

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Создание лабораторных животных СПФ-статуса как основа экспериментальной медицины

Л.А. Болотских, В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов, Н.В. Касинская, Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин, Е.Л. Матвеенко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: к.с-х.н. Болотских Любовь Александровна, тел.: 8(495) 561-52-57

Отработанная технология получения и выращивания лабораторных животных может быть рекомендована питомникам и вивариям научных учреждений для производства качественных, здоровых животных, свободных от патогенной микрофлоры, т.е. животных СПФ-статуса.

Ключевые слова: СПФ-животные, изоляторная система, гнотобиологические методы.

Качество лабораторных животных, технология их производства и организация биомедицинского эксперимента на всей территории Российской Федерации существенно отстает от мирового уровня. Основная причина отставания заключается в степени приоритета науки о лабораторных животных в создании широкой научной общественности нашей страны. Поэтому основная наша задача - это консолидация усилий, направленных на создание современной технологии воспроизводства стандартных лабораторных животных и организация на них биомедицинских экспериментов на уровне мировых требований [1].

Получение надежных и воспроизводимых результатов медико-биоло-

гического эксперимента достигается лишь на лабораторных животных, свободных от патогенной микрофлоры, т.е. на животных СПФ-категории. В соответствии с международным опытом стандартизация лабораторных животных обеспечивается современной технологией, в основе которой лежит гнотобиотехнология [2, 3]. Создание СПФ-животных была и остаётся одной из задач нашего научного центра [4, 5, 6]. Работа проводилась в комплексе как с отечественными, так и зарубежными предприятиями.

Цель работы: перевод конвенциональных лабораторных животных в СПФ-статус с использованием гнотобиологических методов.

Материалы и методы

Работа проводилась с конвенциональными мышами коллекционного фонда ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Очистка мышей коллекционного фонда от патогенной микрофлоры проводилась усовершенствованным методом гистерэктомии. Животные получали стерильный гранулированный корм и белково-витаминную добавку. В работе использовали новое зарубежное и отечественное оборудование: изоляторная система «RAIR Isosistem», английский гнотобиологический изолятор «TCOL»; ламинар – С-1, 2; стерилизатор воздушный ГП-640-ПЗ; паровой стерилизатор LAC-6065sp и т.д. Зарубежное оборудование было закуплено в 2008-2010 гг. специально для воспроизводства СПФживотных.

В создании коллекционного фонда мышей СПФ-статуса строго соблюдали гнотобиологическую технологию, которая включает и комплекс методологических приемов, направленных на получение и поддержание СПФ-категорий животных. Основной гнотобиологической аппаратуры в данном случае была приобретённая зарубежная изоляторная система «RAIR Isosistem», состоящая из 144 микроизоляторов.

Данная изоляторная система содержания лабораторных животных обеспечивает защиту не только самих лабораторных животных, но и обслуживающего их персонала. Специальные воздушные клапаны создают комфортную температуру и влажность для животных, снижают контакт обслуживающего персонала с животными, очищают воздух помещений от аллергенных частиц кожи и шерсти животных, существенно снижают запах в помещении,

что улучшает условия работы персонала. В течение часа воздух в клетке обменивается до 50 раз, при этом система обеспечивает его подачу в клетку без сквозняков. При полном отключении микроизолятора от системы воздухоподачи СПФ-статус животных сохраняется до 4 часов за счет специального фильтра, размещаемого в крышке изолятора, что позволяет не только переносить клетки в пределах одного учреждения, но и перевозить их на значительное расстояние. Специальные датчики постоянно следят за состоянием микроизолятора, отображая его условия на табло, что существенно упрощает процесс. Обслуживание микроизоляторов производится по стандартным операционным процедурам, как правило, не вызывающим существенных затруднений в работе.

Установка и подготовка изоляторной системы к работе. Для установки изоляторной системы не требуется специального помещения. В данном случае был отремонтирован модуль для лабораторных животных, где были размещены две зоны: «грязная» и «чистая». В «грязной» зоне установили стерилизующее оборудование: автоклав, воздушные стерилизаторы и т.д. (рис.1), в «чистой» зоне в комнатах разместили изоляторные системы (рис.2, 3).

