



## Изоляторные системы – новый методический подход в медико-биологических исследованиях

Л.А. Болотских, Х.Х. Семенов, И.Ю. Егорова, Т.В. Галахова, Т.Б. Бескова, Н. В. Касинская

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область*

*Контактная информация: тел. (495) 561-5257 к.с.х.н. Любовь Александровна Болотских*

---

Разработана технология получения и выращивания гнотобиотических, в т.ч. лабораторных животных СПФ-статуса в изоляторной системе. Усовершенствованные методические приемы могут быть успешно использованы в лабораторном животноводстве для очистки конвенциональных животных от патогенной микрофлоры и перевода их в СПФ статус. Новый методический подход позволяет стандартизировать объекты медико-биологического исследования по микробиологическому статусу и повысить достоверность результатов эксперимента.

**Ключевые слова:** изоляторная система, гнотобиологический подход, гнотобиотические животные, СПФ-животные.

---

В связи с бурным развитием биотехнологии возрастают требования стандартности лабораторных животных как источника и продуцента биологического материала, объекта моделирования, универсальной биологической тест-системы для выявления и оценки мутагенных, канцерогенных, тератогенных, контаминирующих и других свойств и влияний среды, а также в доклинических испытаниях лекарственных и иммунобиологических препаратов [3]. В экспериментальной медицине все большее применение находят различные категории гнотобиотических животных. Все более очевидной становится необходимость проведе-

ния исследований на животных, свободных от специфических патогенных факторов (СПФ) в самых различных областях медико-биологических исследований. Предпочтение таких животных в научных экспериментах обусловлено тем, что значительно уменьшается риск появления у них спонтанной инфекции на экспериментальное воздействие, которое всегда является стрессовым фактором для организма. Важность учета влияния переменного микробного фактора, при оценке ответной реакции у лабораторных животных, имеет значение в экспериментальной патологии, физиологии, иммунологии, фармакологии, токсико-

логии, радиобиологии, биохимии и других областях медико-биологических исследований.

Вместе с тем, существовавшие до сих пор методы биологической изоляции и контроля микробного воздействия являются недостаточно совершенными и не позволяют надежно контролировать переменный микробный фактор. Используемые в экспериментах обычные лабораторные животные не контролируются по микрофлоре, что препятствует их стандартизации.

Различного рода инфекционные заболевания не только искажают полученные экспериментальные данные, но и ставят под угрозу гибель особо ценных лабораторных животных, в т.ч. и племенные ядра линейных мышей коллекционного фонда НЦБТМ РАМН.

Новым методическим подходом, позволяющим преодолеть эти недостатки и обеспечить стандартность объектов медико-биологического исследования по микрофлоре, является использование новых современных изоляторных систем. За основу в работе была положена гнотобиотехнология. В работе обобщены данные собственного опыта (с 1976 по 2010 гг.) по разработке технологии гнотобиологических систем, включающих аппаратуру и комплекс методических приемов по получению и выращиванию различных категорий гнотобиотических в т.ч. животных СПФ-статуса, контролируемых по микробному фактору [1, 2, 5, 6].

### Материалы и методы

Работа проводилась с конвенциональными мышами коллекционного фонда: WR, BRSUNT, C57B7/6, AKR, DBA/2, BALB/c. В качестве самок-кормилиц ис-

пользовали мышей СПФ-статуса линии BALB/c-wal и гибриды (DBA/2×BALB/c). Очистка мышей коллекционного фонда от патогенной микрофлоры проводилась методом гистерэктомии. Животные получали стерильный гранулированный корм и белково-витаминную добавку.

В работе использовали новое зарубежное и отечественное оборудование: изоляторная система «RAIR Isosistem<sup>tm</sup>», английский гнотобиологический изолятор «TCOL», ламинар — С-1,2; стерилизатор воздушный ГП-640-ПЗ, автоклавы ГК-100-ЗМ и т.д. Зарубежное оборудование было закуплено в 2008-2010 гг. специально для воспроизводства гнотобиотических животных.

