



Институт экспериментальной медицины  
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России

## Компоненты качества биологических тест-систем в доклинических исследованиях

*Торопова Я.Г., Галагудза М.М.*

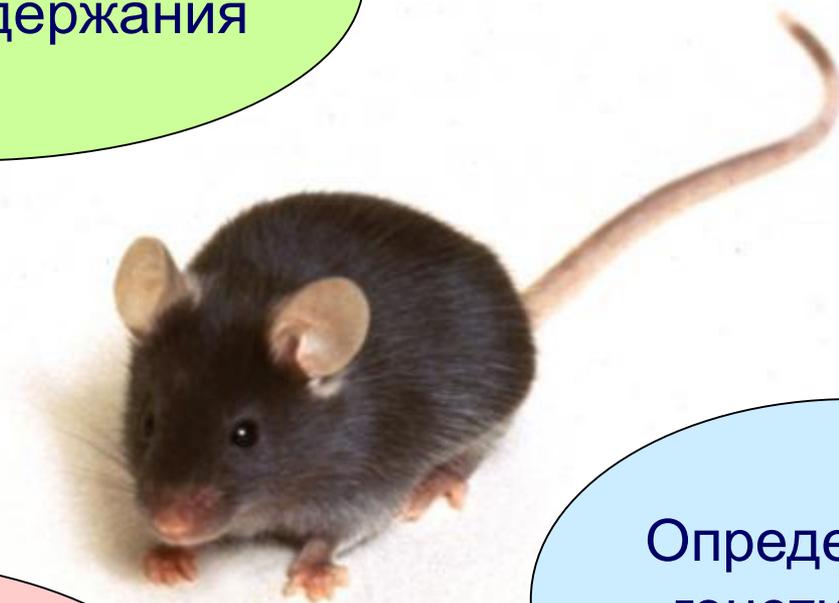


# Влияние различных параметров на результат эксперимента



# Компоненты качества лабораторных животных

Стандартизированные  
условия содержания



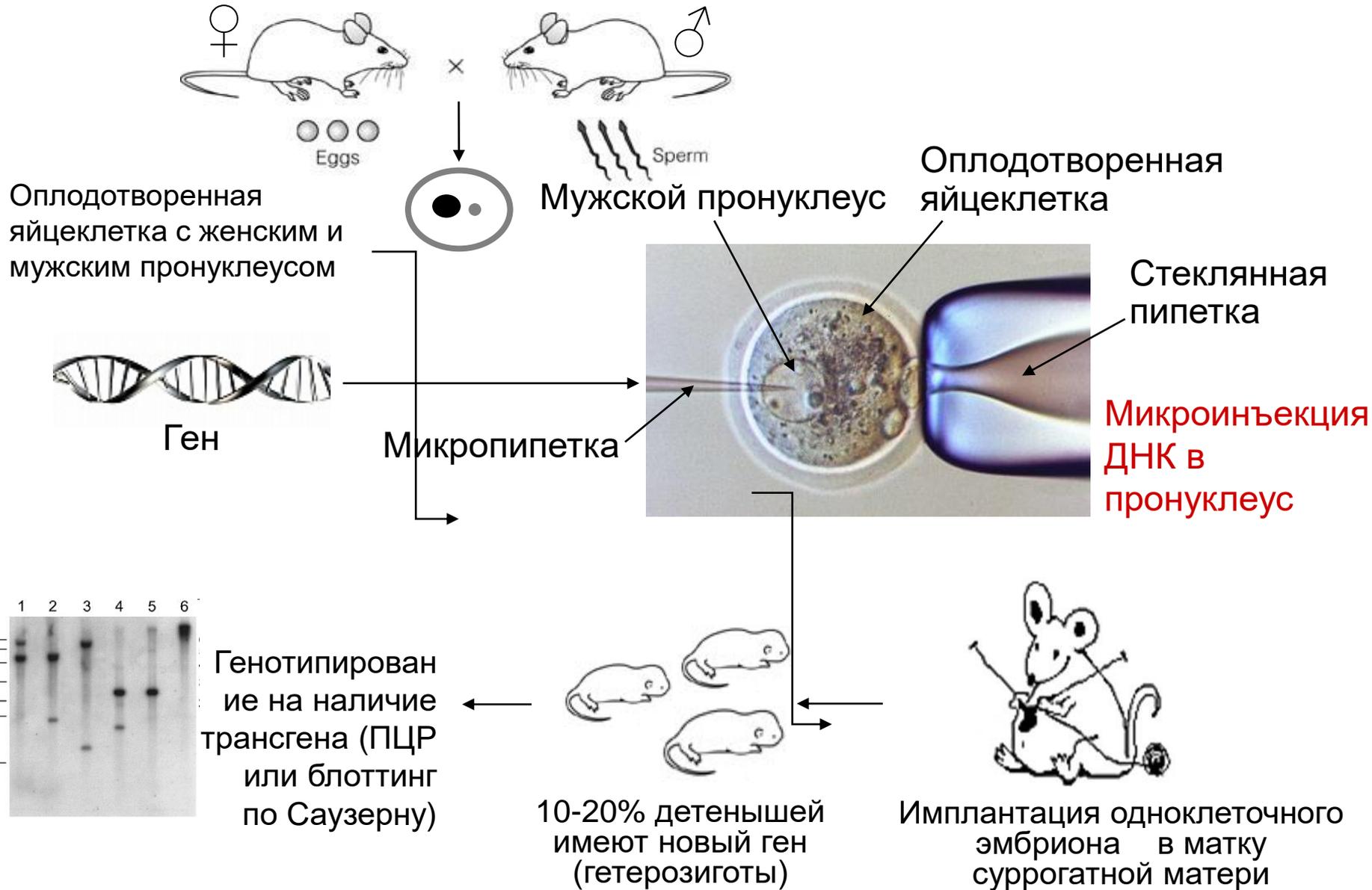
Контролируемая  
микробиота

Определенный  
генетический  
статус

# Классификация лабораторных животных в зависимости от генетического фона

- Инбредные или линейные животные: получают искусственно путем братско-сестринских скрещиваний на протяжении > 20 поколений. 100% гомозиготность, максимальная гомогенность данных
- Аутбредные или нелинейные. Для разведения требуется большое племенное ядро (250-350 голов), процент инбридинга не более 1%. Характеризуются понятием «сток». Дают максимальное разнообразие
- Генномодифицированные (биомодели): нокауты, трансгены, нокдауны и пр.

# Создание трансгенных мышей методом микроинъекции ДНК



# Влияние «незначительных» генетических различий на фенотип у лабораторных мышей

**J**ackson  
Lab., 1948

Инбредная линия  
мышей C57BL/6J

32 поколение

**N**ational Institute  
of Health, 1951

Инбредная линия  
мышей C57BL/6N

**T**aconic  
Farms, 1991

C57BL/6N

151 поколение

Наши дни

C57BL/6N

?

C57BL/6J

~ 220  
поколений



# Фенотипические различия у мышей сублиний C57BL/6J и C57BL/6N

Признаки	Lab1		Lab2		Lab3		Lab4	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Non-Invasive blood pressure: Systolic arterial pressure	Green	Grey	Green	Green	Green	Grey	Green	Green
Non-Invasive blood pressure: Pulse rate	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Calorimetry: Oxygen consumption	Red	Red	Grey	Red	Grey	Red	Grey	Red
Calorimetry: Carbon dioxide production	Red	Red	Red	Red	Grey	Red	Grey	Grey
Calorimetry: Heat production (metabolic rate)	Red	Red	Grey	Red	Grey	Red	Grey	Red
