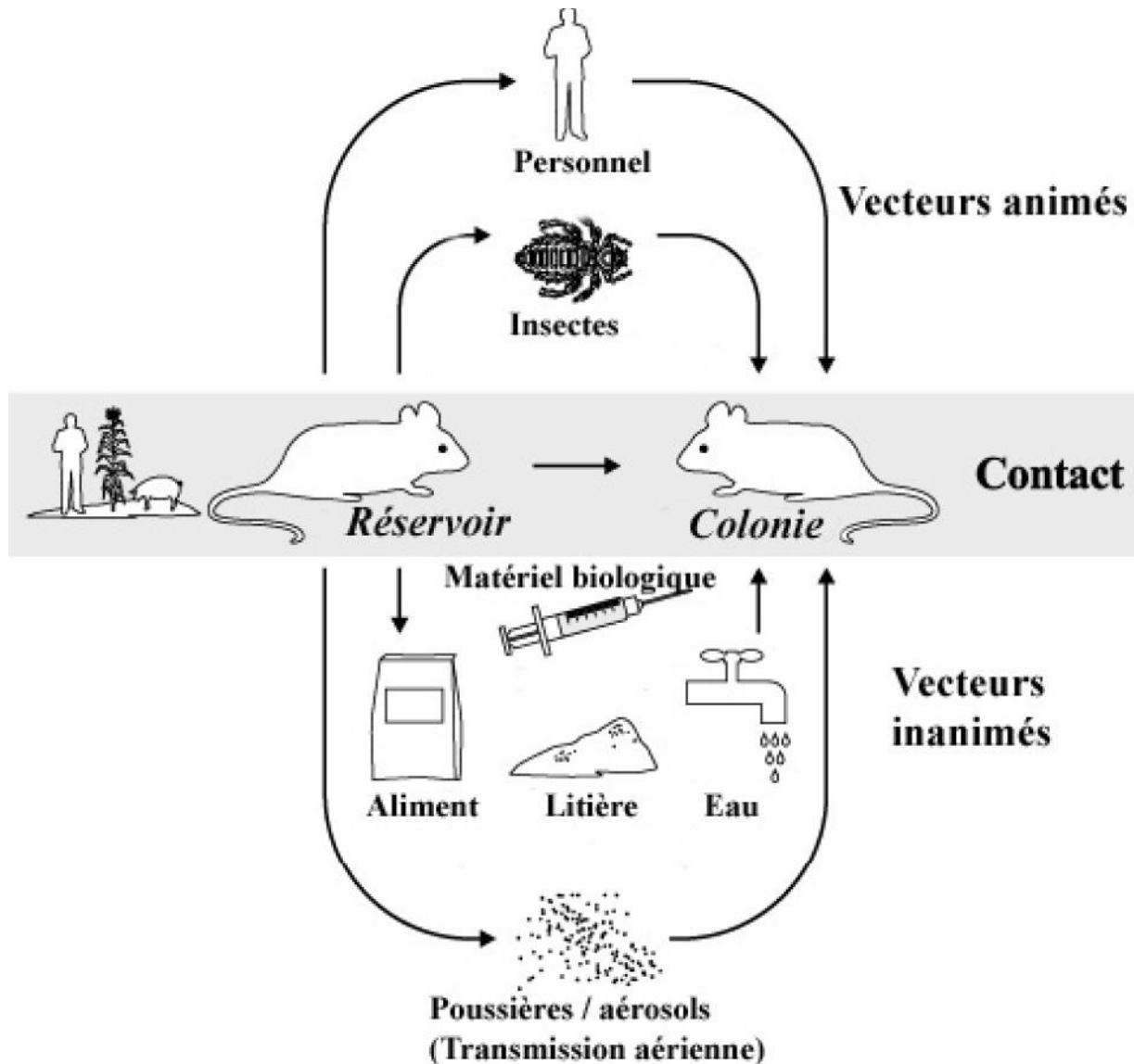
III.2.7 Conclusion

Il est préférable de privilégier la prévention des risques sanitaires plutôt que d'avoir à éradiquer un agent pathogène. Le programme de surveillance sanitaire doit être établi en fonction des besoins. Le budget à prévoir pour les contrôles sanitaires est certes très important, mais, l'impact des agents pathogènes qui interfèrent avec le résultat des expériences est lui aussi très coûteux.

III.3 MAINTIEN DU STATUT SANITAIRE DES ANIMAUX

La transmission d'un agent pathogène de son réservoir vers une population d'animaux (colonie dans la fig.8) peut avoir lieu par contact direct (entre animaux) et/ou indirect (par des vecteurs animés ou inanimés). Les sources de contamination sont multiples: rongeurs contaminés, insectes, personnel, matériel, aliment, eau... et les voies de transmission sont variées : oro-fécale, placentaire, aérienne ... (fig. 8).

Figure 8 : Sources de contaminations des rongeurs et lagomorphes de laboratoire



Afin de conserver le statut sanitaire choisi pour les animaux, des mesures doivent être mises en place dans l'organisation de l'Etablissement. Des "barrières efficaces" doivent empêcher l'intrusion de rongeurs sauvages et d'insectes. Un bon renouvellement d'air est indispensable (ventilation efficace). La mise en place de pressions contrôlées dans les différents locaux permet de réduire la dissémination des agents pathogènes: une surpression limite les risques de contamination extérieure (recommandée pour une zone SPF) et une dépression limite la propagation de micro-organismes dans l'environnement (recommandée pour une zone de quarantaine ou une zone confinée).

L'accès de l'Etablissement doit être strictement limité au personnel autorisé; les personnes qui y pénètrent doivent revêtir une tenue propre comportant **au minimum** une blouse, des gants, un masque, une charlotte et des surchaussures. Des protections supplémentaires (change complet, combinaison...) peuvent être nécessaires en fonction du niveau de confinement ou de protection de l'Etablissement souhaité. Les locaux doivent être maintenus dans un état satisfaisant de propreté. Tout matériel et consommable entrant dans l'animalerie (litière, nourriture, cage, eau, instruments chirurgicaux...) doit être convenablement décontaminé au préalable. Les animaux doivent toujours être manipulés avec des gants fins. La circulation du personnel et du matériel doit se faire du secteur propre vers le secteur sale.