В создании коллекционного фонда мышей СПФ-статуса строго соблюдали гнотобиологическую технологию, которая включает аппаратуру и комплекс методологических приемов, направленных на получение и поддержание гнотобиотических в т.ч. СПФ-категорий животных. Основой гнотобиологической аппаратуры в данном случае был не гнотобиологический изолятор, а приобретенная современная зарубежная изоляторная вентилируемая система «RAIR». Данная изоляторная система содержания лабораторных животных обеспечивает защиту не только самих лабораторных животных, но и обслуживающего их персонала. Специальные воздушные клапаны очищают воздух, обеспечивая комфортную температуру и влажность для животных, а также снижают контакт обслуживающего персонала с животными, обеспечивая очистку воздуха помещений от аллергенных частиц кожи и шерсти животных, существенно снижает запахи в помещении, что улучшает условия работы для персонала. В течение часа воздух в клетке обменивается до 50 раз,

при этом система обеспечивает его подачу в клетку без сквозняков. При полном отключении микро-изолятора от системы воздухоподачи СПФ-статус животных сохраняется до четырех 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 микро-изолятора, отображая его условия на табло, что существенно упрощает обслуживание клеток. Обслуживание микро-изоляторов производится по стандартным операционным процедурам, как правило, не вызывающим существенных затруднений в работе.

### ***Подготовка изоляторной системы к работе***

Монтаж и первичная подготовка изоляторной системы к работе была произведена фирмой изготовителем. Также фирма-изготовитель обеспечила обучение обслуживающего персонала основным навыкам работы. Изоляторная система состоит из 144 клеток для содержания мышей, которые снабжаются стерильным воздухом (рис. 1). Каж-



дая клетка снабжена входным и выходным фильтрами и представляет собой

микро-изолятор. Поэтому после первичного подключения работа обслуживающего персонала должна быть направлена на подготовку каждой клетки к работе, как обычного гнотобиологического изолятора. Клетки, после тщательной мойки в дезрастворе, стерилизуют в воздушном стерилизаторе. В стерильные клетки микро-изоляторы проводят всё необходимое для жизнеобеспечения животных: стерильные опилки, корм, воду и т.д. Всю работу с данной клеткой проводят в ламинаре (рис. 2). Заселение животными также производят при стерильном потоке воздуха в ламинаре.



### ***Стерилизация***

Стерилизацию проводят в основном в воздушном стерилизаторе ГП-640-ПЗ. Для новых микро-изоляторов были разработаны оптимальные режимы стерилизации. Клетки стерилизуют в воздушном стерилизаторе при 120°C 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 ГК-100-3М. Корм расфасовывают в хлопчатобумажные мешочки и автоклавируют с вакуумом при 1,2 атм. в течение

ние 20 минут. Воду автоклавируют в стеклянной посуде при 2 атм. в течение 1 часа. Следует отметить, что гранулированный корм можно стерилизовать и в воздушном стерилизаторе при соответствующих режимах стерилизации.

Апробирован и другой способ стерилизации гранулированного 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. Запайвают мешочки на машине для сварки полиэтиленовых пленок М6-АП-2С. Герметично запаянные мешочки несколько большего размера. Упакованный в двойные мешочки корм подвергают облучению в дозе 2,5 Мрад на кобальтовом облучателе. Однако этот вид стерилизации требует больших материальных затрат.

### ***Получение и выращивание гнотобиотических в т.ч. СПФ животных в изоляторной системе***

Современное оборудование позволило усовершенствовать методические приемы получения стерильного потомства лабораторных животных. Вместо обычных гнотобиологических изоляторов, на подготовку которых уходило много времени (стерилизация изолятора, продувка, проведение стерильного корма, воды, опилок, клеток, крышек и т.д.), мы брали стерильную клетку микро-изолятор. В микро-изолятор 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.

