
Universidad de Guadalajara
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS



**“MONITOREO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN UNA
INSTALACIÓN QUE MANTIENE Y REPRODUCE ROEDORES
CON FLORA DEFINIDA PARA EXPERIMENTACIÓN”**

**Tesis Profesional que para obtener el Título de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

Blanca Lilia Nuño Merín

Las Agujas, Zapopan, Jal. Enero de 2007



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología
950/ C. C. BIOLOGÍA

C. BLANCA LILIA NUÑO MERÍN
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción **Tesis** con el título: **"Monitoreo de las condiciones ambientales en una instalación que mantiene y reproduce roedores con flora definida para experimentación"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **DR. GERARDO ARELLÍN ROSAS** y el asesor/es es el/la: **DRA. JOSEFINA CASAS SOLÍS.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 8 de Enero del 2007.

"2006. Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas.
Don Benito Juárez García"

DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

M en C. ISELA LETICIA ALVAREZ BARAJAS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

BIBLIOTECA CUCBA

Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente


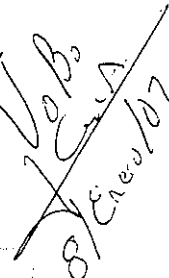
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad: tesis con el título: "Monitoreo de las condiciones ambientales en una instalación que mantiene y reproduce roedores con flora definida para experimentación" que realizó la pasante Blanca Lilia Nuño Merin con número de código 092733602 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.


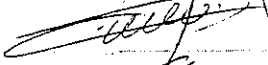


Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Lugar y fecha.

Guadalajara, Jalisco 20/10/06


 Firma
Gerardo Arrellín Rosas
 Director/a del trabajo,


 Firma
Josefina Casas Solis
 Asesor(es)


Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
DRA. ESTHER ALBARRAN RODRIGUEZ.		20/12/06
QFB. ADOLFO CARDENAS ORTEGA.		05-12-06
BIOL. SERGIO ALVAREZ BARAJAS. Supl.		20-12-06
DRA. MARTHA CATALINA RIVERA C.		20-12-06

“Monitoreo de las condiciones ambientales en una instalación que mantiene y reproduce roedores con flora definida para experimentación.”

El presente trabajo se llevó a cabo en el Bioterio de la planta baja edificio 2B del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del M.V.Z. EPPE Gerardo Arellín Rosas.

DEDICATORIA.

A las mujeres de mi vida: mi mamá Cuca † por darme su vida, mi mamá Paty por darme la vida y mi hija Sofía.

AGRADECIMIENTOS.

A mi abuelita Cuca, a mi madre, a mis hermanos y a mi hija por que si ellos esto no seria posible.

Al Dr. Gerardo Arrellín por la oportunidad de realizar esta tesis y por su amistad.

A la Dra. Gina, a la Sra. Jose y al Dr. Adolfo por su apoyo durante mi estancia en el bioterio.

A Doris por su amistad, comprensión y apoyo incondicional.

A mis amigos: Gabriela y José por estar siempre conmigo.

A la Dra. Graciela y al Dr. Daniel por su confianza y apoyo.

A la Dra. Mónica Ayub por su ayuda y amistad.

A mi asesora la Dra. Josefina Casas, a la Dra. Martha Rivera y a mis sinodales por sus valiosas aportaciones.

Y, a todos aquellos que conciente o inconscientemente cooperaron para la realización de este trabajo.

Gracias.

INDICE:	PAGINA
Introducción.....	1
Justificación.....	21
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	23
Diseño Experimental.....	24
Resultados.....	33
Discusión.....	42
Conclusión.....	44
Bibliografía.....	45

INTRODUCCIÓN.

Las primeras referencias en la utilización de animales para la experimentación, están contenidas en escritos filosóficos de la antigua Grecia. Durante los siglos III y IV a.C., Aristóteles (384-322 a.C.), es reconocido como el fundador de la Biología, al ser el primero en realizar una disección, revelando las diferencias internas entre animales. Posteriormente, Erasistratus (304-258 a.C.) probablemente fue el primero, en realizar experimentos con animales vivos, estableció que la tráquea era un tubo y los pulmones un órgano neumático, a través de la utilización de cerdos. Iniciando la era cristiana, Galeno (130-200 d.C.) realizó disecciones anatómicas en cerdos, monos y muchas otras especies (Cohen, B. 1984).

La humanidad, después de iniciada su aventura científica, entra en un período de oscurantismo, el cual se caracteriza por el control de los conocimientos por parte de la iglesia a lo largo de esta época.

