

Особенности работы с лабораторными животными в условиях микробиологической лаборатории

К.Е. Боровкова, микробиолог, А.А. Крышень, руководитель лаборатории микробиологии,
К.Л. Крышень, к.б.н., руководитель отдела токсикологии и микробиологии,
А.В. Петрова, микробиолог, М.Н. Макарова, доктор медицинских наук, директор

Институт доклинических исследований
Россия, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский район,
г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, дом 3, корп. 245

E-mail: borovkova.ke@doclinika.ru

Резюме. Стандартизация условий проведения экспериментов – основной критерий получения качественных результатов. На протяжении многих десятилетий лабораторные животные являются неотъемлемой частью медико-биологических исследований. Использование животных в фармакологических экспериментах оправдано в частности при оценке антимикробной активности лекарственных средств (ЛС) и субстанций, поскольку *in vivo* результаты могут значительно отличаться от *in vitro* тестов. В современном научном сообществе планирование экспериментов должно отвечать этическим принципам. Особое внимание следует уделять качеству животных. В лаборатории должна быть предусмотрена программа мониторинга состояния здоровья животных, в эксперимент следует брать животных с известным микробиологическим статусом. Условия содержания животных также важны. В микробиологических исследованиях с применением патогенных биологических агентов (ПБА) главным критерием является защита персонала и окружающей среды от зараженных животных и продуктов их жизнедеятельности. С учетом этого считается, что лучше всего содержать животных в индивидуально-вентилируемой системе. К работе с ПБА III–IV групп патогенности допускается персонал с медицинским, ветеринарным, биологическим и иным образованием, прошедшем соответствующие курсы специализации. Манипуляции с животными осуществляют обученные сотрудники под контролем ветеринарного врача. Вся работа в рамках микробиологической лаборатории ведется с соблюдением требований биологической безопасности. Выбор модели эксперимента по заражению животных может быть обоснован проведением пилотных исследований. В данном случае исследователю необходимо учесть такие особенности, как чувствительность животного, путь заражения, тропизм микроорганизмов к определенным тканям и системам, в итоге – получение экспериментального инфекционного процесса с клиническими признаками, аналогичными у человека.

Таким образом, проведение экспериментов с зараженными животными требует наличия лицензированной лаборатории микробиологии, оснащенной необходимым оборудованием и материалами, оптимальных условий содержания животных, квалифицированного и обученного персонала, а также научных знаний. Соблюдение всех правил позволит грамотно планировать микробиологические исследования с получением достоверных качественных результатов.

Ключевые слова: микробиологическая лаборатория, мониторинг здоровья животных, микробиологический статус, система индивидуально вентилируемых клеток, биологическая безопасность.

Для цитирования: Боровкова К.Е., Крышень А.А., Крышень К.Л., Петрова А.В., Макарова М.Н. Особенности работы с лабораторными животными в условиях микробиологической лаборатории. Лабораторные животные для научных исследований. 2019; 1. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-01-09>

Features of working with laboratory animals in microbiological laboratory

K.E. Borovkova, microbiologist, A.A. Kryshen, head of microbiological laboratory,
K.L. Kryshen, PhD, head of toxicology and microbiology department, A.V. Petrova, microbiologist,
M.N. Makarova, Dr. Med. Sci., director

Institute of Preclinical Studies

188663, Leningradskiy region, Vsevolozhskiy district, Kuzmolovskiy, 3, Zavodskaya st., b. 245, Russia;

E-mail: borovkova.ke@doclinika.ru

Summary. Standardization of experimental conditions is the main criterion for obtaining qualitative results. For many decades, laboratory animals have been an integral part of biomedical research. The use of animals in pharmacological experiments is justified in particular when evaluating the antimicrobial activity of drugs and substances, since *in vivo* results may differ significantly from *in vitro* tests. In the modern scientific community, the design of experiments should comply with ethical principles. Particular attention is paid to the quality of animals. The laboratory should have a program for monitoring the health of animals; animals should be taken into the experiment with a known microbiological status. Animal welfare conditions are also important. In microbiological studies using pathogenic biological agents (PBA), the main criterion is to protect personnel and the environment from infected animals and their waste products. From this point of view, keeping animals in an individually ventilated system is optimal. Personnel with medical, veterinary, biological and other education and relevant specialization courses may be allowed to work with the PBA of the III-IV pathogenicity groups. Trained staff under the supervision of a veterinarian carries out animal manipulations. All procedures within the microbiological laboratory must be conducted in compliance with the requirements of biological safety. The choice of a model of an experiment on the infection of animals can be justified by conducting pilot studies. In this case, the researcher needs to take into account a number of features: the sensitivity of the animal, the route of infection, the tropism of microorganisms to certain tissues and systems, and, in fact, obtaining an experimental infectious process to clinical signs similar to humans.