III.4 GESTION DES INTRODUCTIONS D'ANIMAUX ET DE MATERIEL BIOLOGIQUE

L'introduction d'animaux vivants ou de matériel biologique constitue un risque de contamination important qu'il est nécessaire de maîtriser. Là encore, il incombe à chaque Etablissement de définir sa limite de tolérance en matière d'interférences statut sanitaire/programmes de recherche.

III.4.1 La quarantaine

D'une manière générale, il est préférable de réaliser une période d'isolement et d'évaluation de l'état de santé des animaux dans un local de quarantaine avant de les introduire dans l'animalerie. Ce local doit être séparé du reste des locaux tant d'un point de vue physique (un sas et une dépression) que d'un point de vue fonctionnel. Un hébergement dans un isolateur ou un portoir ventilé en dépression est préférable.

Un contrôle sanitaire doit être réalisé généralement à partir d'animaux sentinelles testés après un minimum de deux semaines d'exposition avec les animaux en quarantaine (une durée de quatre à huit semaines est cependant conseillée). Si le résultat du contrôle est satisfaisant, les animaux pourront être introduits. Dans le cas contraire, une dérivation par césarienne ou par transfert d'embryons sera nécessaire.

III.4.2 L'introduction d'animaux

Trois cas de figure peuvent se présenter :

1. **Les animaux sont de statut sanitaire connu et compatible avec l'Établissement:** ils proviennent le plus souvent d'éleveurs agréés (les animaux sont produits dans des zones SPF ou SOPF). La quarantaine peut alors se réduire à une période d'acclimatation des animaux avant leur utilisation.
2. **Les animaux proviennent d'un établissement qui maintient ses animaux sous barrière et présente un dossier sanitaire satisfaisant.** Celui-ci devrait comprendre l'historique des contrôles (au minimum les trois derniers réalisés). En complément de ce bilan, il est souhaitable de connaître les modalités du programme de surveillance sanitaire, l'organisation et le fonctionnement de l'établissement fournisseur, ainsi que les éventuels traitements médicamenteux qui ont pu être mis en place (cf. annexe 4).

La quarantaine correspond à une période d'acclimatation pendant laquelle un contrôle de l'état sanitaire des animaux est préconisé.

3. **Les animaux sont de statut sanitaire inconnu : *c'est une situation dangereuse qu'il faudrait éviter.*** Le mieux est d'effectuer une décontamination par césarienne aseptique ou un transfert d'embryons assorti d'une congélation de sécurité. A défaut, les animaux doivent obligatoirement être mis en quarantaine, isolés de manière très stricte, et testés sachant qu'il est très difficile d'apprécier l'état sanitaire de l'ensemble des animaux introduits au vu d'une seule série d'analyses.

III.4.3 Introduction de matériel biologique

L'utilisation de matériel biologique (tumeurs, sperme, cellules, sérum...) peut conduire à l'introduction d'agents pathogènes. C'est pourquoi il est préférable de tester ce matériel avant toute expérimentation ou, au minimum, de mener les expérimentations en strict confinement jusqu'à ce qu'il soit testé et confirmé non contaminé.

Le matériel biologique est testé par la technique "d'antibody production test" qui consiste à injecter ce matériel à un animal, puis rechercher la présence d'anticorps dans le sérum. Cependant, ces tests sont longs (temps de séroconversion de l'animal inoculé) et coûteux. Ils ne permettent que la recherche des virus des rongeurs, or certains animaux de laboratoire peuvent avoir été contaminés involontairement avec des agents pathogènes humains (ex. des souris SCID qui peuvent héberger EBV et Chlamydia). L'alternative à ces tests repose sur le diagnostic moléculaire par PCR ou RT-PCR directe sur le matériel biologique qui permet aussi la détection des agents pathogènes humains (ex: HIV, HBV, HCV, EBV ...).

III.5 REGLES DE CONFINEMENT POUR LES ANIMAUX INFECTES ET GENETIQUEMENT MODIFIES

Les animaux infectés par des agents biologiques pathogènes sont classés en quatre groupes en fonction de l'agent pathogène qu'ils hébergent et du risque que celui-ci représente pour l'Homme.

- ✦ **Le groupe 1** comprend les agents biologiques non pathogènes pour l'Homme.
- ✦ **Le groupe 2** comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie chez l'Homme; leur propagation dans la collectivité est peu probable; il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace.
- ✦ **Le groupe 3** comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie grave et contagieuse chez l'Homme; il existe une prophylaxie et/ou un traitement efficace.
- ✦ **Le groupe 4** comprend les agents biologiques qui provoquent des maladies graves et très contagieuses chez l'Homme; il n'existe généralement ni prophylaxie médicamenteuse ni traitement efficace contre ces agents.

Les animaux génétiquement modifiés sont actuellement répartis en quatre classes par la Commission de Génie Génétique (CGG) en fonction de l'importance du risque qu'ils présentent ([tableau 5](#)). Selon la CGG, un organisme génétiquement modifié (OGM) recouvre toute entité biologique non cellulaire, cellulaire ou multicellulaire, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique, et dont les caractéristiques ont été modifiées autrement que par multiplication ou recombinaison naturelle.

Concrètement, un animal génétiquement modifié est un animal dont le génome a été modifié autrement que par mutation spontanée.

Les règles de confinement sont adaptées aussi bien aux animaux infectés expérimentalement qu'à ceux qui sont génétiquement modifiés.

Tableau 5 : Classement et exigences de confinement des rongeurs et lagomorphes OGM ou infectés par des agents pathogènes (d'après la CGG).

Classe des animaux	Définition	Confinement physique (L1, L2, L3, L4, Annexe 1)
Classe 1	Abritant un gène ne leur conférant aucun effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou ne relargant jamais de particules virales ou tout au plus de classe 1 ou infectés par un agent pathogène du groupe 1	<u>Animalerie A1</u> : conditions habituelles d'élevage avec des barrières physiques limitant intrusion et évasion.
Classe 2	Abritant un gène mobilisable ayant un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou conférant à l'animal un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou relargant des particules virales de classe 2 ou infectés par un agent pathogène du groupe 2	<u>Animalerie A2</u> : conditions définies pour l'animalerie A1 et les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L2 s'ils relarguent des particules virales et tous les animaux sont autoclavés et incinérés
Classe 3	Relargant des particules virales de classe 3 ou infectés par un agent pathogène du groupe 3	<u>Animalerie A3</u> : conditions définies pour l'animalerie A1 et les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L3 et tous les animaux sont autoclavés en sortie de zone et incinérés
Classe 4	Relargant des particules virales de classe 4 ou infectés par un agent pathogène du groupe 4	<u>Animalerie A4</u> : conditions définies pour l'animalerie A1 et les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L4 et tous les animaux sont autoclavés en sortie de zone et incinérés

IV- ANNEXES

ANNEXE 1 DESCRIPTION DES NIVEAUX DE CONFINEMENT A METTRE EN ŒUVRE DANS DES ETABLISSEMENTS D'EXPERIMENTATION ANIMALE OU SONT UTILISES DES AGENTS BIOLOGIQUES PATHOGENES OU OGM.