No fue sino a partir del siglo XVI, que la experimentación animal retomó su rumbo despertando de nuevo el interés por la ciencia. Durante esta época Andreas Vesalius (1514-1564), considerado el fundador de la anatomía moderna, realizaba demostraciones públicas utilizando perros y cerdos, provocando con éstas el entendimiento de la conexión que existía entre la anatomía y la fisiología. Después, en el siglo XVII, Sir William Harvey publicó su gran trabajo sobre el movimiento del corazón y la sangre en animales. Y en el siglo XVIII, Stephen Hales un clérigo inglés, reportó las primeras mediciones de la presión sanguínea en un caballo (Cohen, B. 1984).

Pocas fueron las aportaciones científicas durante estos siglos, pero sin duda de gran valor, ya que fueron el incentivo para que muchos deseosos de conocimiento contribuyeran al enriquecimiento de la ciencia.

Durante el siglo XIX, la experimentación animal aportó grandes avances en las áreas biológicas y médicas; siendo Francia la principal sede. Científicos como Claude Bernard (1813-1878) en fisiología experimental y Louis Pasteur (1827-1895) en microbiología, contribuyeron enormemente en la validación del método científico que incluía el uso de animales de laboratorio. Siguiendo los pasos de Bernard y Pasteur, en el siglo XX cuando Alexis Carrel recibe el Premio Nobel en 1912 afirma: "...nosotros hemos...probado una y otra vez que el desarrollo de una ciencia aplicada como la cirugía resulta de realizar lecciones de experimentación con animales".

Desde tiempos pasados y continuando hasta la actualidad, la experimentación animal, ha sido y será una herramienta fundamental del método científico en investigación biológica y médica, así como en la educación (Cohen, B. 1984).

La naturaleza ha sido y será fuente inagotable de enigmas, hechos por los cuales el hombre con su gran sed de conocimiento pretenderá resolverlos. En el caso de la experimentación con animales, en un principio todo era simple curiosidad, ensayos de prueba y error, con objetivos inespecíficos, era ciencia puramente descriptiva, que poco a poco con las aportaciones de aquellos que han sido presa de su encanto, se ha logrado transformar en una ciencia que aún hoy se engrandece gracias a la curiosidad de quienes buscan el bienestar humano.

Desde los inicios del siglo XX el uso de los animales para la investigación científica fue tomando rumbo, hacia lo que hoy es toda una ciencia: "La Ciencia de los Animales de Laboratorio."

En su concepción moderna, el animal de laboratorio o *reactivo biológico* llamado así por ser un animal de experimentación, en función al tema de estudio, capaz de dar una respuesta fiable y reproducible, es el resultado de la manipulación genética y ambiental, así como de las múltiples interacciones entre estas dos. Por lo que los resultados en la experimentación están influidos profundamente por éstos factores. Se considera como premisa, el control de éstos para que el resultado sea efecto exclusivo de las variables experimentales y no de variables extrañas o no controladas.

Existe una gran variedad de organismos con los que cuenta el Reino animal, los cuales podrían ser empleados como animales de experimentación, se sabe que en su mayoría los más utilizados en el laboratorio son los roedores, por su fácil manejo, uso, producción y cuidado (Dávila, A. 2001).

En la naturaleza, los animales pueden sobrevivir a los cambios en las condiciones ambientales debido a la variación genética, la cual da como resultado una mayor adaptabilidad a diversas condiciones. Cuando los animales son mantenidos en cautiverio, su medio ambiente es alterado dramáticamente (domesticación). Las especies utilizadas como animales de experimentación no son diferentes de otros animales domesticados, en cuanto a su tolerancia, es solo que los animales de laboratorio han perdido adaptabilidad.

Cuando se producen animales para uso experimental, la preocupación es perpetuar individuos o poblaciones con variación genética mínima. Para algunos tipos de experimentos éstas variaciones son de pequeña o nula importancia, mientras que en otros tipos de experimentos pueden verse severamente afectados (Svendsen, P. 1994).

La investigación animal ha alcanzado un inimaginable nivel de sofisticación. La respuesta biológica es el resultado de un complejo juego que implica la intervención de factores genéticos y ambientales, así como la interacción de ellos. En investigación biomédica se emplea equipo cada vez más preciso, esto ha permitido que la respuesta biológica de los animales para un gran número de agentes exógenos esté bajo condiciones controladas.