Simplified IPGTT: Blood glucose concentration	Green	Green	Grey	Green	Green	Green	Green	Green
Simplified IPGTT: Glucose response AUC	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Grey
DEXA: Fat mass	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Red
Modified SHIRPA: Locomotor activity	Green	Grey	Green	Grey	Green	Grey	Green	Grey
Modified SHIRPA: Startle response	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Grey	Grey
Grip-strength: Forelimb grip strength measurement	Green	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Grey
Grip-strength: Forelimb grip strength measurement mean	Green	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Grey
Rotarod: Latency to fall	Green	Grey	Green	Green	Green	Grey	Green	Green
Rotarod: Passive rotation	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Rotarod: Latency to fall mean	Green	Grey	Green	Green	Green	Grey	Green	Green
Acoustic Startle & PPI:110dB startle magnitude	Green	Green	Green	Grey	Green	Green	Green	Grey
Acoustic Startle & PPI:PP1 + pulse startle magnitude	Green	Green	Green	Grey	Green	Green	Green	Green
Acoustic Startle & PPI:PP2 + pulse startle magnitude	Green	Green	Green	Grey	Green	Green	Green	Green
Acoustic Startle & PPI:PP3 + pulse startle magnitude	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Acoustic Startle & PPI:PP4 + pulse startle magnitude	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow
Acoustic Startle & PPI:Prepulse inhibition - PP2	Red	Red	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
Acoustic Startle & PPI:Prepulse inhibition - PP3	Red	Red	Red	Grey	Red	Red	Red	Grey
Acoustic Startle & PPI:Global prepulse inhibition	Red	Red	Grey	Grey	Grey	Red	Red	Red
Clinical Chemistry: Glucose	Yellow	Yellow	Grey	Grey	Red	Grey	Grey	Grey
Clinical Chemistry: Urea	Yellow	Yellow	Green	Green	Grey	Grey	Green	Grey
Clinical Chemistry: Sodium	Yellow	Yellow	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Grey
Clinical Chemistry: Potassium	Yellow	Yellow	Green	Green	Grey	Green	Green	Grey