Thus, conducting experiments with infected animals requires a licensed microbiology laboratory equipped with the necessary equipment and materials, optimal animal welfare conditions, qualified and trained personnel, as well as scientific knowledge.

Compliance with all the rules will allow to competently plan microbiological research with obtaining reliable quality results.

Key words: microbiological laboratory, monitoring animal health, microbiological status, IVC-system, biological safety.

For citation: Borovkova K., Kryshen A., Kryshen K., Petrova A.V., Makarova M. Features of working with laboratory animals in microbiological laboratory. *Laboratory Animals for Science*. 2019; 1. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-01-09>

Введение

Лабораторные животные служат важной моделью в медико-биологических исследованиях. На протяжении всей истории науки в экспериментах принимали участие животные. Сторонники данных экспериментов полагали, что заражение животных поможет лучше понять природу инфекционных заболеваний. Ранние эксперименты по заражению животных представляли собой попытки воспроизвести симптомы болезней людей. Так, А. Дейдье (1670–1746) заражал животных желчью от пациентов, больных чумой, Ж.А. Виллемин (1827–1892) – заражал кроликов туберкулезным материалом от больных людей. Новым этапом в исследо-

вании инфекционных заболеваний стало выделение микроорганизмов из биологического материала (кровь, моча, гной), добавленного в питательную среду. Доказательство наличия патогенных микроорганизмов в биологическом материале и рост микроорганизмов в соответствующей питательной среде положило начало «медицинской бактериологии» [1]. В XX веке благодаря работам А. Флеминга (1881–1955), Э.Б. Чейна (1906–1979) и Г. Флори (1898–1968) был открыт пенициллин и установлен его защитный эффект против стрептококков в эксперименте на белых мышцах. Таким образом было положено начало эры лечения антибиотиками [2].

Использование животных при моделировании инфекционных заболеваний помогает ответить на важный вопрос: работает ли фармакологическое средство в живом организме?

Исследования *in vivo* с использованием лабораторных животных являются ключевым переходным звеном между оценкой *in vitro* противомикробной активности фармакологических средств и клиническими испытаниями.

Выбор адекватной модели лабораторного животного в микробиологических исследованиях зависит от множества факторов и имеет следующие особенности: восприимчивость организма и иммунный статус животного, воспроизводимость модели и рутинная техника заражения, тяжесть течения и продолжительность инфекционного заболевания, чувствительность к химиотерапии, которые должны быть идентичными или, по крайней мере, схожими с аналогичной ситуацией у человека.

В данной статье представлены особенности работы с зараженными животными в рамках микробиологической лаборатории, которые, на наш взгляд, имеют важное значение при проведении медико-биологических исследований.

Оснащение лаборатории при работе с зараженными животными

К помещениям содержания лабораторных животных в структуре лаборатории микробиологии предъявляются требования биологической безопасности, соответствующие уровню лаборатории (I–IV класс опасности по СП 1.3.2322-08 или 1–4-й уровни биологической безопасности по ВОЗ).

Помещения содержания и работы с инфицированными животными, а также микробиологические комнаты должны быть оборудованы автономными системами приточно-вытяжной вентиляции с механическим побуждением. Данные системы оснащаются фильтрами тонкой очистки F7 класса на выходе с обязательной проверкой их защитной эффективности [3]. Такая вентиляция обеспечивает надлежащее качество воздуха и стабильную окружающую среду, снижает риск перекрестного заражения переносимыми по воздуху возбудителями [4].

Все работы с животными и ПБА следует проводить в боксе биологической безопасности. Ламинарный бокс предназначен для физической изоляции (удержания и контролируемого удаления из рабочей зоны) ПБА с целью предотвращения возможности заражения воздушно-капельным путем персонала и контаминации воздуха рабочего помещения и окружающей среды, а также для защиты рабочих агентов внутри рабочей зоны от внешней и перекрестной контаминации.



Система индивидуально вентилируемых клеток в лаборатории микробиологии
ООО «Институт доклинических исследований»

Клетки содержания экспериментальных животных должны быть изолированы от персонала лаборатории, а также необходимо предусмотреть возможность их деконтаминации и дезинфекции.