Таким образом, изоляторная система «RAIR Isosistem<sup>tm</sup>» 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 микро-изоляторах в ламинарах, надежнее проводить двум сотрудникам. Обслуживающий персонал работает с микро-изоляторами в масках и стерильных перчатках. Успех в работе во многом зависит от подготовки специалистов и их добросовестности (рис. 3).



В нашей работе использовали новый английский гнотобиологический изолятор «TCOL» для содержания самок-кормилиц СПФ-статуса. Вся работа осуществлялась согласно правилам работы с гнотобиологическими изоляторами. Были использованы ранее разработанные жесткие режимы стерилизации корма, воды, подстилочного материала и т.д.

Все необходимые стерильные материалы проводили в изолятор в специальных контейнерах (рис. 4).



### **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 представ-

ляет такой же надежный барьер, как и для других микроорганизмов. 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**

Впервые в НЦБМТ РАМН была отработана технология получения и выращивания гнотобиотических лабораторных животных, в т.ч. СПФ-статуса, в изоляторной системе. За сравнительно небольшой срок от патогенной микрофлоры были освобождены 6 линий мышей коллекционного фонда: WR, BRSUNT, C57BL/6, AKR, DBA/2, BALB/c (рис. 5), которые были помещены для дальнейшего разведения в изоляторную систему. Состояние животных хорошее.



Разработанная технология содержания лабораторных животных СПФ-статуса в изоляторной системе представляет в настоящее время большой инте-

рес как для питомников, так и для экспериментаторов. Подводя итог, можно заключить, что для организации работы с животными СПФ-статуса необходимо иметь специальное оборудование и хорошо обученный персонал. Совершенно ясно, что невозможно проводить исследования не только на нестандартных лабораторных животных, но и на гнотобиотических, в том числе животных СПФ-статуса, в неподготовленных условиях, так как при выведении животных в обычную среду их ценность сводится к нулю. Игнорирование микробного фактора в конечном итоге будет обходиться значительно дороже, чем затраты на организацию медико-биологических исследований на стандартных животных.

Таким образом, можно сказать, что новый методический подход в создании не только гнотобиотов, но и лабораторных животных СПФ-статуса существенно дополняет методический арсенал. Внедрение этого методического подхода будет способствовать решению многих актуальных проблем в современной медицине.

## Список литературы

1. **Болотских Л.А., Подопригора Г.И.** Разработка и использование гнотобиологических методов в лабораторном животноводстве / В сб.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. — М. — 1987. — с. 23.
2. **Болотских Л.А.** Гнотобиологический подход при создании лабораторных животных СПФ категории.
3. **Болотских Л.А., Лушникова З.С.** Усовершенствованный способ получения гнотобиотических животных. Биомедицина. — 2005. — № 1. — с. 114-117.
4. **Подопригора Г.И.** Гнотобиология на пути двух столетий. Вестник АМН. — 1996. — № 14. — с. 239-251.
5. **Подопригора Г.И.** Правила работы с гнотобиологическими изоляторами.
6. **Подопригора Г.И., Душкин В.А., Болотских Л.А. и др.** Оперативные методы получения безмикробных мышей, крыс и морских свинок. Вестник АМН. — 1981. — № 12. — с. 54-58.
7. **Подопригора Г.И., Душкин В.А.** Способы стерилизации гранулированного корма для гнотобиотических животных. Биомедицина. — 2007. — № 6. — с. 164-166.

## The isolator systems as a new methodical approach in medical and biological researches

**L.A. Bolotskykh, H.H. Semenov, I.Uj. Egorova, T.V. Galakhova, T.B. Beskhova, N. V. Kasinskaya**

Selection of a correct kind of a narcosis at carrying out of electroencephalographic, diagnostic and other Technology of receipt and growing of gnotobiotic laboratory animals including SPF-status animal is developed in the isolator system. The improved methodical ways can be successfully used in a laboratory stock-raising for cleaning of convention animals from a pathogenic microflora and conversion them in SPF-status. New methodical approach allows to provide standardization of animals by a microbiology factors for medical and biological researches.

**Key words:** isolator system, gnotobiotic approach, gnotobiotic animals, SPF-animals.