C57BL/6N > C57BL/6J    
  Нет данных  
 C57BL/6N < C57BL/6J    
  Различия отсутствуют

# Классификация лабораторных животных в зависимости от микробиологического статуса

	<b>Контроль</b>	<b>Барьер</b>	<b>Применение</b>
Конвенциональные	Возбудители зооантропонозов + абсолютно патогенные для животных МО	Отсутствует (открытая система)	Только обучение (острые опыты)
Улучшенные конвенциональные	То же, но расширенный список МО	Неполный	Рутинные исследования, кратковременные эксперименты
Максимально свободные от определенной флоры (SPF)	Регулярный, серология, бактериология (ПЦР)	Барьерная система высокой надежности	Получение культур клеток для производства вакцин (GMP),
Гнотобионты (безмикробные)	Регулярный, серология, бактериология (ПЦР и др.)	Пленочный бокс-изолятор	испытание новых лекарственных средств, поддержание перевиваемых опухолей и др.

# Влияние патогенных микроорганизмов на результаты эксперимента

- Измененный иммунный ответ (н-р, Ectromelia virus, mouse hepatitis virus)
- Измененный физиологический ответ в фармакологических и токсикологических исследованиях (н-р, Bacillus piliformis, Salmonella enteritidis)
- Измененная восприимчивость к другим инфекциям
- Канцерогенез или спонтанная неоплазия (вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Сендай)
- Контаминация перевиваемых опухолей (н-р, Mycoplasma arthritidis, Mycoplasma pulmonis, Kilham rat virus)

# Возбудители зооантропонозов (заболеваний, общих для человека и грызунов)

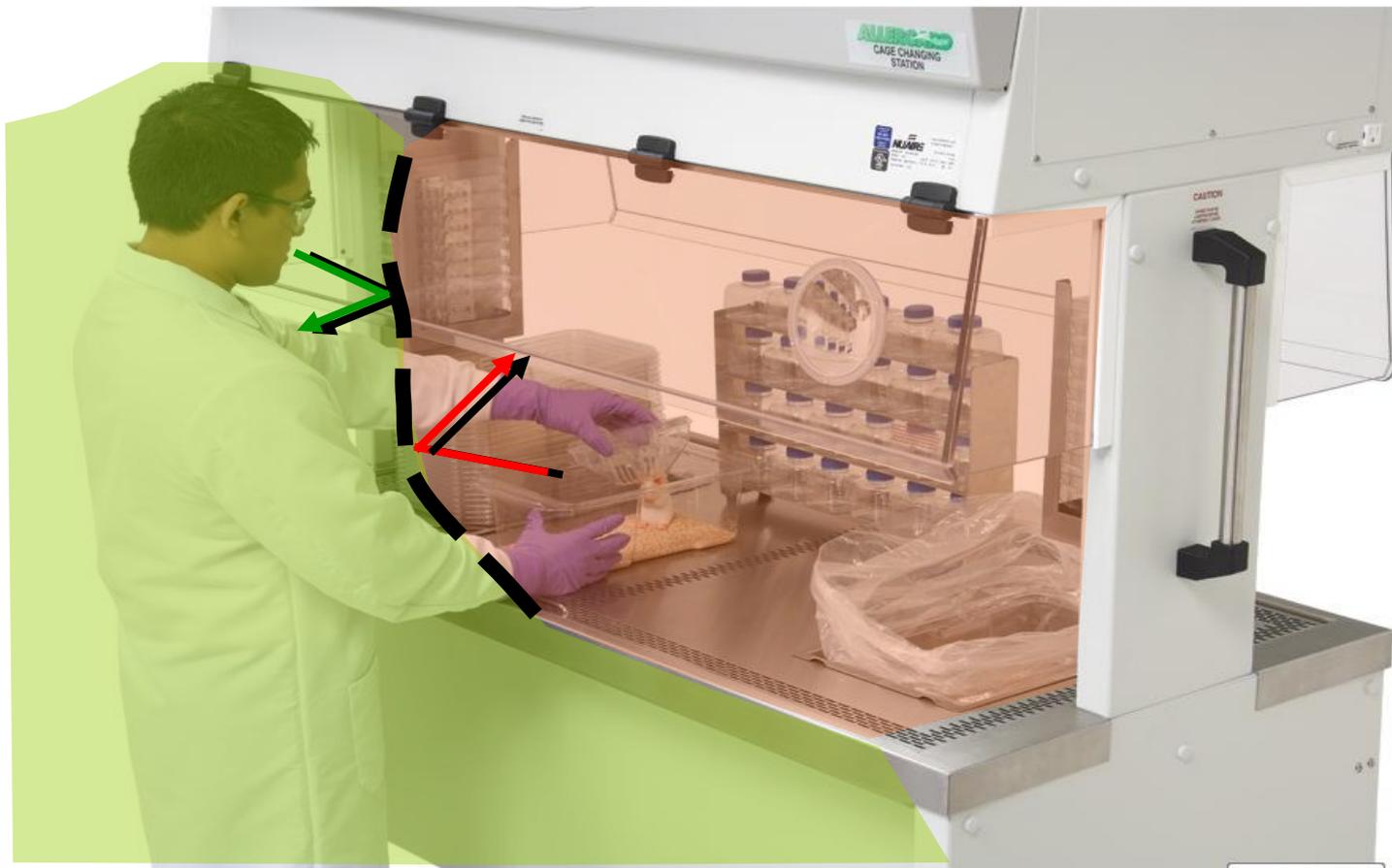
<b>Вирусы</b>	Hantavirus	Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом
	Вирус лимфоцитарного хориоменингита	Гриппоподобные симптомы, редко - менингоэнцефалит
<b>Грибы</b>	Дерматофиты	Дерматомикоз
<b>Паразиты</b>	Hymenolepis nana	Гименолепидоз
<b>Бактерии</b>	Leptospira ballum	Лептоспироз
	Salmonella enteritidis	Сальмонеллез (энтероколит)
	Streptobacillus moliniformis	Содоку
	S. pneumoniae	Пневмония, отит, сепсис