Монтаж и первичная подготовка изоляторной системы к работе была произведена фирмой изготовителем. Также фирма-изготовитель обеспечила обучение обслуживающего персонала основным навыкам работы. После первичного подключения работа обслуживающего персонала должна быть направлена на подготовку каждой клетки к работе, как обычного гнотобиологического изолятора. Клетки, после тщатель-



Рис. 1. «Грязная» зона.



Рис. 2. «Чистая» зона.



Рис. 4. Микроизолятор.



Рис. 3. Изоляторные системы «RAIR Isosistem».



Рис. 5. Операционная.



Рис. 6. операция гистерэктомии.

ной мойки в дезрастворе, стерилизуют в воздушном стерилизаторе. В стерильные клетки микроизоляторы проводят всё необходимое для жизнеобеспечения животных: стерильные опилки, корм, воду и т.д. Всю работу с данной клеткой проводят в ламинаре. Заселение животными также производят при стерильном потоке воздуха в ламинаре.

Методы стерилизации. Стерилизацию проводили в автоклаве и воздушном стерилизаторе ГП-640-ПЗ. Для новых микроизоляторов были разработаны оптимальные режимы стерилизации. Клетки стерилизуют в воздушном стерилизаторе при 120°С в течение 5-7 минут. Подстилочный материал стерилизуют дважды. Сначала опилки стерилизовали в специальной ёмкости, а затем вторично с клеткой в воздушном стерилизаторе.

Корм и воду стерилизуют в автоклаве. Корм расфасовывают в хлопчатобумажные мешочки и автоклавируют с вакуумом при 1,2 атм. в течение 20 минут. Воду автоклавируют в стеклянной посуде при 2 атм. в течение 1 часа. Следует отметить, что гранулированный корм



Рис. 7. Основные племенные ядра мышей СПФ-статуса.

можно стерилизовать и в воздушном стерилизаторе при соответствующих режимах стерилизации.

Апробирован и другой способ стегранулированного рилизации корма гамма-лучами. Этот вид стерилизации считается наиболее щадящим по отношению к питательным веществам и, в первую очередь, к витаминам. Гранулированный корм расфасовывают в полиэтиленовые мешочки, устойчивые к химическим дезинфектантам и обладающим определенной механической прочностью. Мешочки берут несколько большего размера и запаивают их на машине для герметичности. Упакованный в двойные мешочки корм подвергают облучению в дозе 2,5 Мрад на кобальтовом облучателе. Однако это вид стерилизации требует больших материальных затрат.

Выращивание СПФ-животных в изоляторной системе.

Изоляторная система «RAIR Isosistem» используется нами для перевода конвенциональных племенных ядер мышей коллекционного фонда в СПФ-статус. В одной такой изоляторной

системе можно содержать 16 линий мышей коллекционного фонда. Как было отмечено, данная система работает в комплексе с ламинаром. Смена клеток, раздача корма, воды и т.д. производится только в стерильных условиях. Установлено, что во избежание случайной контаминации, работу, по обслуживанию животных в микроизоляторах в ламинарах, надежнее проводить двум сотрудникам. Обслуживающий персонал работает с микроизоляторами в масках и стерильных перчатках. Успех в работе во многом зависит от подготовки специалистов и их добросовестности. Следует отметить, что в работе с изоляторной системой особое значение имеют обеспечение санитарного режима и профилактика контаминации СПФ животных. Поэтому малейшее отступление от правила, влекущее нарушение стерильности, сводит на нет усилия всего коллектива в выполнении поставленных задач.

Гнотобиологические методы получения стерильного потомства животных (гистерэктомия). Освобождение конвенциональных животных от патогенной микрофлоры проводили усовершенствованным методом гистерэктомии. Главное требование успешного получения стерильного потомства – абсолютная асептика. При гистерэктомии это достигается соблюдением стерильных условий операции ампутирования матки, извлечения ее из брюшной полости, погружением на несколько секунд в теплый раствор антисептика, а также освобождение плодов и осушивание (рис.5, 6).