Les normes de confinement des laboratoires (L1, L2, L3, L4) ont été transposées en normes de confinement des animaleries (A1, A2, A3, A4)

(Tableau adapté des recommandations de la Commission de Génie Génétique, janvier 2000)

MESURES DE CONFINEMENT	NIVEAUX DE CONFINEMENT			
	L1=A1 Prescription	L2=A2 Prescription	L3=A3 Prescription	L4=A4 Prescription
a) Conception du laboratoire				
1. Signalisation du laboratoire (pictogramme "danger biologique").	non	oui	oui	oui
2. Laboratoire séparé des autres locaux au moins par porte.	oui	oui	oui	oui
3. Accès au laboratoire <i>via</i> un sas	non	non	oui	oui
4. Accès réglementé et verrouillable. Accès possible pour les seuls travailleurs autorisés	non	non	oui, par un sas	oui, par un sas
5. Possibilité de fermer hermétiquement le lieu de travail pour permettre la désinfection (fumigation).	non	optionnel	oui	oui
6. Filtration de l'air extrait du lieu de travail	non	non	oui, filtre HEPA	oui, double filtre HEPA
7. Filtration de l'air entrant dans le lieu de travail.	non	non	optionnel	oui
8. Présence d'une fenêtre d'observation ou d'un système équivalent permettant de voir les occupants.	non	non	oui	oui
9. Moyen de communication avec l'extérieur.	non	non	optionnel	oui
10. Maintien d'une pression négative dans le laboratoire par rapport aux zones voisines.	non	non	oui (2)	oui
11. Alarme pour détecter tout changement inacceptable de la pression de l'air.	non	non	oui	oui
12. Approvisionnement en énergie électrique de secours.	non	non	optionnel	oui
13. Système de ventilation de secours.	non	non	non	oui
b) Aménagements internes				
1. Poste de sécurité microbiologique.	non	oui, type II	oui, type II	oui, type II ou type III

MESURES DE CONFINEMENT	NIVEAUX DE CONFINEMENT			
	L1=A1 Prescription	L2=A2 Prescription	L3=A3 Prescription	L4=A4 Prescription
1. Vêtement de protection.	oui	oui	Vêtements adaptés et surbottes	Change complet avant entrée et sortie du laboratoire
2. Aménagements pour ranger les vêtements de protection dans le laboratoire	non	oui	oui	oui
3. Douche pour décontaminer les travailleurs.	non	non	optionnel	oui
4. Lavage des mains : lavabos avec robinets pouvant être manoeuvrés sans les mains.	non	oui (1)	oui	oui
5. Résistance des surfaces à l'eau, nettoyage aisé sans endroits inaccessibles au nettoyage.	oui (sols)	oui (sols)	oui (sols, murs et plafonds)	oui : murs, plafonds, sols, résistants aux nettoyants chimiques
6. Surface des paillasse imperméable à l'eau, résistante aux acides, alcalis, solvants et désinfectants.	oui	oui	oui	oui
7. Lutte efficace contre les vecteurs, par exemple rongeurs et insectes.	oui	oui	oui	oui
8. Présence d'un autoclave	oui, sur le site	oui, dans le bâtiment	oui, dans le labo, double entrée (2)	oui, dans le labo, double entrée
9. équipement de base spécifique dans le laboratoire (matériel marqué)	non	non	oui	oui
c) Pratiques opératoires				
1. Stockage des agents biologiques en lieu sûr	oui	oui	oui	oui, accès protégé
2. Manipulation des matières infectées et de tout animal contaminé dans un système approprié de confinement (3)		optionnel	oui	oui
3. Utilisation de conteneurs spécifiques pour aiguilles contaminées, objets piquants ou tranchants souillés	oui	oui	oui	oui
4. Contrôle de la dissémination des aérosols formés.	minimiser	minimiser	empêcher	empêcher
5. Gants	optionnel	optionnel	oui	oui
6. Inactivation : matériel contaminé et déchets.	oui	oui	oui	oui
7. Décontamination des équipements avant sortie du laboratoire (centrifugeuses, PSM..).	oui	oui	oui	oui
8. Inactivation des effluents : évier et douches.	non	non	oui	oui

Lexique

Oui : exigence.

Non : pas d'exigence.

Optionnel : doit être décidé, au cas par cas, sur la base de l'évaluation des risques, à la suite de laquelle ces mesures devront ou non - être appliquées.

(1) Pour les nouvelles installations

(2) Des dérogations exceptionnelles à cette prescription peuvent être accordées. Consulter le paragraphe III de l'annexe III.1 du Guide de la CGG.

(3) Lorsque des animaux de laboratoire sont délibérément contaminés par un ou plusieurs agents pathogènes, ils doivent être manipulés ou hébergés dans des locaux répondant aux conditions et niveaux de confinement requis du fait de la classification du ou des agents pathogènes utilisés.

ANNEXE 2 : INTERFERENCES DES PRINCIPAUX AGENTS INFECTIEUX AVEC LES RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Illustrées par le tableau ci-dessous et issues des textes de référence suivants :

- Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbits and their effects on research. D.G. Baker. Clinical microbiology reviews (1998) 4, 231-266

- Implication of infectious agents on results of animal experiments. W. Nicklas, F. Homgerger, B. Illgen-Wilcke, K. Jacobi, V. Kraft, I. Kunstyr, M. Mahler, G. Pohlmeyer-Esch. Laboratory animals (1999) 33(S1) S1:39- S1:87

- Recommandations for health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. W. Nicklas, P. Baneux, R. Boot, T. Decelle, A.A. Deeny, M. Fumalli & B. Illgen-Wilcke. Laboratory Animals, (2002) 36(1): 20-42.