# Барьерная система содержания – гарантия качества в аспекте микробиологии и стандартных условий содержания

## Компоненты барьерной системы

- Отдельное здание вивария
- Отсутствие диких грызунов и насекомых
- Технологическая одежда
- Градиенты давления
- Санпропускники
- Фильтрация воздуха
- Стерилизация и дезинфекция
- Микроизоляторы (ИВК)
- Технологическое зонирование (от чистого к ... менее чистому)
- Ограничение доступа

# «Золотое правило» барьерной системы – защита животных и персонала



# Принципы использования барьерной системы в «повседневной жизни» вивария для животных SPF категории



Хроническая хирургическая модификация животных в операционной ISO5



Комната содержания животных

Не только патогенные МО, но и «нормальный» микробиом влияет на результаты моделирования

## Влияние кишечного микробиома у мышей на экспрессию различных заболеваний

### *Metabolic syndrome-related diseases*

Obesity

Type 2 diabetes

Atherosclerosis

### *Autoimmune or autoimmune-like diseases*

Type 1 diabetes

Arthritis

Inflammatory bowel disease

Multiple sclerosis

Lupus erythematosus

### *Allergic diseases*

Atopic dermatitis and contact hypersensitivity

Anaphylaxis

### *Cancer*

Colon cancer

### *Brain-related diseases*

Stress and depression

Anxiety

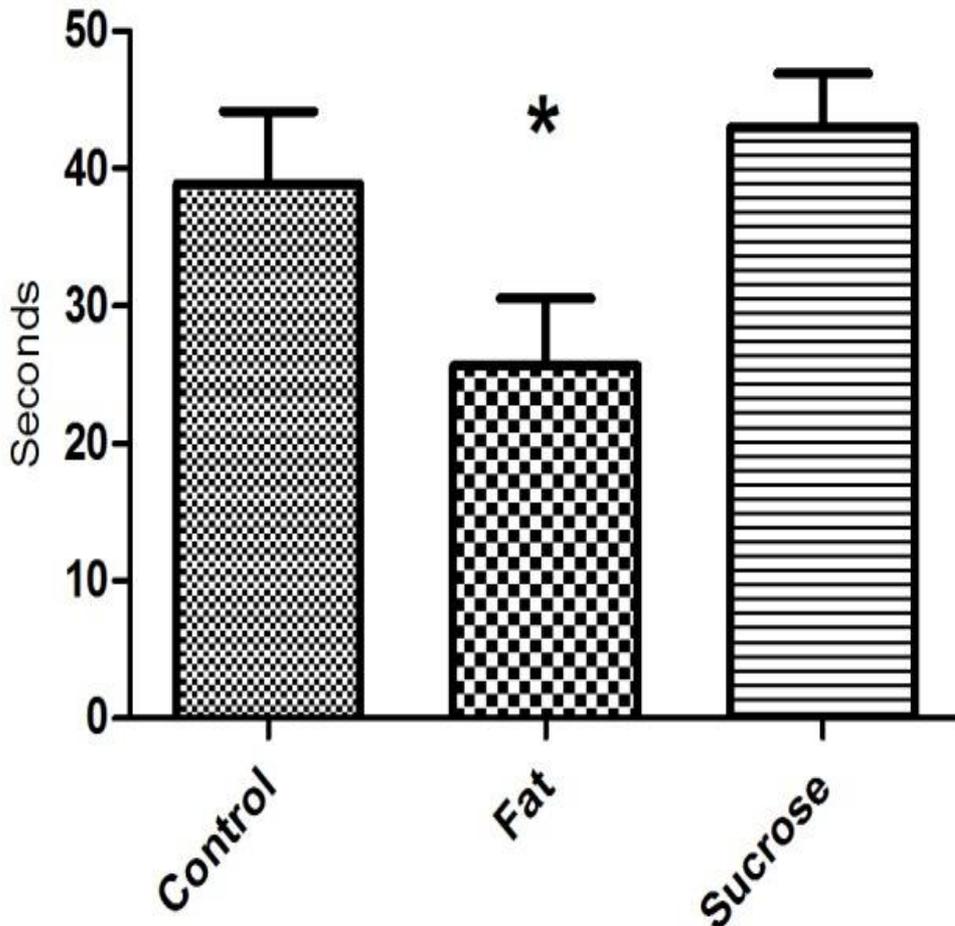
Memory

Visceral pain

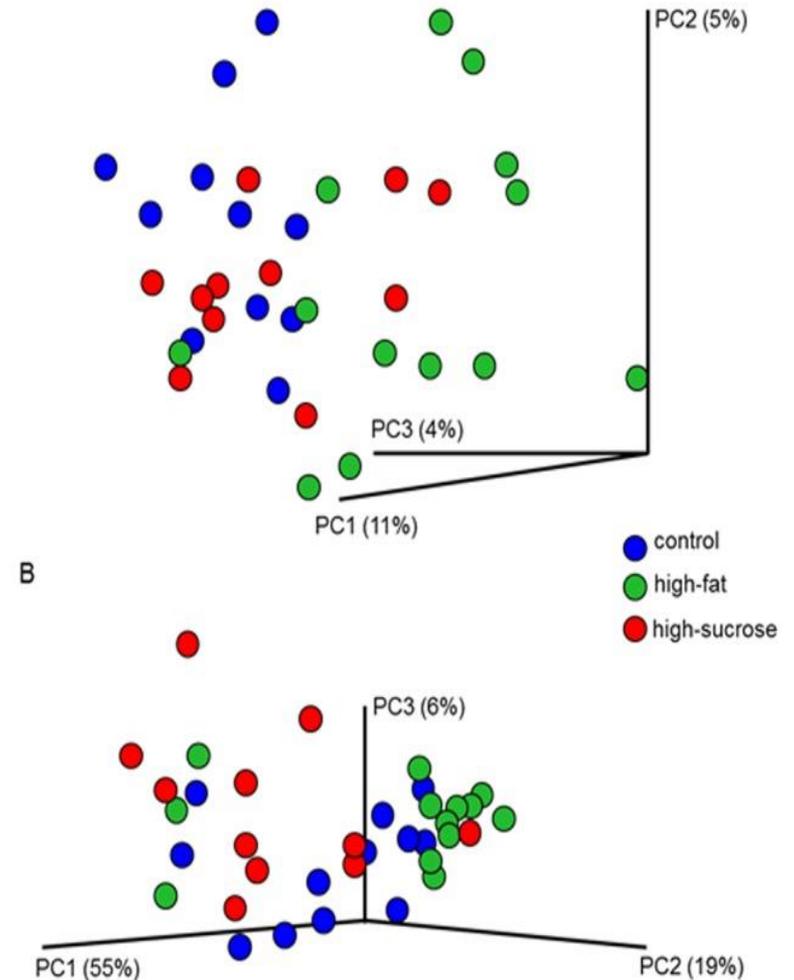
Inflammatory pain

# Диета определяет состав кишечной микробиоты и поведение у мышей

Время реакции в водном лабиринте Морриса



Состав микробиоты слепой кишки



# Основной вывод для науки о лабораторных животных

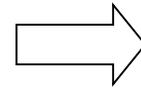
Review

Time to include the gut microbiota in the hygienic standardisation of laboratory rodents

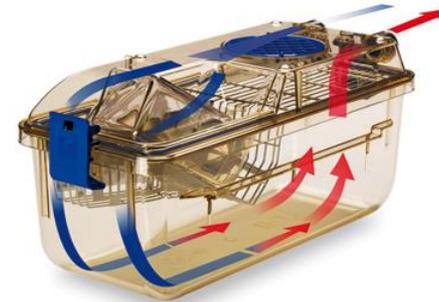
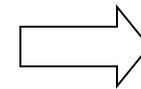
André Bleich<sup>a</sup>, Axel Kornerup Hansen<sup>b,\*</sup>

