

ЛЕКЦІЯ № 7

Тема: Тварини, контрольовані за мікрофлорою та паразитарними тваринами

План:

1. Класифікація тварин-моделей
2. SPF-тварини-біомоделі
3. Гнотобіотні тварини-біомоделі
4. Гнотобіоти-ссавці
5. Птахи-гнотобіоти
6. Імунні відповіді у гнотобіотів

1. Класифікація тварин-моделей

Стан лабораторної тварини як живого об'єкта залежить від впливу численних як екзогенних, так і ендогенних факторів, вплив яких далеко не завжди буває явним і легко реєструється. Серед них – фактори інфекційної та інвазійної природи. Причому різні, зокрема навіть патогенні представники вірусної і бактеріальної флори, який завжди викликають клінічно явну картину захворювання. Часто вони протікають у латентній формі або у вигляді носійства.

У багатьох країнах розроблено стандарти різних категорій якості тварин за станом здоров'я. Вони включають список збудників, носійство яких виключається. Що категорія якості тварини, то більше вписувалося перелік неприпустимих агентів. Єдиної міжнародної класифікації лабораторних тварин за категоріями якості та відповідних стандартів не існує. У зв'язку з цим тварини, які називаються SPF (Specific pathogen free), не мають чіткої характеристики якості, і, отримані з різних джерел, можуть значно відрізнятися за своїм статусом. В останні роки відзначається явна тенденція до уніфікації критеріїв якості тварин та створення єдиних стандартів. Прикладом можуть бути розробки групи дослідників європейських країн: GV-SOLAS, FELASA.

Пропонується розрізняти 5 категорій якості тварин:

- 1) конвенційні, які у відкритій системі (категорія 1);
- 2) поліпшені конвенційні, що у бар'єрній системі неповного типу. Вихідними тваринами цієї категорії можуть бути лише тварини вищого класу якості (SPF). Ця категорія якості тварин відповідає категорії, яка називається в багатьох країнах MD (Minimal Diseases), або (категорія 2);
- 3) категорії SPF-тварини, що містяться у суворій бар'єрній системі (категорія 3);
- 4) гнотобіоти;
- 5) безмікробні або аксенові тварини, які утримуються в ізоляторах (категорії 4, 5a та 5b).

Категорія	Характеристика	Метод отримання	Використання
1	конвенційні	випадковий	з метою навчання (гострі дослідження)
2	поліпшені конвенційні	Від тварин вищої категорії якості	рутинні дослідження в короткочасних експериментах
3	SPF (СПФ або вільні від патогенної флори)	Від тварин, які утримуються в	у виготовленні стандартних препаратів,

		ізоляторах та асоційовані з певними мікроорганізмами	<i>випробуванні на токсичність препаратів; хронічні експерименти тривалістю 6 міс.</i>
4	SPF або СПФ (Максимально вільні від умовно-патогенної флори)	Від гнотобіотних чи безмікробних тварин, асоційованих з певними мікроорганізмами	Одержання культур клітин під час виробництва вакцин, підтримання штамів бактерій і вірусів, що переживаються
5a	Безмікробні (аксенні GF)	Гістеректомія. Вільний від будь-якої чи відомої форми життя мікроорганізмів	пухлин, випробування нових фармакологічних засобів, проведення фундаментальних досліджень імунітету, запалення та ін.
5b	Гнотобіотні (категорії GFX)	Використовуються для опису тварин і систем, всі форми життя яких відомі	

2. SPF-тварини-біомоделі

Конвенційні тварини є тваринами-носіями різних невідомих мікроорганізмів. Такі тварини можуть утримуватися як у стерильних, так і у звичайних умовах та є потенційними носіями патогенів.

Звичайні лабораторні тварини, які використовуються в біомедичних дослідженнях, – просто здорові особини. Використовувати в дослідженнях тварин-гнотобіотів практично неможливо через їх надзвичайну дорожнечу, зрозумілу необхідність його утримання в ізоляторі.