La importancia de factores, tales como la presencia de microorganismos patógenos en animales utilizados en investigación, ha sido reconocida por años. Los agentes microbiológicos son a menudo el principal factor de interferencia en la investigación animal, ya que éstos pueden producir enfermedad, lesiones, estimulación inmunológica en el hospedero e incluso la muerte del animal, provocando la invalidación de los resultados (Pakes, S. 1984). Los pequeños roedores utilizados como animales de laboratorio son susceptibles a más de 50 agentes virales, bacterianos, parásitos y hongos, de los cuales se ha identificado que el de mayor importancia en las colonias de ratones es el virus de la hepatitis murina (MHV) y en colonias de ratas *Mycoplasma pulmonis* (Jacoby R. O. y Lindsey J. R. 1998, Won Y-S. *et al* 2006). Sin embargo, no se les había dado la importancia suficiente, y sólo recientemente, se ha comenzado a apreciar la influencia de estas variables en pruebas e investigaciones con animales. Por lo tanto, surge la necesidad de ofrecer un medio ambiente seguro para los animales de experimentación, así como de fácil acceso para la comunidad científica usuaria de éstos y económicamente rentable.

El medio ambiente en el cual se mantienen los animales debe ser el apropiado que permita el bienestar de las especies, su desarrollo vital y el uso que se pretende de ellos (Nacional Research Council, 2002). En México las especificaciones para el mantenimiento cuidado y uso de los Animales de Laboratorio se encuentran en la NOM-062-ZOO-1999, que en su capítulo 5

menciona las condiciones específicas de mantenimiento y necesidades de acuerdo a la especie utilizada.

En el bioterio el ambiente está conformado por factores interdependientes como: luz, ruido, temperatura, humedad relativa, condición y distribución del aire, estos tres últimos regulados por un complejo sistema de aire acondicionado. La evidencia demuestra como la respuesta del animal a diversos tratamientos puede variar debido al ambiente (Clough, G. 1999).

La calidad del aire puede variar considerablemente dependiendo de diversos factores. En la actualidad el ambiente que rodea a los animales de laboratorio, se divide en tres niveles: megambiente, está delimitado por las paredes perimetrales del Bioterio y determina el tráfico de personas, animales, insumos y desechos dentro de la instalación, además aísla el ambiente externo del interno y puede variar dependiendo de la localización geográfica, la proximidad con áreas industriales, etc. El macroambiente, está delimitado por las paredes del cuarto que aloja a los animales y se encuentra influenciado por los equipos que proporcionan aire dentro de la instalación. El microambiente o criptoambiente, delimitado por las paredes de la caja o jaula (alojamiento primario), es extremadamente importante por estar en íntimo contacto con el animal y los cambios que sufre modifican la respuesta de éste al procedimiento experimental. Está influenciado directamente por el macroambiente, así como por el material de cama, las paredes de la caja, el alimento y la presencia de filtros o barreras.

La contaminación de las instalaciones y los animales proviene del exterior, por lo tanto, la única posibilidad de evitarla es crear un sistema de protección o barrera. El concepto de alojamiento de animales detrás de "barreras", es actualmente utilizado para describir la serie de dispositivos, procedimientos y rutinas físicas involucrados en el cuidado y uso de animales, evitando la

contaminación química y microbiológica proveniente del medio externo, la cual pondría en peligro la calidad microbiológica de los animales.

La introducción de cuartos de producción de animales de laboratorio con barreras, ha hecho posible la larga lista disponible de roedores para investigación biomédica, los cuales se encuentran libres de muchos de los parásitos y microorganismos comúnmente existentes en los animales de forma silvestre. Con el desarrollo de tal sofisticación, en el equipo y las técnicas de producción animal, se tiene la necesidad de asegurar la calidad en la producción de los animales con respecto a su estado de salud.

Existen referencias convincentes (Baker *et al.* 1979, Lindsey *et al.* y Newton 1978) de como el estado microbiológico de los animales de laboratorio tiene profundos efectos sobre la respuesta biológica del animal, con respecto al resultado del experimento; por eso se pretende que los animales utilizados en investigación, se encuentren en óptimas condiciones de salud (Pakes, S. 1984).

Durante 50 años de investigación con animales utilizados en experimentación, han surgido diversas propuestas para la implementación de una terminología en relación a la buena calidad microbiológica del animal y con las condiciones de alojamiento bajo las cuales se mantienen (Tabla 1). Sin embargo, a pesar de diversos intentos ninguno de los sistemas ha sido universalmente aceptado.

No obstante, la utilización de un sistema de clasificación dentro de las instalaciones es importante por la necesidad de conocer el estado microbiológico de los organismos.