# Основные системы содержания лабораторных ЖИВОТНЫХ

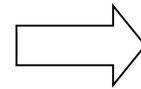
1. Содержание в открытых клетках



2. Содержание в индивидуально вентилируемых клетках (микроизоляторах)



3. Содержание в гнотозоляторах

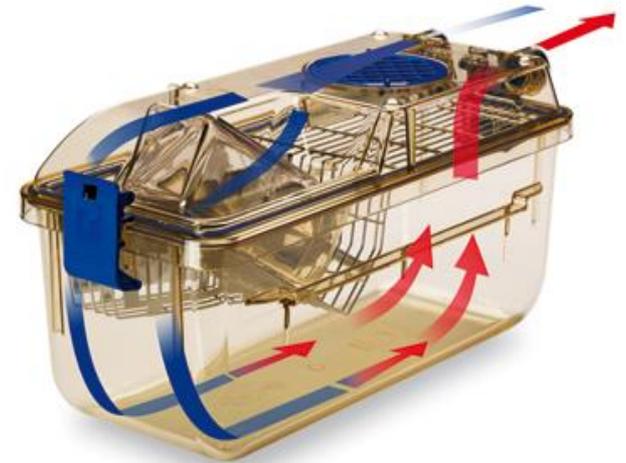


# Содержание животных в открытых клетках



Микробиологическая изоляция происходит на уровне помещения (комнаты содержания)

# Содержание животных в индивидуально вентилируемых клетках



Микробиологическая изоляция происходит на  
уровне каждой клетки

# Уход за животными в гнотозоляторе



## СП 2.2.1.3218-14 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)"

*«Помещения для содержания животных оборудуются приточно-вытяжной вентиляцией, обеспечивающей необходимую для животных кратность воздухообмена, температуру и влажность воздуха, соблюдение нормативов допустимого содержания загрязняющих веществ в воздухе помещений.*

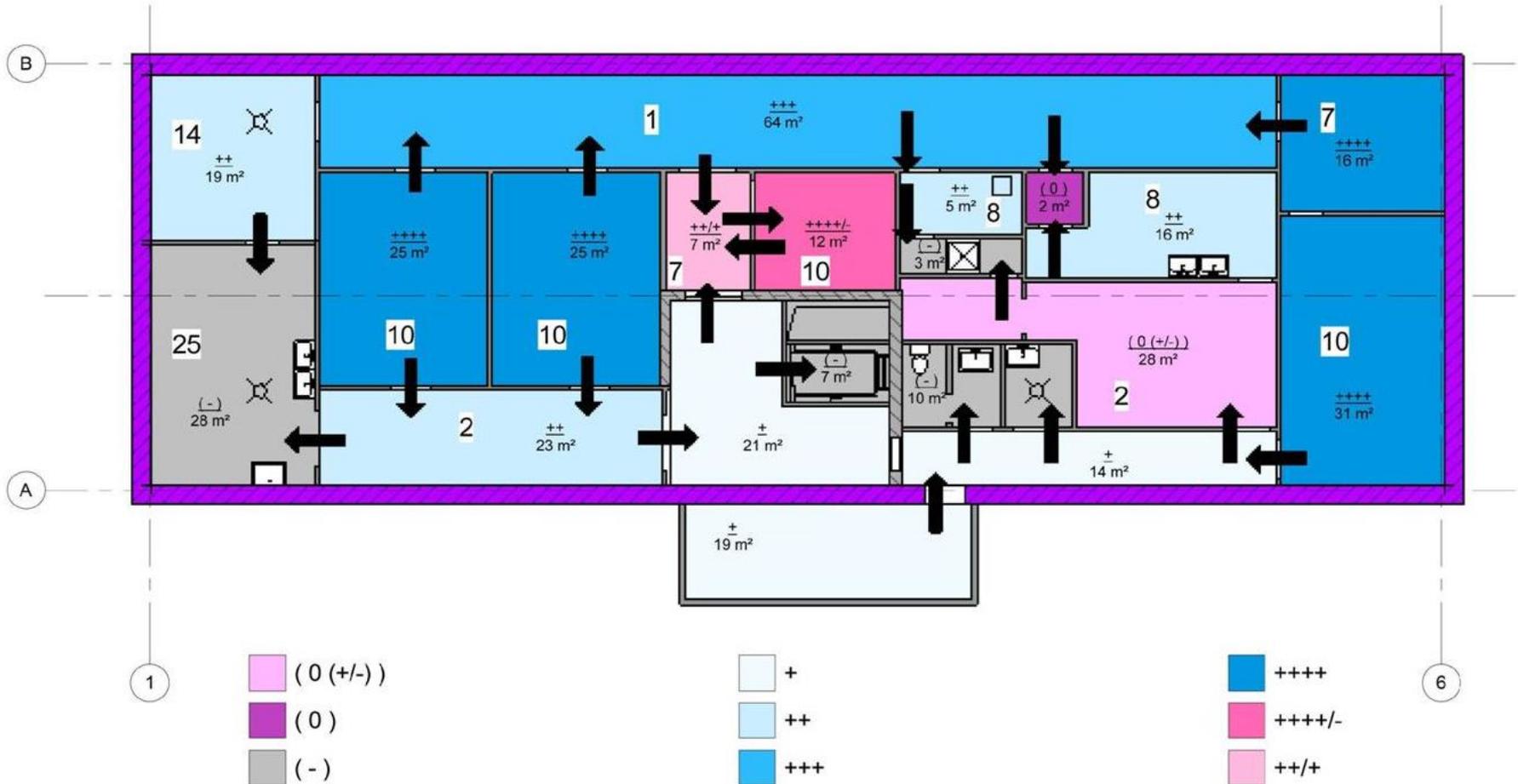
*В помещениях по обслуживанию и содержанию животных температура воздуха обеспечивается в пределах: 20 - 26°С (для мышей, крыс, песчанок, морских свинок), 16 - 22°С (для кроликов), 18 - 29°С (для кошек, собак и приматов) и 16 - 27°С (для сельскохозяйственных животных, домашней птицы); относительная влажность воздуха в пределах 30 – 70 %»*