Протилежністю цьому є SPF-тварини, які вільні тільки від патогенних мікроорганізмів і мають всю необхідну мікрофлору для здійснення фізіологічних функцій. СПФ-тварини ростуть швидше за звичайні, рідше хворіють і можуть служити ядром для племінних ферм, вільних від інфекційних захворювань.

SPF-тварини, мікробіологічний статус яких підтверджений, є економічнішою альтернативою гнотобіотам. Проте гнотобіотні технології представляють найкращий спосіб розвитку базової лінії SPF-тварини.

Виробництво SPF-тварин:

Спочатку безмікробних тварин з нерозвиненою системою імунного захисту асоціюють з «коктейлем» аеробних та анаеробних мікробів-симбіонтів. Ця непатогенна мікрофлора сприяє розвитку системи імунного захисту, яка у свою чергу дозволяє тваринам вижити поза ізолятором в умовах звичайного утримання. Очікується, що тварина отримає із довкілля додатково деякі непатогенні організми, що завершить чи стабілізує кишкову флору.

Здоров'ю колоній лабораторних тварин постійно загрожують інфекції. Неможливо захищати колонії тварин від вторгнення небажаних організмів вічно.

При належному обладнанні та догляді можна підтримувати задовільний стан здоров'я колоній SPF-тварини протягом кількох років. Але навіть у оптимальних умовах статус здоров'я колонії поступово знижуватиметься і призведе до необхідності знову створити популяцію

тварин зі свіжого біоматеріалу. Перед тим як приступити до відновлення колонії, необхідно попередньо ретельно вичистити і продезінфікувати відсік, в якому містилися тварини.

3. Гнотобіотні тварини-біомоделі

Гнотобіологія (від грецьких слів *gnotos* - відомий і *bios* - життя) - розділ експериментальної біології, що займається отриманням та вирощуванням стерильних тварин (гнотобіотів), а також тварин, мікрофлора яких представлена одним або декількома видами мікроорганізмів. Гнотобіоти використовуються у ветеринарії для вивчення хвороб, сільськогосподарських тварин із нез'ясованою етіологією, а також для з'ясування ролі мікробів у патогенезі багатьох хвороб. На основі використання гнотобіологічної техніки проводяться роботи із запобігання інфекційним хворобам сільськогосподарських тварин: створюються стада тварин типу СПФ (без специфічних патогенних факторів). Господарства, що включають СПФ-стада, повинні працювати за типом закритих підприємств із суворими ветеринарно-санітарними правилами режиму господарства.

Безмікробні та гнотобіотичні моделі не є альтернативою експериментам з використанням звичайних тварин, це об'єкти, придатні для специфічних досліджень.

Гнотобіологія – це виробництво у наукових цілях біологічних організмів – тварин, рослин та людей, наявність у яких корисних чи нетипових мікроорганізмів повністю відома в межах сучасної діагностики.

Гнотобіотні тварини можуть бути:

- ✓ безмікробними – тобто вільними від усіх видів мікроорганізмів (вірусів, бактерій, грибків та паразитів), які можна виявити сучасними методами діагностики;
- ✓ моно-, ді- та поліасоційованими – в організмі яких присутні 1, 2 або кілька видів відомих мікроорганізмів (спочатку безмікробна тварина, заселена одним або більше видом відомих мікроорганізмів).

Тварини-гнотобіоти мають вирощуватись в ізоляторах. Ізолятор повинен мати деякі обов'язкові ознаки:

- внутрішня поверхня та вміст безмікробного простору, клітини або приміщення повинні бути виконані з безмікробних матеріалів і в ньому має підтримуватися безмікробне середовище;
- до внутрішнього простору ізолятора та його вмісту має бути забезпечений зоровий доступ;
- необхідна наявність спеціальних пристосувань для маніпуляцій усередині ізолятора, а також для розміщення в ньому гнотобіотного вмісту ззовні без ризику порушення гнотобіотних умов;
- повинні бути обладнані шлюзи для переміщення безмікробних тварин та матеріалів у та з простору без порушення внутрішніх гнотобіотних умов;
- щоб уникнути порушення безмікробних умов, повинна бути обладнана вентиляційна система, що дозволяє провітрювати простір приміщення і створює всередині нього позитивний тиск.

