

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Středoevropští hlodavci (Clethrionomys, Apodemus, Mus) jako možní rezervoároví hostitelé leishmanií.

Doba trvání projektu pokusů v měsících	36
Klíčová slova	Leishmania
Rezervoárový hostitel	Apodemus
Clethrionomys	Mus

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Další základní výzkum [PB13]

0
0
0

Cíle projektu pokusů

Leishmaniózy jsou lidská a zvířecí onemocnění způsobená jednobuněčnými parazity rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Jsou to většinou zoonózy, kdy leishmanie kolují mezi savci a hmyzími přenašeči a udržují se v přírodních ohniscích mezi zvířecími rezervoárovými hostiteli (RH), náhodným hostitelem pak může být i člověk. V posledních letech se jejich výskyt v Evropě šíří z teplých středomořských oblastí do severnějších zeměpisných šířek. Autochtonní případy infekcí *L. infantum* byly zachyceny u dětí a koní v Německu a Rakousku (Bogdan et al 2001 Clin. Infect. Dis. 32, Koehler et al. 2002 Vet. Parasitol. 109), *L. major* v Rakousku (infikovaní hmyzí přenašeči, dosud nepublikováno) a *L. martiniquensis* u skotu a koní v Německu, Švýcarsku i v České republice (Lobsiger et al. 2010 Vet. Parasitol. 169, Müller et al. 2009 Vet. Parasitol. 166). Hlavním RH *L. infantum* je pes, ale neznámá je identita RH, kteří by mohli ve střední Evropě udržovat *L. major* a *L. martiniquensis*. Prvními kandidáty jsou hlodavci, kteří fungují jako RH *L. major* v jiných areálech výskytu. Cílem našich pokusů je přispět k identifikaci RH těchto dvou druhů leishmanií jednak terénními odchytami hlodavců, zaměřenými na detekci parazita na daných lokalitách, jednak laboratorními experimentálními infekcemi, které mohou potvrdit hostitelskou kompetenci podezřelých druhů. Klíčovými parametry,

Potenciální přínosy projektu pokusů

Tento pokus má přinést jedinečné a dosud nepublikované výsledky, které přispějí k poznání epidemiologie leishmaniózy šířících se do střední Evropy.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Terénní odchyt: Na lokalitě s výskytem parazita bude dvakrát ročně položeno 60 živochytných pastí po 2-3 odchytové noci. Odchycení hlodavci budou převezeni do laboratoře a buď ponecháni pro experimentální infekce, nebo uvedeni do anestezie a usmrcení stržením vazu pro odběr tkání na detekci parazita.
Laboratorní experimenty: Hlodavci budou uvedeni do celkové anestezie a leishmanie budou injekčně inokulovány do ušního boltce. Poté bude v pravidelných týdenních intervalech sledována hmotnost zvířat a externí známky onemocnění – případná tvorba kožních lézí. Pro xenodiagnostické pokusy budou zvířata vystavena sání flebotomů v pětítýdenních intervalech od inokulace parazitů, a to opět při celkové anestezii. Anestezie bude trvat 1 hodinu, zvířatům přitom budou zvlhčovány oči a bude dbáno na jejich tepelný komfort. Pokus bude ukončen při viditelném zhoršení zdravotního stavu zvířete nebo 6 měsíců od inokulace leishmanií. Pokus bude ukončen stržením vazu v celkové anestezii, poté budou odebrány vzorky tkání pro PCR detekci leishmanií a kadaver uložen v kafilerii.

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

U hlodavců infikovaných *L. martiniquensis* lze očekávat mírný asymptomatický průběh infekce, u hlodavců infikovaných *L. major* i středně závažný průběh, pokud se vyvine kožní léze. U zvířat odchycených v terénu bude většina jedinců spadat do kategorie „zvíře nenabude vědomí“.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
ostatní hlodavci (other Rodentia) [A7]	600	36	36	0

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi

Druh zvířat	Odhadovaný počet zvířat		
	Opětovné použití	Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště	Do zájmového chovu
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty

Pokus musí být ukončen usmrcením infikovaných zvířat, protože pro detekci DNA parazitů je nutný odběr sleziny, jater a povrchových tkání zvířete. Hlodavci budou usmrceny cervikální dislokací v celkové anestezii. Tato metoda zajišťují co možná nejmenší míru utrpení pokusného zvířete. Usmrcení budou provádět pouze certifikované osoby. Likvidace kadaverů z kafilerie bude provedena asanační službou, se kterou má pracoviště smlouvu.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat

Sledování vývoje leishmanií v těle hostitele a xenodiagnostické pokusy nejsou nahraditelné jinou alternativní technikou. Interakce mezi parazitem a hostitelem i přenašečem jsou ovlivněny mnoha vzájemně provázanými a často druhově specifickými faktory na úrovni celých organismů. Tyto komplexní děje nelze simulovat pokusy in vitro nebo počítačovou simulací při vyloučení laboratorních zvířat.

Omezení používání zvířat

Počet použitých zvířat bude minimalizován na nejmenší možný stav tak, aby výsledky byly ještě vypovídající a publikovatelné. Bude tedy použito 12 jedinců pro infekci jedním druhem leishmanie, dohromady pro 2 druhy parazita a 3 druhy hostitelů 72 zvířat. V terénu budou zpět vypouštěni drobní hmyzožravci a počet hlodavců při jednom odchytu nepřesáhne 100 jedinců.

Šetrné zacházení se zvířaty

Před injekčním podáním infekční dávky parazitů do ušního boltce a při xenodiagnostikách (sání naivních flebotomů na zvířatech) budou zvířata uspána anestezí, během anestezie budou zvířatům zvlhčovány oči a bude udržován jejich tepelný komfort. Při ukončení pokusu bude zvířatům v celkové anestezii stržen vaz. Žádné zvíře nebude použito opakovaně pro další pokus. Se zvířaty budou manipulovat pouze certifikované osoby.

Použité druhy zvířat - vysvětlení

Druhy hlodavců budou vybrány dle výsledků terénních odchytů provedených na lokalitě v blízkosti výskytu leishmanií u domácích kopytníků. Nejpravděpodobnějšími kandidáty jsou norník rudý (*Clethrionomys glareolus*), myšice lesní (*Apodemus flavicollis*), myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*) a myš domácí (*Mus musculus*). Kritériem pro výběr bude dostatečná relativní početnost daného druhu na lokalitě a optimálně přítomnost leishmanií stanovená PCR detekcí z tkáně odchyceného zvířete. Pro experimentální infekce budou použiti pouze adultní jedinci.