- Infectious Diseases of Mice and Rats, J.R LINDSEY, G. A. BOORMAN, M. J. COLLINS, C-H HSU, G. L. VAN HOOSIER & J. E. WAGNER, 1991, National Research Council.

Remarques :

Certains agents infectieux qui ne figurent pas dans les recommandations de la liste FELASA pourront être recherchés. Chacun doit avoir sa propre liste d'exclusion des agents pathogènes.

Par exemple lors des greffes ou d'injections, il est recommandé de rechercher les agents transmissibles à l'animal et présents dans le matériel biologique utilisé (virus LDV ou Lactate Deshydrogenase elevating Virus). De même d'autres agents infectieux doivent être dépistés selon le domaine de recherche et les animaux utilisés :

- Système respiratoire : *CAR bacillus*, *Pneumocystis carinii*,
- SNC, muscles, reproduction : *Toxoplasma gondii*,
- Immunodéprimés : tous les agents opportunistes.

Morbidité = nombre d'animaux infectés par une maladie donnée pendant un temps donné dans une population.

VIRUS

AGENT	HOTE	ORGANO-TROPISME ²	INFECTIOLOGIE		SIGNES CLINIQUES	INTERFERENCE AVEC LA RECHERCHE	REMARQUES
			Morbidité	Mortalité			
Mouse hepatitis virus (MHV)	Souris	Polytropique ³	Jusqu'à 100%	0% adultes mais jusqu'à 100% chez nouveaux nés (épizootie)	Généralement asymptomatique (enzootie). Epizootie (lors de la première contamination) : asymptomatique chez l'adulte, diarrhée et mort chez les nouveaux nés. Mort chez les IDp (nécroses multifocales).	Hautement interférent (tous systèmes et fonctions).	Très contagieux (aérosol...), interaction avec autres agents infectieux (PVM, Sendai, salmonella). Contamination persistante des cellules ES sans changer leur pluripotence.
Rotavirus murin (EDIM)	Souris	Intestin	ND	ND	Signes cliniques seulement suite à infection péri natale. Chers jeunes : diarrhée jaune, léthargie, abdomen gonflé.	Système gastro-intestinal, physiologie générale, nutrition, zootechnie.	Très contagieux. Interaction avec autres agents (MHV).
Mouse minute virus (MVMp et i)	Souris (rat, hamster) 1	Cellules en mitose fibroblastes (p) et lympho T (i).	Variable ³	Variable ³	Dépendant de la souche et du virus. Allant d'asymptomatique (C57BL/6) à léthal avec hémorragie intestinale (DBA/2) ou rénale (C3H, BALB/c).	Système immunitaire, hématopoïétique, rein, SNC, oncologie, zootechnie.	Très contagieux. Transmission utérine possible. Très résistant dans l'environnement. Fréquent contaminant des tumeurs transplantables, hybridomes et lignées cellulaires.
Mouse parvovirus (MPV) / Rat Parvovirus (RPV)	Souris, rat	Cellules en mitose. Polytropique, avec prédilection pour organes lymphoïdes.	ND	0%	Asymptomatique et apathogénique même chez les IDp.	Système immunitaire, oncologie, Rejet des allogreffes. Interférences pas encore toutes connues.	Fréquent contaminant des tumeurs transplantables. Virus persistant. Très résistant dans l'environnement.
Pneumonia virus of mice (PVM)	Souris, rat (hamster, cochon d'inde, lapin) 1	Tractus respiratoire	20% (souris) à 50% (rat, hamster)	0% sauf IDp	Généralement asymptomatique sauf chez les animaux athymiques (pneumonie chronique, émaciation et mort).	Tractus respiratoire, immunologie, diabète.	Possible chez cochon d'inde et lapin (preuve en sérologie mais sans isolation du virus).
Para-influenza virus type 1 (Sendai)	Souris, rat, hamster (cochon d'inde) 1	Tractus respiratoire	Jusqu'à 100% ³	Jusqu'à 100% ³	Généralement asymptomatique (enzootie). Epizootie (lors de la première contamination) : dyspnée, retard de croissance, mort (jeunes) avec nécrose inflammatoire de l'épithélium respiratoire.	Tractus respiratoire, immunologie, cancérologie, embryologie, apoptose.	Très contagieux, interaction avec infection bactériennes (synergie avec Mycoplasma pulmonis). Contaminant du matériel biologique.

VIRUS (Suite)

AGENT	HOTE	ORGANO-TROPISME ²	INFECTIOLOGIE		SIGNES CLINIQUES	INTERFERENCE AVEC LA RECHERCHE	REMARQUES
			Morbidité	Mortalité			
Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)	Souris (rat)	Muqueuse intestinale puis foie, rate et SNC.	Faible	Faible ³	Généralement asymptomatique. 1 cas clinique / 4000 à 10000 animaux infectés (sauf épizootie à GDVII). Après dissémination dans le SNC, paralysies uni ou bilatérales, poliomyélites avec nécrose et démyélinisation.	SNC (modèles de maladies neurologiques).	Interférence avec autres infections virales. Contaminant du matériel biologique.
Kilham's rat Virus	Rat (hamster) ¹	Cellules en mitose polytropique préférence foie et cerveau embryons.	ND	Pathogène en période fœtale et périnatale.	Généralement asymptomatique sauf chez les animaux IDP, cas cliniques sporadiques avec mort (lésions et hémorragies cérébrales).	SNC, tractus gastro-intestinal, appareil reproducteur, poumon, foie, immunologie, oncologie.	Transmission intra utérine.
Toolan's H1 virus	Rat (hamster) ¹	Cellules en mitose (embryons, intestin, tumeurs).	ND	Pathogène en période fœtale et périnatale.	Térotogène. Asymptomatique par infection chez l'adulte.	Développement fœtal, zootechnie, foie, os, oncologie.	Transmission intra utérine.
Rat coronavirus (RCV) / Scialodacryoadenite (SDA)	Rat	Tractus respiratoire ³ , glandes salivaires et lacrymales.	Forte	0%	Enzootie : généralement asymptomatique. Epizootie : conjonctivite, écoulement (nez, yeux), ulcération de la cornée.	Tractus respiratoire, système lacrymal, salivaire, oculaire, immunologie, tractus génital, reproduction, zootechnie.	interaction avec autres agents infectieux (M. Pulmonis).
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	Souris, hamster (rongeurs, chiens, primates, humains) ¹	Principalement rein, glandes salivaires, tissus lymphoïdes et hématopoïétique.	ND	Variable ³ de 0 à 100% selon le virus	Variable selon l'âge, l'espèce; la souche des animaux ainsi que le sous-type de virus. Généralement asymptomatique chez la souris adulte après infection naturelle. Glomérulonéphrite tardive (7 – 10mois).	SNC, foie, circulation sanguine, immunologie, oncologie	Zoonose majeure. Transmission intra utérine Contaminant fréquent des tumeurs transplantables, de lignées cellulaires, stocks viraux (virus leucémies ...). Augmente la sensibilité de la souris au virus de l'ectromélie.
Guineapig adenovirus (GPAV)	Cochon d'inde	Tractus respiratoire	Faible (5%)	Près de 100%	Dyspnée, prostration, hypothermie et mort par bronchopneumonie.	Tractus respiratoire	Pathologie multifactorielle, le virus seul est insuffisant.
Ectromelia virus	Souris (rat) ¹	Peau, organes lymphoïdes, foie, rate	Variable ³	Variable ³	Très variable selon les souches, de généralement inapparent (C57BL/6) à mortel (C3H, BALB/c, DBA/2). Pustules, léthargie, prostration, mort subite. Nécroses multiples (rate, gg lymphatiques, thymus, foie).	Très interférant (tout systèmes et fonctions).	Ectromélie = variole = small pox = vaccina antigen. Contaminant du matériel biologique.