Виробництво безмікробних ссавців можливе завдяки тому, що ембріон у лоні здорової матері є мікробіологічно стерильним. Незадовго до закінчення вагітності плід може бути витягнутий асептично за допомогою гістеректомії (видалення матки) або кесаревого розтину і поміщений в стерильний ізолятор. Молодняк може бути вигодований у ізоляторі безмікробною прийомною матір'ю або штучним молоком за складом, наближеним до натурального. Ця процедура на сьогоднішній день рідко використовується в лабораторіях для отримання гнотобіотних мишей та щурів, оскільки вони є у продажу. Популяції гнотобіотів повинні

включати достатню кількість особин репродуктивного віку для підтримки генетичної одноманітності потомства.

Безмікробні тварини інших видів, ніж миші чи щури, мають вирощуватися самим споживачем. Не представляє особливої складності отримання безмікробних морських свинок, оскільки їх дитинчата досить розвинені на момент появи на світ і не вимагають тривалого, а іноді навіть штучного вигодовування. Низькі показники виживання у кролів. Котів, собак та деякі види сільськогосподарських тварин можна виростити безмікробними, але через їх значний розмір вони становлять труднощі для тривалого утримання в ізоляторах.

4. Гнотобіоти-савці

Існують оперативні та консервативні способи отримання гнотобіотичних тварин першої генерації.

Технологічно для отримання гнотобіотів застосовуються різні модифікації гістеректомії і гістеротомії (видаленні плода через зроблений в матці розріз (виконується через черевну стінку). У першому випадку вилучення матки з ембріонами проводиться в асептичному середовищі, поза ізолятором, з подальшою її перев'язкою переносом через бактерицидний гідрошлюз в стерильне місце камери ізолятора. В камері плоди витягуються і звільняються від плодових оболонок.

У другому випадку операція здійснюється за допомогою операційного блоку хірургічного ізолятора. Операція проводиться зсередини ізолятора через плівку операційного блоку та склесні з нею шкірні покриви живота вагітної самки, з подальшим вилученням плодів із вагітної матки безпосередньо в стерильне місце камери хірургічного ізолятора. Гнотобіоти необхідних інбредних ліній можуть бути отримані шляхом однієї з модифікацій кесаревого розтину з використанням лактуючої гнотобіотичної самки для вирощування новонароджених тварин в ізоляторі.

З консервативних способів у літературі описані методи отримання гнотобіотів із дорослих особин шляхом обробки антибіотиками та антимікробними препаратами. Проте нині такий метод поширення не отримав.

Методи отримання поросят-гнотобіотів включають гістеректомію та засновані на факті непроникності здорової інтактної плаценти для більшості мікроорганізмів. Тварини-гнотобіоти застосовуються вивчення деяких аспектів респіраторних хвороб людини, приготування тканинних культур, стандартних моноспецифічних сироваток, вивчення ефектів зміни стандартної мікрофлори, і навіть цілого ряду імунологічних проблем.

З використанням хірургічних ізоляторів у свиней застосовувався метод гістеротомії для отримання безмікробних поросят. Безмікробні поросята та свині представляють особливу цінність для досліджень у галузі імунобіології та патології, враховуючи відсутність у них трансплацентарної передачі імуноглобулінів та антитіл материнського походження. Крім того, завдяки морфофункціональним подібностям цілого ряду систем (кровообігу, травного тракту, шкіри, серцево-судинної та ін) з аналогічними системами та органами у людини цей вид тварин знаходить все більше застосування у моделюванні захворювань людини. В експериментах особливу цінність мають мініатюрні породи свиней.