Tabla 1. Terminología— Calidad microbiológica del animal de laboratorio relacionada con las condiciones de alojamiento.

Condiciones de alojamiento	de Reyniers et al, 1949.	Raubaud et al, 1966.	Otros autores
Técnica aislante.	Gnotobiótico.	Axénico	Libre de gérmenes.
	Monobiótico Dibiótico	Gnotoaxénico Monognotoaxénico. Dignotoaxénico	Exlibre de gérmenes Monoinfectado Di-infectado
	Polibiótico	Polignotoaxénico.	Poli-infectado
Cuartos de animales con sistema de barreras	Polibiótico	Agnotoaxénico Heteroaxénico	Libres de patógenos específicos (SPF)
Animales en cuartos abiertos	Polibiótico	Agnotoaxénico Holoaxénico	Convencional

Modificado de "Germ free animals in biomedical research" (Gustafsson, B. 1984).

Diversos sistemas se han usado para clasificar el estado de salud o calidad microbiológica del animal, particularmente de los roedores. En América la terminología utilizada es: Animales Libres de Gérmenes (LG), Libres de Patógenos Específicos (SPF "Specific Pathogen Free") y Convencionales, derivándose de estas, otras intermedias (Fig. 1).

Los animales denominados LG son aquellos libres de bacterias, hongos, protozoarios y virus, incluso de la flora microbiológica propia de la especie; las limitaciones del término dependen obviamente de la prueba de validación utilizada por ejemplo: los animales mono-infectados son animales LG los cuales han sido infectados con un microorganismo conocido, esto permite entender la biología del microorganismo y el efecto exclusivo del agente causado en el individuo. Los di-infectados y poli-infectados provenientes de animales LG, son infectados con más de un microorganismo no patógeno

(comensales y/o saprofitos), permitiendo determinar su relación y acción en éste, así como efectos sinérgicos o detrimentales entre los microorganismos. Los animales "Libres de Patógenos Específicos" (SPF) cuentan con una microflora definida, tienen la cualidad de no portar microorganismos patógenos, esto se establece en un certificado de salud, el cual especifica los microorganismos que no se encuentran presentes en dichos animales. En los animales "Convencionales", se desconoce su microflora y entre ésta, se pueden encontrar microorganismos patógenos. (Gustafsson, B. 1984).

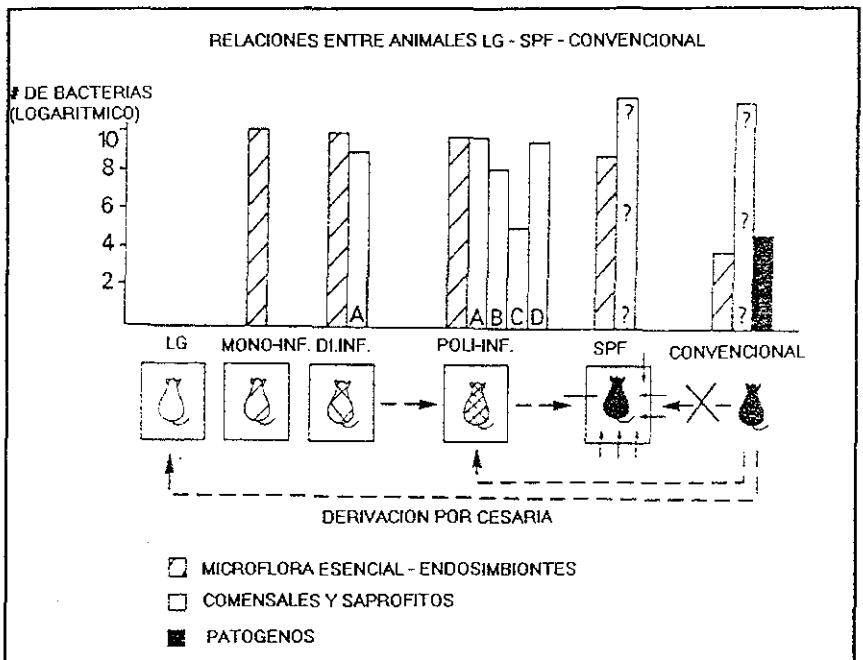


Fig. 1. Diagrama de las condiciones de la flora intestinal normalmente relacionada con el uso de los animales para la investigación. Modificado de "The Germ-free Animal in Biomedical Research" (Gustafsson, B. 1984).