VIRUS (Fin)

AGENT	HOTE	ORGANO-TROPISME ²	INFECTIOLOGIE		SIGNES CLINIQUES	INTERFERENCE AVEC LA RECHERCHE	REMARQUES
			Morbidité	Mortalité			
Mouse adenovirus type 1 et 2	Souris, rat	MAd1 : polytropique, MAd2 intestin	ND	0% par infection naturelle	Asymptomatique (infection naturelle) sauf chez les IDp.	SNC (MAd1), rein, tractus gastro-intestinal.	Infection naturelle par MAd1 exceptionnelle.
Reovirus type 3 (Reo 3)	Rongeurs	Tractus digestif	Faible	Faible	Asymptomatique, même chez IDp. Exceptionnellement chez le jeune : diarrhées, jaunisse, alopecie abdominale avec necrose hépatique et « foie jaune ».	Tractus gastro-intestinal, immunologie, carcinogenèse, apoptose.	Contaminant occasionnel des tumeurs et lignées cellulaires.
Hantavirus	Rongeurs	Poumons et autres tissus	ND	ND	Asymptomatique. Virus pouvant être détecté dans les poumons 10 jours après l'infection puis dans l'urine et la salive.	Zoonose majeure : nombreuses souches avec pouvoir pathogénique variable chez l'homme.	Contaminant du matériel biologique. Transmission principalement par les aérosols.

BACTERIES

AGENT	HOTE	ORGANO-TROPISME ²	INFECTIOLOGIE		SIGNES CLINIQUES	INTERFERENCE AVEC LA RECHERCHE	REMARQUES
			Morbidité	Mortalité			
Citrobacter rodentium	Souris	Gros intestin	Faible ³	Variable ³	Fèces déshydratés, prolapsus rectal d'incidence variable, taille réduite et/ou mortalité au sevrage, morbidité et mortalité augmentée chez IDp.	Tractus gastro-intestinal, immunologie, (oncologie).	
Clostridium piliformis (Tyzzer)	Mammifères	Intestin, foie, cœur	Variable selon l'hôte et l'isolat	Variable, peut être forte	Généralement subclinique, pathologies plus fréquentes chez les jeunes (sevrage). Anorexie, diarrhées, inflammation de l'iléum, nécroses focales (foie et/ou cœur), adénopathie mésentérique.	Système gastro-intestinal et cardio-pulmonaire. Foie (toxicologie), zootechnie.	Parasite intracellulaire obligatoire, diagnostique par IFA, ELISA, PCR.
Corynebacterium kusteri	Souris, rat (hamster, cochon d'inde) ¹	Polytrophique. Prédilection : tractus respiratoire, oreille moyenne et tissus superficiels.	Jusqu'à 100% (signes cliniques 5 à 60%)	Faible	En général inapparent chez rat et souris. Signes cliniques apparaissent après immunosuppression, stress ou co-infection. Abces superficiels puis des organes internes. Pneumonies dans certaines lignées de rat.	Dermatologie, immunologie, oncologie.	Infections naturelles rares.
Mycoplasma sp. (pulmonis)	Souris, rat (lapin, cochon d'inde) ¹	Epithélium respiratoire, oreille moyenne, tractus génital.	Faible à moyenne ³	Faible ³	Généralement asymptomatique chez les adultes. Infections des organes cibles (otites, conjonctivites, infections respiratoires et du tractus génital). Morbidité et mortalité augmentées par combinaison avec d'autres infections pneumotropiques	Très interférant (surtout pour les études à long terme). Tractus respiratoire, système immunitaire, reproduction, toxicologie, nutrition, (oncologie).	Parasites intracellulaires. Transmission utérine et via Oocytes (transferts d'embryons). Diagnostique sérologique.
Pasteurella sp.	Rongeurs (pneumotropica), lapin (multocida)	Pn : peau, organes externes. Mu : polytrophique.	Variable selon l'hôte et l'isolat	Variable ³	Pn : généralement asymptomatique. Inflammations suppuratives (otites, ophtalmies). Mu : généralement asymptomatique. Pathologies multiples (diffusion sanguine) telles que rhinites, conjonctivites, pneumonies.	Peau (pn), tractus respiratoire (mu).	Pathogène opportuniste, P. multocida très fréquentes chez le lapin.
Salmonella sp.	Mammifères	Tractus intestinal	Variable ³	Faible ³	Généralement asymptomatique, pathologies variables selon les cas. Pathogène chez les IDp	Reproduction, foie, poumon, métabolisme glucidique et hormonal.	Risque zoonotique.
Streptococcus pneumoniae	Souris, rat, Cobaye Hôte naturel : homme	Fosses nasales, oreille moyenne	ND	ND	Généralement asymptomatique. Signes cliniques non spécifiques, classiquement atteinte broncho-pulmonaire, dégradation de l'état général, septicémie.	Tractus respiratoire, foie, thyroïde.	Nombreuses souches différentes.