# Способы контроля и регистрации параметров микроклимата



Автоматизированная система управления с обратной связью

# Схема градиентов давления в помещениях вивария



# Мониторинг и контроль градиентов давления



# Контроль статуса здоровья лабораторных животных

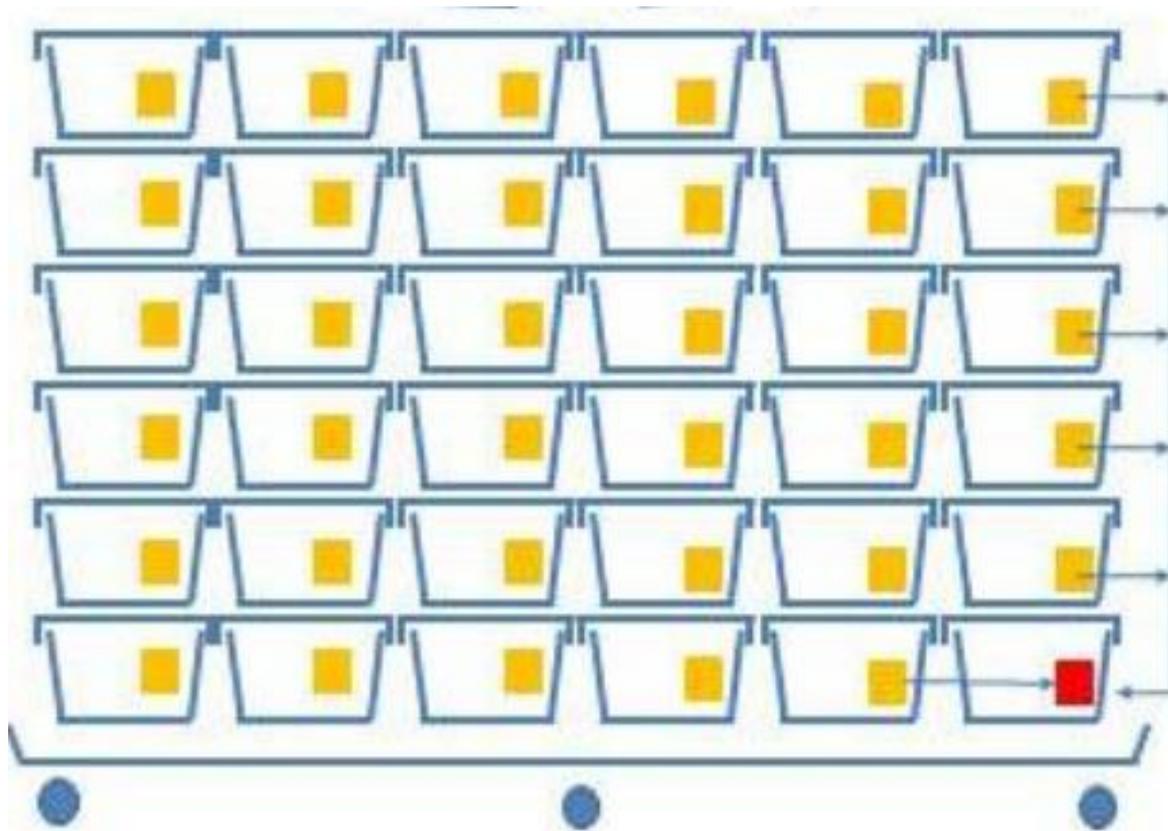


# Мониторинг здоровья лабораторных животных

- Совокупность клинических и лабораторных диагностических процедур
- Включает внутренний и внешний мониторинг
- Внутренний мониторинг (ветеринарный врач и лаборанты):
  - первичный подробный осмотр и взвешивание
  - ежедневный осмотр
  - периодический клинический осмотр (1 раз в неделю)
  - внеплановый осмотр
- Внешний мониторинг (отправка живых животных и сыворотки в сертифицированный центр):
  - программа отбора животных-сентинел
  - общая патология
  - паразитология
  - бактериология (по перечню FELASA)
  - серология (диагностика вирусных инфекций)

животные-сентинелы - индикатор возможной контаминации, должны «получить» всю потенциальную инфекцию за весь период функционирования вивария

Методика подготовки животных-сентинел с помощью переноса загрязненного подстила



# Результаты исследования биологического материала от животных-сентинел на базе ФГБУ «ВГНКИ» (Москва)

фактическое место проведения испытаний: ФГБУ "ВГНКИ"  
получен следующий результат:

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Погрешность	Норматив	НД на метод испытаний
<b>Бактериальные болезни</b>						
1	Пастереллез		не выделено			Методические указания по лабораторной диагностике пастереллезов животных и птиц. ГУВ МСХ СССР от 05. 07. 1992г.
2	Сальмонеллез		не выделено			МУ 4.2.2723-10 Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 13 августа 2010 г.)
3	Стрептококкоз		не выделено			Методические указания по лабораторной диагностике стрептококкоза животных ГУВ 25.09.1990
<b>Общий анализ кала</b>						
4	Ооцисты простейших		не обнаружено			Методические указания по лабораторной диагностике эймериозов животных от 06.06.2000 г. № 113-7-2/2045
<b>Паразитарные болезни</b>						
5	Гельминтозы в фекалиях		не обнаружено			Методические указания по диагностике гельминтозов животных УТВЕРЖДЕНЫ Главным управлением ветеринарии 29 апреля 1980 г.