Клітина ZL-100 для конвенційного утримання лабораторних свиней та мініпігів

Здатність до активного способу життя морських свинок та самостійного харчування відразу після народження дали можливість отримання та вирощування тварин цього виду. Однак вирощування безмікробних морських свинок до статевозрілого віку є серйозною технологічною проблемою, пов'язаною з підбором адекватних дієт та усуненням надмірного розтягування сліпої кишки. Останній феномен, що відзначається у безмікробних гризунів, значною мірою виявлявся цього виду гнотобіотів. Тому розмноження морських свинок у безмікробних умовах вдалося отримати значно пізніше, ніж безмікробних щурів та мишей.

Одержання гнотобіотичних морських свинок здійснюється оперативними методами. Для оперативного отримання безмікробних морських свинок використовують хірургічні гнотобіологічні ізолятори або ізолятори, забезпечені антибактеріальним гідрошлюзом (для гістеротомії). Тривалість вагітності у морських свинок варіює від 61 до 68 днів. При відборі вагітних самок для операції орієнтуються на об'єктивні ознаки: розм'якшення лонного зчленування, розбіжність лонних кісток на 20-22 мм.



Перші експерименти з отримання безмікробних кроликів було розпочато у 40-х роках. ХХ століття. Модель безмікробних кроликів була вперше отримана та застосована у вивченні патогенезу холерної інфекції та механізмів інтоксикації наприкінці 70-х років. Враховуючи, що вагітність у кролиць триває рівно 30 днів, відбір вагітних самок для операції труднощів не представляє. Зазвичай тварин оперують в останній день вагітності. Для операції використовуються дві модифікації кесаревого розтину: гістеротомія та гістеректомія, але враховуючи перевагу місцевої анестезії для виживання кроленят, кращий метод гістеректомії.

Роботи з отримання безмікробних хом'яків було розпочато 1960 р. Безмікробних хом'яків отримують з допомогою як оперативних методів, і методами деконтамінації (звільнення від патогенних мікроорганізмів). Можливе перехресне вигодовування новонароджених хом'ячків лактуючими самками інших видів гризунів.

Методом селективної деконтамінації у сирійських хом'ячків можна звільнити шлунково-кишковий тракт цих тварин від кишкових джгутикових та *Pasteurella pneumotropica*. Процедура включала введення з питною водою сульфату дигідростертоміцину (2 г/л), а також диметридазолу (800 мг/л). Для усунення *P. pneumotropica* в защіпні мішки тварин вводили 0,5 мг пасти, що складається з неоміцину (27 мг/г) та дигідрострептоміцину (27 мг/г). Подібна процедура триває 4 тижні, після чого тварин утримують у стерильних камерах з ламінарними потоками стерильного повітря. Методика дозволяє усунути аеробні, грамнегативні бактерії, а

також кишкові джгутикові. Для повнішої деконтамінації використовують купання хом'ячків у бактерицидній ванні з подальшим перенесенням у стерильний гнотобіологічний ізолятор. Суміш антибіотиків для деконтамінації включає (мг/100 мл): амфотерицин – 10, ампіцилін – 50, бацитрацин – 500, хлорамфенікол – 100, колістинсульфат – 500, фузидин – 50, канаміцин – 400, 00 G – 100, поліміксин В – 25, стрептоміцин сульфат – 250, тетрациклін – 50, триметоприм-сульфаметоксазол – 15, тилозинтарtrat – 50. Методика дозволяє вирощувати деконтамінованих хом'ячків протягом низки генерацій.

Отримання м'ясоїдних лабораторних тварин, до яких відносяться собаки і кішки, в безмікробних умовах становить особливий інтерес для експериментальної медицини, і зокрема таких її розділів, як нормальна та патологічна фізіологія, інфекційна та неінфекційна патологія, алергологія, токсикологія, експериментальна хірургія та ін.