Современное оборудование позволило усовершенствовать методические приемы получения стерильного потомства лабораторных животных. Вместо обычных гнотобиологических изоля-

торов, на подготовку которых уходило много времени (стерилизация изолятора, продувка, проведение стерильного корма, воды, опилок, клеток, крышек и т.д.), мы брали стерильную клетку микроизолятор. В микроизолятор помещали самку-кормилицу и ставили в ламинар, где проводили операцию гистерэктомии. После соответствующей обработки, извлеченное стерильное потомство подсаживали к самкам-кормилицам и клетку микро-изолятор возвращали на свое место в изоляторной системе.

Микробиологический контроль. Для микробиологического контроля гнотобиотов разработан комплекс методических приемов, направленных на выявление контаминации. Принципиальная схема такого контроля описана Вагнером (1959). Общепринятые методы контроля с использованием различных питательных сред и условий культивирования обеспечивают надежное выявление контаминации гнотобиотов и идентификацию выделенных микроорганизмов. Вместе с тем, существующие методы контроля обладают одним существенным недостатком, что позволяет судить о микробиологическом статусе животных лишь ретроспективно, т.е. по их состоянию 2-3 недели назад, так как именно этот срок требуется для окончательного суждения о контаминации системы. В ряде лабораторий производится и вирусологический контроль гнотобиотических животных, но из практических соображений этот вопрос на сегодняшний день, как правило, опускается из-за сложности такого контроля. В то же время считается, что от экзогенных вирусов гнотобиологическая изоляция представляет такой же надежный барьер, как и для других микрооранизмов. Основные трудности в отношении вирусной контаминации зависят от трансплацентарной передачи вирусов. Этот вопрос требует своего дальнейшего углубленного изучения и поисков путей селекции животных свободных от носительства вирусов, передающихся вертикально. По результатам контроля животные в изоляторной системе поддерживаются в СПФ-статусе.

Результаты и их обсуждение

В 2013 году от патогенной микрофлоры освобождены и переведены в СПФстатус ещё три линии мышей коллекционного фонда СЗН/Al, CC57W, C3H/Sn. В настоящее время получены основные 15 линий мышей СПФ-категории, которые пользуются наибольшим спросом в медико-биологических исследованиях (рис.7). Отработанная технологи содержания лабораторных животных СПФстатуса в изоляторной системе может быть рекомендована для питомников и экспериментально-биологических клиник. Переход на изолированную систему содержания лабораторных животных позволит иметь качественных, здоровых животных, свободных от патогенной микрофлоры, т.е. животных СПФ-статуса, которые крайне необходимы как основа экспериментальной медицины.

Список литературы

- 1. Абдрашитова Э.Х., Зайцев Т.И. и др. Стандартизация лабораторных животных по состоянию здоровья // Ланималогия. 1993. М. 7 с.
- 2. Болотских Л.А., Подопригора Г.И. Разработка и использование гното-биологических методов в лабораторном животноводстве // В сб.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медики-биологических исследований. М. 1987. 23 С.
- 3. **Боломских Л.А., Каркищенко Н.Н., Егорова И.Ю.** Внедрение гнотобиотехнологии для создания лабораторных животных СПФ-статуса // Биомедицина. 2011. № 3. С. 53-56.
- **4. Каркищенко Н.Н.** Основы биомоделирования. М.: Межакадемическое издательство ВПК. 2004. 607 с.
- 5. Подопригора Г.И., Душкин В.А., Болотских Л.А. Оперативные методы получения безмикробных мышей, крыс, морских свинок // Вестник АМН. 1981. № 2. С. 54-58.
- 6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В.Грачева. М.: Профиль 2С. 2010. С. 88-101.

Breeding of SPF-status laboratory animals as basis of experimental medicine

L.A. Bolotskikh, V.N. Karkischenko, N.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, N.V. Kasinskaya, G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin, E.L. Matveenko

The fulfilled technology of receiving and cultivation of laboratory animals can be recommended to nurseries and vivarium of scientific institutions for production of qualitative, healthy animals, specific pathogen free, i.e. animals of the SPF-status.

Key words: SPF-animals, insulator system, gnotobiotics methods.