С этой целью оправдано использование системы индивидуально вентилируемых клеток (ИВК). ИВК-система представляет собой установку подготовки воздуха и стеллаж со специальными клетками (см. рисунок). Следует отметить, что для работы в микробиологической лаборатории особенно важна защита оператора и окружающей среды от зараженных животных, продуктов их жизнедеятельности, частиц подстила. Выполнить эти требования можно благодаря динамической изоляции ИВК-систем за счет регулирования потока воздуха с целью создания отрицательного давления, наличию силиконовых прокладок для притирания крышки к основанию клетки, наличию микробиологических фильтров [5].

Требования, предъявляемые к персоналу

К работе с ПБА III–IV групп в лаборатории микробиологии допускаются лица не моложе 18 лет, имеющие медицинское, ветеринарное, биологическое и иное образование, прошедшие курсы специализации с освоением методов безопасной работы с ПБА III–IV групп.

К работе с животными допускается персонал, прошедший обучение по биологической безопасности для работы в лаборатории микробиологии, имеющий соответствующий опыт участия в медико-биологических исследованиях. Инструктаж по соблюдению техники биологической безопасности проводится не реже 1 раза в год.

Персонал несет ответственность за соблюдение правил содержания и использования животных. Работу персонала по обслуживанию животных контролирует ветеринарный врач, специально подготовленный для работы с ПБА III–IV групп.

Условия содержания животных

Животных в ИВК-клетках содержат в стандартных условиях, если иное не предусмотрено в плане исследования. Корм и подстил выбираются в зависимости от вида животных. При необходимости используют стерильные коммерческие средства жизнеобеспечения (подстил, корм, вода) или проводят стерилизацию данных материалов в лабораторных условиях. Оптимальным для этих целей является паровой метод стерилизации – автоклавирование. Режим стерилизации подстила и корма подбирается индивидуально опытным путем. Важным моментом при этом является сохранение потребительских качеств подстила и корма. При самостоятельной стерилизации материалов жизнеобеспечения необходимо проводить проверку качества стерилизации на всех этапах: закладка химических/термических тестов при каждой загрузке автоклава, посев на стерильность единицы партии после окончания цикла стерилизации. К работе с автоклавом допускается персонал, прошедший обучение и имеющий документальное разрешение на работу с сосудами под давлением. Срок хранения стерильных материалов также подбирают опытным путем. Замена подстила, корма и воды осуществляется на основании внутренних документов, СОП и инструкций, принятых в лаборатории. Остатки корма и воды не используют повторно, их в обязательном порядке утилизируют. В лаборатории должно быть предусмотрено отдельное помещение, склад для хранения расходных материалов и инвентаря для животных.

В помещении содержания животных ежедневно проводят уборку и дезинфекцию, 1 раз в месяц осуществляют генеральную уборку с использованием дезинфицирующих растворов. С целью защиты персонала от загрязненного подстила клетки чистят в отдельном ламинарном боксе. Собранные отходы обязательно обеззараживают доступным способом (химическим или физическим методом). Клетки моют только после предварительного обеззараживания. Стерилизация чистых клеток может проходить разными способами – химическим путем (орошение растворами дезинфицирующих средств) или физическим путем (влажным паром в автоклаве).

Требования, предъявляемые к животным

Стандартизация животных – важный аспект проведения медико-биологических исследований. Получение точных и воспроизводимых результатов эксперимента возможно лишь при соблюдении стандартов и условий его проведения. Для стандартизации лабораторных животных используют современные технологии их разведения, содержания в барьерной системе, а также единые критерии оценки состояния их здоровья [6].

Современная классификация лабораторных животных основана на методе получения животных, наличии и надежности барьера, уровне контроля статуса животного. В соответствии с данной классификацией выделяют 5 категорий:

- категория 1 – конвенциональные животные, содержащиеся в открытой системе;
- категория 2 – улучшенные конвенциональные животные, с неполной барьерной системой содержания;
- категория 3 – SPF (свободные от патогенной флоры) животные, содержащиеся в барьерной системе;
- категория 4 – SPF (максимально свободные от условно-патогенной флоры) животные, содержащиеся в барьерной системе высокой степени надежности;
- категория 5a – безмикробные (аксенные GF) животные, содержащиеся в изоляторах;
- категория 5b - гнотобиотные (категории GFX) животные, содержащиеся в изоляторах со специальным контролем.

Микробиологический статус животного является определяющим фактором для получения объективных результатов эксперимента. Известный микробиологический статус животных позволяет оптимально выбрать условия содержания последних при планировании эксперимента.

Федерация европейских ассоциаций по науке о лабораторных животных (FELASA) периодически публикует рекомендации по мониторингу здоровья лабораторных животных – мышей, крыс, хомяков, морских свинок, кроликов [7, 8].