6	Эктопаразиты		не обнаружено			"СБОР, УЧЕТ И ПОДГОТОВКА К ЛАБОРАТОРНОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ КРОВОСОСУЩИХ ЧЛЕНИСТОНОГИХ - ПЕРЕНОСЧИКОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ. МУ 3.1.1027-01" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 06.04.2001)

# Результаты серодиагностики у животных-сентинел (AnLab Ltd., Прага, Чехия)

Серодиагностика проводилась по малому квартальному профилю FELASA

## SAMPLE GROUPS

Strain	Sex	Age	IDs
rat sera (Wistar)	E	xxx	001-002

### SEROLOGY

All results are negative.



ID	001	002
Customer ID	5	6
<b>RAT SEROLOGY FELASA QUARTERLY 2014</b>		
ELISA KRV	-	-
ELISA RPV	-	-
ELISA RMV (RPV 2)	-	-
ELISA H-1	-	-
ELISA NS-1	-	-
ELISA PVM	-	-
ELISA SDAV/RCV	-	-
ELISA RTV	-	-
ELISA MPUL	-	-
<b>ELISA CPIL</b>		
ELISA CPIL	-	-

# Обучающий интенсив-курс «Принципы работы современного вивария и проведение исследований на животных SPF категории»

- Целевая аудитория – ветеринарные врачи, исследователи, работающие с лабораторными животными, специалисты вивариев и экспериментально-биологических клиник
- Продолжительность 40 часов
- Сертификат установленного образца
- Программа курса:
  - лекции специалистов
  - практические занятия
  - демонстрация видеоматериалов
  - решение ситуационных задач
  - панельная дискуссия «Трудные вопросы в практике Комиссии по биоэтике»
  - демонстрация наглядных пособий и образцов
  - посещение чистой зоны

# Основные темы курса «Принципы работы современного вивария и проведение исследований на животных SPF категории»

- Цель работы вивария барьерного типа и общие принципы работы
- Вопросы аккредитации вивария
- Помещения, секторы и блоки вивария, их назначение. Особенности конструктивных решений и ограждающих материалов
- Технологическое оборудование вивария
- Организация потоков материалов
- Гигиена персонала «чистой» и «грязной» зоны вивария
- Стерилизация и дезинфекция. Уборка и дезинфекция «чистой» и «грязной» зоны вивария
- Инженерные системы барьерного вивария
- Содержание лабораторных животных SPF категории
- Выполнение исследовательских манипуляций на животных в виварии. Мониторинг здоровья животных
- Основные правила проведения доклинических исследований лекарственных средств на лабораторных животных

# Занятия курса «Принципы работы современного вивария»