<i>Стелаж із нержавіючої сталі для конвенційного утримання лабораторних собак</i>	<i>Стелаж із нержавіючої сталі для конвенційного утримання лабораторних котів</i>
	

З середини ХХ століття розпочато роботи з одержання та застосування в медико-біологічних експериментах безмікробних мавп. Для отримання в безмікробному стані користувалися операцією гістеротомії у вагітних самок павіанів з використанням хірургічного плівкового ізолятора типу Трекслера. У подібних ізоляторах здійснювали їх подальше вирощування з використанням для штучного вигодовування комерційної дієти SMA, збагаченої залізом, розведеною водою у співвідношенні 1:1,1. Через 1-2 дні мавпи привчалися до самостійного харчування. У віці 2 місяці гнотобіотичні мавпи переводилися на брикетований корм, змішаний із молоком. Досвід вирощування мавп безмікробних протягом 10 міс. показав добрі результати.



Стелажі з нержавіючої сталі для утримання лабораторних мавп

5. Птахи-гнотобіоти

Методики отримання гнотобіотів були також розроблені та адаптовані щодо інших сільськогосподарських тварин і птахів. Описано методи отримання гнотобіотичних ягнят, козенят, телят, свиней, а також гнотобіотичних птахів (курчат, перепілок, індичок, качок). Одержання цих тварин засноване на тих самих принципах, описаних і для лабораторних тварин.

Отримати безмікробних птахів відносно легко, але у них вищий, ніж у ссавців, ризик випадкового зараження. Яйця потрібно брати від здорових батьків, щоб уникнути ризику інфікування ембріона на цій стадії. Найчастішим джерелом зараження є мікроорганізми, що знаходяться під шкаралупою та на її поверхні, тому брати можна лише яйця з абсолютно чистою шкаралупою. Вони поміщаються у звичайний інкубатор, але витягуються звідти кілька днів до передбачуваного вилуплення пташенят. Під час інкубаційного періоду яйця необхідно підтримувати у ідеальній чистоті. Поводитися з яйцями можна тільки в рукавичках, але мити або скрести їх не можна, так як це може пошкодити їх захисний шар. Інкубатор також повинен бути ретельно вимитий та поміщений у зону, очищену від пилу.

За 2 дні до вилуплення пташенят яйця поміщають у ізолятор, попередньо деконтамінувавши їх. На цій стадії яйця ще раз перевіряють та вибраковують ті, на яких виявили цятки, тріщини або бруд. Їх просвічують і в ізолятор поміщають лише запліднені яйця. Зазвичай яйця поміщають у шлюз, обприскують їх 2% розчином пероцтової кислоти та залишають на 30 хвилин. Лише після цього вони можуть бути поміщені до ізолятора. Температура в ізоляторі повинна бути 37-38 ° С, при відносній вологості повітря 70-80%. Збільшити вологість можна за допомогою ємностей із водою або змочених бавовняних ватних тампонів. Для контролю умов усередині ізолятора туди поміщають вологий та сухий термометри. У період вилуплення необхідно підтримувати достатній доступ повітря до ізолятора.

Після вилуплення ізолятор очищають від шкаралупи та дають пташеняткам їжу та воду. Вони швидко вчаться самостійно їсти та пити. Тоді температуру в ізоляторі знижують до 35°З протягом двох тижнів поступово доводять до кімнатної. Від пір'я птахів та розфарбованої їжі з'являється велика кількість пилу. Рідкі виділення та розлита питна вода можуть суттєво підвищити рівень вологості. Для підтримки вологості на комфортному рівні необхідно забезпечити хороше провітрювання ізолятора. Вихідні фільтри можуть забиватися пилом та конденсованою вологою, у цьому випадку рекомендується встановити ще один ступінь механічного очищення та вологопоглинач. Замість вихідних фільтрів можна використовувати альтернативні пристрої.