El estado de salud del animal de laboratorio provoca variación en los resultados experimentales, al grado de no hacerlos válidos. La única manera de evitar los efectos negativos de las infecciones naturales, es mediante la erradicación selectiva de los agentes infecciosos, para lograr un animal de calidad microbiológica definida. Tal animal debe ser protegido sistemáticamente del riesgo de infección. Por ese motivo, las instalaciones modernas son diseñadas con complejas barreras físicas, que se manejan siguiendo estrictos principios sanitarios, y cuyo principal objetivo es la prevención de cualquier fuente de contaminación (Tabla 2).

Tabla 2. Factores que alteran la buena calidad del animal de laboratorio y por lo tanto los resultados experimentales, así como formas de control.

Factores	Control de los factores.
<u>BIOLÓGICOS.</u> Genotipo. Endoflora, parásitos. Gérmenes ambientales. Aire. Alimento y cama. Agua. Plantilla, personal. Insectos Parásitos (endo y ecto). Otros animales y roedores salvajes.	Endogamia, exogamia, perfil genético, cruzamientos rotatorios y reproducción asistida. Animales gnotobióticos, SPF, convencionales, técnicas gnotobióticas, transferencia de embriones, descontaminación biológica. Barrera higiénica efectiva, apropiado diseño de las instalaciones y procedimientos de descontaminación y esterilización. Filtros de aire (filtros que retienen polvo, HEPA), programa de mantenimiento. Pasteurización, esterilización, irradiación, PNT definidos. Pasteurización, esterilización, acidificación, filtración. <i>Air lock</i> de paso, cambio de ropa, higiene, zoonosis, alergias. Barreras y diseño apropiado de las instalaciones. Diseño apropiado de construcción (profesionales). Cuarentena, barreras y medidas higiénicas de contención efectiva.
<u>FÍSICOS</u> Alojamiento secundario: habitación. Temperatura, humedad, aireación, presión del aire, de gases. Luz (periodo, intensidad y color). Sonido (ruido, intensidad, frecuencia). Alojamiento primario: Jaulas.	Planificación, diseño y construcción de las instalaciones. Sistema de Aire acondicionado, diseño apropiado basado en la producción de calor de los animales, ajuste automático de los valores preseleccionados. Encendido periódico automático, reducción gradual, ultravioleta. Aislamiento, prevención del sonido originado durante el trabajo, insonorización del equipo y las instalaciones. Superficies suaves, conductividad de la temperatura, bienestar.
<u>QUÍMICOS</u> Alimento. Cama.	Formulación de la dieta, elaboración (ingredientes), libre de contaminantes (químicos y microbiológicos), control de calidad. Libre de polvo, hecha de material no tratado químicamente, poder de absorción adecuado, intervalo de cambio.
<u>EXPERIMENTO ANIMAL.</u> Elección del modelo, tamaño de la muestra, diseño estadístico. Administración de sustancias, tratamientos, operaciones quirúrgicas.	Consultas bibliográficas, diseño y planificación previa. Métodos definidos o estandarizados, PNT definidos.

PNT: Procedimientos normalizados de trabajo. SPF: del inglés *Specific Pathogen Free* (libres de patógenos específicos); HEPA: del inglés *high efficiency particulate air* (filtro de partículas de alta eficiencia). Modificado de "Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal" (Dávila, A. 2001).

Una vez establecidas las barreras de protección que regirán en el Bioterio, solo queda la supervisión periódica de éstas. Muchas de las instalaciones empleadas para alojar y reproducir animales de laboratorio, en la Republica Mexicana, no brindan las condiciones necesarias de calidad ambiental requeridas para mantenerlos en óptimas condiciones de salud establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Por lo tanto, es necesario que se comience a trabajar en la obtención de altos niveles de calidad dentro de ésta área, dependiendo del tipo de investigación que se realiza y la calidad microbiológica con que requieran los organismos. Una vez alcanzadas las condiciones necesarias de alojamiento en las instalaciones, el siguiente paso es procurar que éstas se mantengan sin variación.

El Monitoreo en colonias de ratas y ratones incluye el conocimiento de la patogénesis, epizootología y prevalencia de los agentes infecciosos, de pruebas de diagnostico disponibles y de las condiciones específicas de alojamiento individual y de grupo (Livingsgton R. 2003),

Los métodos frecuentemente utilizados en un bioterio para eliminar o reducir las poblaciones de microorganismos potencialmente patógenos son: la esterilización física por calor húmedo (autoclave), esterilización química, desinfección química y la antisepsia.