Этические принципы

Основное положение, которое обязаны соблюдать сотрудники, работающие с животными, не причинять животным ненужные страдания и боль. Вывод животных из эксперимента должен быть гуманным и этически обоснованным.

Планирование экспериментов с соблюдением принципов «трех R»: замещение/replacement – использование экспериментальных методов, без участия животных; совершенствование/refinement – внесение изменений в содержание животных или дизайн эксперимента для улучшения состояния животных, или для устранения боли и дистресса; сокращение/reduction – использование минимального количества животных в эксперименте, но достаточного для получения необходимого объема информации [9].

Планирование и проведение работ с зараженными животными и биологическим материалом

В лабораторной практике применяют различные способы заражения экспериментальных животных: пероральное, подкожное, внутримышечное, внутрикожное, внутривенное, интраперитонеальное, интракардиальное, интраназальное и др.

При планировании исследования с заражением животных ПБА следует учитывать следующие моменты:

- видовая восприимчивость животных к патогенам;
- способность микроорганизмов вызывать инфекционный процесс аналогичный у человека;

- выбор способа заражения при котором достигаются необходимые клинические признаки заболевания.

При выборе того или иного вида животного также следует учитывать возможность его содержания в рамках лаборатории микробиологии. Так, проведение экспериментов на мелких лабораторных животных (мыши, крысы, хомяки, песчанки, морские свинки) в ИВК-системе в лаборатории микробиологии является менее трудозатратным и экономически выгодным в сравнении с аналогичными исследованиями на крупных животных (карликовые свиньи, собаки, кролики).

Умершие или эвтаназированные животные подлежат обязательному вскрытию сразу после смерти, во избежание контаминации. Манипуляции с трупами проводятся ветеринарным врачом/патоморфологом в стерильных условиях в ламинарном боксе. По окончании работ трупы животных, а также весь отработанный биологический материал подвергают обеззараживанию одним из доступных способов: автоклавирование или пересыпание хлорной известью.

Для оценки показателей в соответствии с целями и задачами исследований проводят забор биологического материала. Образцы биологического материала от зараженных лабораторных животных собирают в одноразовые стерильные контейнеры с плотно закрывающимися крышками (первичные контейнеры). Первичные контейнеры изолируют друг от друга с помощью подставки или штатива, чтобы предотвратить контакт между ними. Вокруг них укладывают абсорбирующий материал. При приеме первичных контейнеров с образцами биоматериала их помещают на поднос или лоток, покрытый многослойной марлевой салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором [10].

Заключение

Стандартизация условий проведения экспериментов, использование «чистых» лабораторных животных, позволяет получить достоверные и воспроизводимые результаты. При работе с патогенными биологическими агентами необходимо исключить риски заражения персонала лаборатории, не инфицированных животных и распространения ПБА в окружающую среду. Работа в микробиологической лаборатории подразумевает полный контроль движения ПБА, зараженных животных и их биоматериала. Участие в исследованиях с зараженным материалом принимают специалисты разного профиля: микробиологи, ветеринары, патоморфологи и др. На всех уровнях эксперимента необходимо соблюдать требования биологической безопасности. При работе с животными следует придерживаться принципов гуманной этики, не допуская мучений животных. Несмотря на все сложности проведения экспериментов в условиях *in vivo*, они позволяют получить более объективные результаты, так как чувствительность в живом организме может кардинально отличаться от проведенных испытаний методом *in vitro* на исследуемых культурах.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Handbook of Animal Models of Infection. Chapter 1 – Early History of Animal Models of Infection // Academic press. 1999. 1136.
2. Копаладзе Р.А. Эксперименты на животных и важнейшие достижения в истории биомедицины. Успехи физиологических наук, 2014. Т. 45; 3: 23–44.
3. СП 1.3.2322-08. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителям паразитарных болезней.
4. Biosafety in laboratory animal facilities. A practical approach. Brussels. 2011. 43.
5. Тращенко Д., Ковалева М. Индивидуально вентилируемые клетки – лишние финансовые вложения или оптимальная защита персонала и лабораторных животных. Международный вестник ветеринарии, 2014; 1: 100–3.
6. Болотских Л.А., Каркищенко Н.Н. Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических и биотехнических исследований. Биомедицина, 2012; 4: 101–5.
7. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. Laboratory Animals. 2014, Vol. 48 (3): 178–92.
8. FELASA recommendations for the health monitoring of breeding colonies and experimental units of cats, dogs and pigs. Laboratory Animals. 1998, Vol. 32: 1–17.
9. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных 8-е изд. Перевод с англ. Под редакцией, И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красилыцкиковой. СПб, 2014: 100.
10. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. 126.