Стелаж із нержавіючої сталі для конвенційного утримання лабораторних птахів

6. Імунні відповіді у гнотобіотів

У гнотобіотів відсутні антигенне «подразнення» імунної системи, що обумовлює недорозвинення імунокомпетентних органів (тимусу, лімфоїдної тканини кишечника), дефіциту IgA, низки вітамінів. Як наслідок, у гнотобіотів порушуються фізіологічні функції: зменшується маса внутрішніх органів, об'єм крові, знижений вміст води у тканинах. Дослідження з використанням гнотобіотів дозволяють вивчати роль нормальної мікрофлори у механізмах інфекційної патології та імунітету, у процесі синтезу вітамінів, амінокислот. Заселяючи організм гнотобіотів тими чи іншими видами (спільнотами) мікроорганізмів, вдається виявляти фізіологічні функції цих видів (спільнот).

Гнотобіологічні моделі важливі у вивченні первинної імунної відповіді.

Одним із найцікавіших об'єктів для таких досліджень є безмікробні поросята, особливо позбавлені антигенного впливу. Систематичні дослідження онтогенезу імунної відповіді на безмікробних та безантигенних поросятах дозволили зрозуміти шляхи розвитку та диференціації імунної системи залежно від антигенного впливу.

Виняток антигенної стимуляції проявляється у безмікробних тварин у недостатньому розвитку лімфоїдної тканини, клітинних та гуморальних факторів імунітету. Лімфоїдна тканина у них знаходиться в тому вихідному стані, який відзначається у новонароджених тварин і на основі якого відбувається її подальший розвиток після першого контакту з мікробними та іншими антигенами при народженні тварин.

При цитологічних дослідженнях вторинних лімфатичних органів у безмікробних поросят наявність плазматичних клітин виявити не вдалося.

Знижено у безмікробних тварин рівні сироваткових глобулінів, що пояснюється зниженою антигенною стимуляцією порівняно із звичайними тваринами.

Для гнотобіотів характерно недорозвинення лімфоїдної тканини в лімфоїдних органах, що дренують слизові оболонки, що контактують з мікробним середовищем.

У безмікробних тварин відзначається також знижена маса підщелепних лімфатичних вузлів. Відповідно встановлені і відмінності у вмісті клітинних елементів у лімфоїдній тканині безмікробних тварин. імунокомпетентних клітин. У лімфовузлах безмікробних тварин особливо знижено кількість великих та середніх лімфоцитів, великих піронінофільних та плазматичних клітин. Знижені рівні імуноглобулінів у безмікробних тварин не означають зниження імунокомпетентності лімфоїдної системи та її здатності до імунної відповіді. Утворення антитіл у безмікробних тварин спостерігається вже через 48 годин після антигенної стимуляції. Після асоціації гнотобіотичних мишей з гексафлорою у останніх відзначалося підвищення концентрації сироваткових IgG1, IgG2a та IgA, причому рівні IgA та IgG1 навіть перевищували відповідні значення у звичайних тварин.

У безмікробних поросят віком 1,5 міс. встановлені різко знижені рівні імуноглобулінів класів M і G, тоді як рівні IgA були однаково низькими в сироватці крові як безмікробних, так і звичайних поросят. Ці показники у гнотобіотів підвищувалися більш ніж у 2 рази після моноасоціації з непатогенною кишковою паличкою *Escherichia coli* 083. Особливо високі рівні IgG, що не відзначалися у безмікробних тварин, виявлялися у гнотобіотичних поросят, моноасоційованих з непатогенними мікроорганізмами. Показники сироваткових фракцій глобулінів та аглютинінів у безмікробних тварин у 1,5–3 рази нижчі, ніж у звичайних тварин. У лімфоїдних елементах слизової оболонки кишечника синтезу імуноглобулінів не виявлено, тоді як у звичайних тварин, а також у гнотобіотичних мишей після конвенціоналізації відзначається секреція у просвіт кишечника імуноглобулінів, в основному IgA-класу.