BACTERIES (Suite)

AGENT	HOTE	ORGANO-TROPISME ²	INFECTIOLOGIE		SIGNES CLINIQUES	INTERFERENCE AVEC LA RECHERCHE	REMARQUES
			Morbidité	Mortalité			
Hélicobacter sp.	Souris, rat, hamster	Tractus intestinal, foie	Jusqu'à 100% ³	Faible (10%)	Hépatite chronique et risque augmenté de tumeurs hépatique. Inflammation du gros intestin avec prolapsus rectal (5%) chez IDp	Tractus gastro-intestinal, toxicologie, oncologie (carcinogénèse). Interférences pas encore toutes connues.	Nombreuses souches différentes.
Streptococcus β-hemolytic	Hôte naturel : homme Souris, rat, cobaye	Nœuds lymphatiques cervicaux, poumons.	ND	ND	Asymptomatiques le plus souvent (rarement pneumonie). Surtout pour les IDp.	Tractus respiratoire.	Souche D : agent opportuniste.
Staphylococcus aureus	Souris, rat, homme ...	Nasopharynx, tube digestif bas, pelage et peau.	ND	ND	Asymptomatique le plus souvent. Parfois dermatite ulcérate (surinfection). Surtout pour les IDp (abcès faciaux et orbitaux).	Immunologie, études de vieillissement.	Agent opportuniste.
Streptobacillus moniliformis	Hôte naturel : rat Souris, cobaye, homme	Nasopharynx, oreille moyenne, tractus respiratoire et abcès sous cutanés.	ND	ND	Asymptomatique chez le rat. Souris : conjonctivite, diarrhée, émaciation et forte mortalité (épizootie) ; arthrite chronique et amputations (enzootie).	Infection rare.	Zoonose (fièvre de Haverhill ou de la morsure du rat).

PARASITES

AGENT	HOTE	ORGANO-TROPISME ²	INFECTIOLOGIE		SIGNES CLINIQUES	INTERFERENCE AVEC LA RECHERCHE	REMARQUES
			Morbidité	Mortalité			
Ectoparasites							
Acariens : Myobia musculi Myocoptes musculus Radfordia affinis	Souris, rat	Peau, poil	Variable ³	Faible	Variable selon les souches. Amaigrissement, prurit, alopecie partielle, autophagie. Lésions généralement dorsales (bas du dos).	Immunologie.	Animaux sans poils non infectés.
Dermatophytes : Microsporum spp., Trichophyton spp.	Cobaye, lapin, homme, souris, rat	Peau, poil	ND	ND	Asymptomatique le plus souvent.	Infestation rare.	Les rats et les souris ne représentent pas un risque zoonotique important.
Endoparasites							
Protozoaires flagellés : Giardia muris Spironucleus muris	Rat, souris	Intestin	Variable ³	Variable ³	Généralement asymptomatique, signes cliniques non spécifiques (perte de poids, prostration, gonflement de l'abdomen et mort). S. muris : signes cliniques plus fréquents chez animaux au sevrage et IDp	Tractus gastro-intestinal, immunologie.	Favorise les surinfections.
Amibes Entamoeba sp.	Mammifères	Intestin	Variable ³	0%	Rares infection chez souris et lapin. subclinique	ND	Commensal intestinal
Oxyures Syphacia muris Syphacia oblevata Aspicularis tetraptera	Rongeurs (prédilection d'espèce)	Caecum, colon	Forte	0%	Généralement sub-clinique. Perte de poids, prostration, prolapsus rectal chez sujets fortement infestés. IDp plus sensibles S. muris : signes cliniques plus fréquents chez animaux au sevrage et IDp.	Incidence faible : immunologie, transport intestinal, croissance, comportement	Très contagieux (aérosols). Risque Zoonotique faible pour immuno-déprimés (S. oblevata). (Eufs très résistants dans l'environnement.
Coccidies Genre = Eimeria	Lapin, cochon d'inde (rat, souris) ¹	Intestin	Variable (hôte spécifique)	Faible	Diarrhées, perte de poids, entérite et mort, principalement chez jeune lapin.	Tractus gastro-intestinal	Nombreuses espèces.
Encephalitozoon cuniculi	Lapin, autres animaux de laboratoire ¹	Epithélium intestinal puis polytropique.	Variable ³ à forte (non détection)	Faible ³	Généralement asymptomatique. Lésions rénales (fibroses) et des méninges (encéphalites) avec symptômes neurologiques (paralysies, cécités). Forte mortalité chez les IDp.	Tractus gastro-intestinal, rein, SNC, immunologie, oncologie	Risque Zoonotique faible (personnes immuno-déprimées).

Légendes des tableaux :

- ¹ : infection expérimentale, exceptionnelle ou hôte alternatif
- ² : principal, hors infection expérimentale
- ³ : variable selon les souches
- ND : non décrit
- IDp : Immuno déprimés

ANNEXE 3: CONTROLE SANITAIRE / EXEMPLES D'AGENTS PATHOGENES
MURINS A RECHERCHER.

	ZOOOSE	Importance			
		Haute	Moyenne	Basse	Incertaine
VIRUS					
Virus de la chorioméningite lymphocytaire	X				
Ectromélie		X			
Virus de l'Hépatite Murine		X			
Virus de Sendai		X			
Virus de Theiler			X		
Virus de la pneumonie murine			X		
Cytomégalovirus murin			X		
Rotavirus murin			X		
Reovirus type 3			X		
Adenovirus murins			X		
Virus K				X	
Poliomavirus murin				X	
norovirus				X	
Virus minute murin					X
Autres parvovirus murins					X
BACTERIES					
Salmonella enteridis	X				
Mycoplasma pulmonis		X			
Pasteurella pneumotropica			X		
Citrobacter freundii			X		
Streptocoque β hémolytique				X	
Strepto. β hém. Groupe D*				X	
Staphylococcus aureus*				X	
Klebsiella pneumoniae*				X	
Pseudomonas aeruginosa*				X	
Corynebacterium kutscheri				X	
Maladie de Tyzzer					X
Helicobacter sp.					X
*Bactéries opportunistes.					
PARASITES					
Hymenolepis nana	X				
Syphacia sp.			X		
Aspicularis tetraptera			X		
Spironucleus muris			X		
Giardia muris			X		
Encephalitozoon cuniculi			X		
Entamoeba muris				X	
Trichomonas sp.				X	
Myobia musculi			X		
Myocoptes musculus			X		
Radfordia affinis			X		
Pneumocystis carinii				X	
DERMATOPHYTES	X				

Toutes les interférences avec les résultats expérimentaux ne sont pas encore connues et l'importance de certains agents infectieux n'est pas complètement évaluée. C'est le cas tout particulièrement pour les Parvovirus et Helicobacter (signalisation dans les différents tableaux ci-dessus par "importance incertaine"). Par ailleurs, tout micro-organisme opportuniste peut devenir pathogène pour les animaux immunodéficients.

ANNEXE 4 : EXEMPLE D'INFORMATION A RECUEILLIR LORS DE TRANSFERTS
D'ANIMAUX

Inserm

Institut national
De la santé et de la recherche médicale

INFORMATIONS SANITAIRES/ RODENT HEALTH INFORMATION

Animaux envoyés/sent animals

Espèce/ species:

Nombre/ Number:

Lignée/ strains:

Statut immunitaire/ immune status:

- Compétent/ competent
 Immunodéprimé/ immunodeficient
 Inconnu/unknown

Pour les OGM, classe: A1

A2

A3

Etablissement expéditeur/ Consignor

Nom/ Name:

Adresse/ Address:

Vétérinaire référent/ vet:

Tel:

Fax:

E-mail:

Responsable de l'animalerie/responsible of the facility:

Tel:

Fax:

E-mail:

Hébergement/Housing

- Nombre approximatif d'animaux hébergés au total dans la structure/ *Number of animals housed in the entire facility*:
- Nombre approximatif d'animaux dans la pièce hébergeant les animaux envoyés/ *Number of animals housed in the room*:
- Système d'hébergement/ *Caging system* :
 - Conventiel/ *Conventional*
 - Cage à couvercle filtrant/ *Filter-topped cages*
 - Portoir ventilé/ *Ventilated Racks*
 - Isolateur/ *Microisolator*
- Existe-t-il une zone d'élevage/ *breeding zone* ? :
 - Oui/yes non/no
- Hotte de change/ *change station*? :
 - Oui/yes non/no

• **Vêtements de protection/ Protective Clothing :**

- Non/none
- Blouse/ *lab coat*
- Gants/ *gloves*
- Charlotte/hair *bonnet*
- Masque/mask
- Surhausses/*shoe covers*
- Autre/other:

Provenance des animaux/animals origins

- Fournisseurs agréés/ *breeders*
 - Elevage interne/ *self breeding*
 - Autres sources (collaboration)/ *multiple sources*
- ⇒ Nb approximatif d'animaux introduits par an/*number of introduced animals per year*:

Gestion des introductions/animal facility status

- Pas d'introduction/ *closed*
- Introduction après transfert d'embryons/ *open with embryo transfert*
- Introduction après mise en quarantaine et contrôle sanitaire/ *open with quarantine*
- Introduction directe/ *open*

Suivi sanitaire/health surveillance

• **Fréquence des bilans/monitoring frequency:**

- Annuelle/ *annually*
- Bisannuelle/ *semi-annually*
- Trimestrielle/ *quaterly*
- Mensuelle/ *monthly*
- Autre/other (précisez/ *explain*):

• **Animaux testés:/health status determined by**

- Animaux sentinelles/*sentinel program*
 - nb cages sentinelles/nb cages dans la pièce (*sentinel boxes per animal boxes in the room*):
 - nb d'animaux sentinelles /cage (*mice per sentinel box*):
 - sentinelles par contact
 - Direct/direct *sentinel*
 - Indirect (litière souillée...)/*dirty bedding sentinel*
 - Prélevés au hasard/*animals sampled directly*
 - nombre/effectif global de la pièce (*Number per total animals in the room*):

• Accès des chercheurs aux zones d'hébergement/*does research staff access to the animal facility?*

- Oui/yes non/no

• Retour possible des animaux sortis de l'animalerie/ *can rodents be returned to room facility after removal?*

- Oui/yes non/no

- Pathogènes détectés ou autre problème sanitaire concernant la pièce d'hébergement des animaux importés/ *List of pathogens or other health problems in room:*
- Pathogènes mis en évidence dans l'animalerie au cours des 6 derniers mois/ *List of pathogens or potential pathogens present in other rodent rooms during the last 6 months:*
- Mesures sanitaires mises en œuvre (traitement éventuel à détailler, décontamination des locaux, repeuplement...)/*management of detected pathogens :*

Joindre les trois derniers bilans sanitaires SVP/ Please, attach the three most recent health monitoring reports

ANNEXE 5 : DOSSIER TYPE "ARMOIRE VENTILEE"

Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
<u>Qualité</u> Responsable Animalerie	<u>Qualité</u> RMQ	<u>Qualité</u> Directeur
<u>Nom</u> Bruno Martin	<u>Nom</u> Anne Dupont	Administratif
<u>Date</u> 18.03.2004	<u>Date</u> 18.03.2004	<u>Nom</u> Marie Durand
<u>Visa</u>	<u>Visa</u>	<u>Date</u> 18.03.2004
		<u>Visa</u>

Annexe 5.1 Fiche signalétique

Armoires ventilées	
Modèle:	Marque:
N° d'inventaire :	Date de mise en service:
Emplacement : pièces de stabulation, Animalerie	
Responsable :	
Contact maintenance/panne :	

Caractéristiques particulières et consignes importantes : « notice d'utilisation et d'entretien »
<ul style="list-style-type: none">• dimensions :<ul style="list-style-type: none">- Enceintes type A : 1460 x 650 x 1830 mm- Enceinte type B : 1460 x 450 x 1830 mm• 6 ensembles de 2 enceintes en surpression (type A) alimentées par caisson de soufflage (un caisson pour 2 armoires)• 1 ensemble de 2 enceintes type A + 1enceinte type B alimentées par caisson de soufflage (un caisson pour 3 armoires)• capacités :<ul style="list-style-type: none">- Enceintes type A : 84 cages type 2 ou 112 cages type 1 sur 6 étagères- Enceinte type B : 42 cages type 2 ou 56 cages type 1 sur 6 étagères• Caissons de soufflage avec variateur de vitesse et alarme• Filtration : Caissons de soufflage (moteur) :<ul style="list-style-type: none">- préfiltre d'entrée (média)- filtre HEPA 0,3 µ décompression (enceintes)- préfiltre de sortie (média)- filtre à charbon actif

Annexe 5.2. Contrôle et maintenance

a. Contrôles

- Avant une remise en route, vérifier que
 - les portes des 2 enceintes sont correctement fermées
 - les manomètres de pression (Kimo) sont bien horizontaux et que le niveau de liquide est bien à 0 à l'arrêt
- En service, le bon fonctionnement des armoires est régulièrement vérifié par observation des manomètres de pression qui doivent indiquer une surpression de 5 mm H₂O (graduations).
- Une alarme sonore est émise par le moteur en cas de dysfonctionnement. En cas de coupure électrique, l'alarme ne se déclenche pas mais le relais d'alimentation est pris par l'onduleur de sécurité.

b. Nettoyage

- Une fois par semaine (lors du change), la sciure présente dans le fond des armoires est éliminée à l'aide des pelles et balayettes réservées à cet effet
- Une fois par trimestre, l'intérieur de chaque armoire est entièrement décontaminé (démontage des blocs d'aspiration/soufflage et pulvérisation / essuyage avec de l'incidine) et l'extérieur est nettoyé (inox et vitres) avec un produit adapté
- Une fois par an ou dès que possible (pièce libre), l'ensemble des armoires et moteurs d'une même pièce subissent une désinfection par brumisation de Cleansinald

c. Maintenance

Changement des filtres

- Filtres média (caisson et armoire) sont des pré filtres permettant de retenir l'essentiel de la poussière de sciure en suspension. Ils sont nettoyés chaque semaine (aspiration puis lavage à l'eau savonneuse puis séchage), et sont changés lorsqu'ils sont abîmés (trop écrasés ou déchirés)
- Filtres à charbon actif (armoire) : (ne se nettoient pas) sont changés lorsqu'ils ne sont plus efficaces (odeurs) soit environ tout les 6 à 8 mois
- Filtres absolus (caisson) (ne se nettoient pas) sont changés lorsqu'ils sont colmatés (différence de pression observée au Kimo ≤ 5 mm à puissance maximale du moteur), soit environ tous les ans

Annexe 5.3. Mode d'emploi

En utilisation normale :

1. Ouvrir la porte
2. Prendre ou remettre des cages dans l'armoire
3. Refermer la porte aussi rapidement que possible

Par pièce, on ne doit ouvrir qu'une seule armoire à la fois et la refermer dès que possible.

Remarque : les armoires sont en fonctionnement permanent sauf si aucun animal n'y est présent

Annexe 5.4 Mode opératoire : Changement des filtres

Pour chaque entretien/changement de filtre, veiller d'abord à arrêter le moteur

- Préfiltre de soufflage

Situés en façade des caissons de soufflage

1. Faire coulisser latéralement le support de pré filtre
2. Enlever l'épingle de maintien en fil, puis le pré filtre
3. Le remplacer par un pré filtre propre et remettre l'épingle
4. Remettre le support en place

NB : Les préfiltres peuvent être réutilisés après lavage à l'eau savonneuse et séchage. Il est important d'en avoir plusieurs jeux et de limiter le nombre de réutilisations. Ils sont changés lorsqu'ils sont abîmés (trop écrasés ou déchirés)

- Préfiltre de sortie et filtre à charbon actif

Situés latéralement à l'extérieur des armoires, côté opposé à l'arrivée d'air

1. Dévisser les 4 écrous à ailettes en plastique noir et démonter l'ensemble support de préfiltre
2. Enlever l'épingle de maintien en fil puis le pré filtre
3. Changer le filtre à charbon actif si besoin
4. Remplacer le pré filtre par un propre et remettre l'épingle
5. Remettre le support en place et revisser les écrous

NB : Les préfiltres peuvent être réutilisés après lavage à l'eau savonneuse et séchage. Il est important d'en avoir plusieurs jeux et de limiter le nombre de réutilisations.

- Filtres absolus

Situés dans les caissons de soufflage

1. Déconnecter l'alimentation générale de l'armoire
2. Dévisser les vis à ailettes de la plaque arrière du caisson de soufflage
3. Dévisser les écrous de la bride de serrage du filtre à l'aide d'une clé puis enlever la bride
4. Dégager le filtre absolu usagé
5. Monter le filtre absolu neuf en ayant soin de mettre la face recouverte du joint en appui sur la paroi interne du caisson ; vérifier que le filtre est bien centré sur son support
6. Remboîter la bride sur ses goujons et procéder ensuite à l'inverse du démontage.

ANNEXE 6: REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Décret en Conseil d'Etat n° 87-848 du 19 octobre 1987 pris pour l'application de l'article 464 du code pénal et du troisième alinéa de l'article 276 du code rural et relatif aux expériences pratiquées sur les animaux.
2. Décret n° 2001-464 du 29 mai 2001 modifiant le décret n° 87-848 du 19 octobre 1987 pris pour l'application de l'article 454 du code pénal et du troisième alinéa de l'article 276 du code rural et relatif aux expériences pratiquées sur les animaux.
3. Décret n° 2005-264 du 22 mars 2005 portant création d'un comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale.
4. Code rural - Livre II (partie réglementaire) - Titre Ier - Chapitre IV - Section 5 - Sous-section 3 : Expérimentation sur l'animal, R 214 – 87 à R 214 - 130.
5. Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements d'expérimentation animale.
6. Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions de pratiquer des expériences sur les animaux.
7. Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions de fournitures aux laboratoires agréés des animaux utilisés à des fins de recherches scientifiques ou expérimentales.
8. Arrêté du 21 mai 2003 relatif à la délivrance et à l'utilisation de médicaments employés par les établissements disposant d'un agrément pour pratiquer l'expérimentation animale.
9. Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, STE 123, Conseil de l'Europe, 1986.
10. Disinfectants in laboratory animal science: what are they and who says they work ?, Amy Ingraham, BA RLATG and Tammy Marotta Fleischer, Lab Animal (2003), 32, 36-40.
11. Guide de prévention des infections, Santé Canada, 1998, vol 24S8; <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/98pdf/cdr24s8f.pdf12>
12. Recommendations for health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. W. Nicklas, P. Baneux, R. Boot, T. Decelle, A.A. Deeny, M. Fumalli & B. Illgen-Wilcke. Laboratory Animals (2002), 36(1), 20-42.