Esterilización es el procedimiento físico o químico que permite la eliminación total de las poblaciones microbiana incluyendo las esporas existentes sobre la materia inerte

El calor húmedo usado en forma de vapor, bajo presión, a altas temperaturas y por un periodo determinado de tiempo en una autoclave (tabla 3) es

utilizado en la esterilización de equipo, instrumental y líquidos termoestables (Russell, A. 1999).

Tabla 3. Variaciones de la esterilización con calor húmedo.

Método	Tratamiento	Referencia	Aplicaciones
Calor húmedo	121°C x 15 min. 126°C x 10 min. 134°C x 3 min.	Medical Research Council (1959-60-64)	Artículos alimenticios, material de cama, jaulas de metal, cajas, botellas de agua y tapas e instrumental quirúrgico

Modificado de "The UFAW Handbook on the Care & Management of Laboratory Animals" (Smith, M. 1999).

En el bioterio son utilizados los siguientes procedimientos de desinfección y esterilizado, la autoclave: (calor húmedo, 121°C a 15 lb. de presión x 15min.) esteriliza los insumos a utilizar por los animales: cajas, cama, tapas, tarjeteros, micro aisladores, alimento, agua, bebederos, así como la vestimenta utilizada por el personal que ingresa al bioterio (uniformes, botas, guantes, gorro y cubre bocas).

Para el monitoreo y/o validación de los procesos de esterilización por calor húmedo se utilizan cinco principales métodos:

- 1.-Prueba de esterilidad: en esta el producto o material esterilizado es analizado para descartar la presencia de microorganismos.
- 2.-Prueba reto: se utiliza un organismo de conocida resistencia a temperaturas altas, el cual, es adicionado al producto antes de la esterilización y las muestras se analizan después de completar el proceso de esterilizado y se determinara el índice de mortalidad.
- 3.-Prueba de indicadores biológicos: implica determinar la viabilidad de los microorganismos después del proceso de esterilizado. Para el caso del la esterilización por calor húmedo se utilizan esporas de *Bacillus stearothermophilus*.

4.-Prueba física: en las cuales se utilizan termopares colocados en diferentes posiciones sobre la carga a esterilizar para monitorear la temperatura.

5.-Indicadores químicos: son sustancias que reaccionan a las altas temperaturas que se manejan en la esterilización (Hugo, W. 1999).

La esterilización química se realiza en los cuartos de alojamiento, los cuales son desocupados, aspirados, lavados, secados y sometidos a un proceso de aspersión con el esterilizante químico, CLIDOX[®]-S en concentración de 1:5:1 de base, agua y activador respectivamente, antes de ser utilizados se retiran los residuos de este.

La desinfección, se refiere a la serie de procedimientos físicos y químicos empleados para disminuir las poblaciones de microorganismos que tienen capacidad patógena, en superficies inanimadas (Bazaga, S. 2001).

La desinfección química del material utilizado en el bioterio, se realiza empleando diversos productos eliminadores de gérmenes. En la actualidad, podemos encontrar gran variedad de agentes desinfectantes disponibles, que funcionan para diversos propósitos, en las áreas de medicina, biomedicina, veterinaria, y otras. Entre los que se encuentran: los fenoles, los ácidos orgánicos e inorgánicos, aldehídos, alcoholes, entre otros, los cuales actúan, de forma específica contra algunos patógenos (Hugo,W. 1999).

La antisepsia, es lo mismo que la desinfección, solo que ésta se realiza sobre tejidos u organismos vivos.

En el bioterio, el material a esterilizar como bebederos, cajas, tapas, micro aisladores, es previamente lavado con detergente alcalino Extran MA01[®] a base de NaOH, el cual elimina residuos biológicos, se recomienda su uso en solución al 2% y solución al 20%. Para materiales mas sucios, así como

también en paredes y pisos del área de lavado se utiliza una solución de agua con detergente enzimático Cidezime® en una concentración de 8-16 ml / litro de agua.

La limpieza de los pisos y paredes dentro del bioterio se realiza con una solución de agua y pastillas de cloro Presept® a razón de 2 pastillas /5 litros de agua, obteniéndose una concentración de 560 ppm de cloro disponible.

En el vestidor el personal que ingrese al bioterio deberá seguir un estricto programa de registro y antisepsia (Tablas 4 y 5), que incluye la utilización de un antiséptico Savon Doux® para el cuerpo o manos según sea el caso.

Dentro del bioterio los animales son manejados con pinzas, las cuales son sumergidas en Cloruro de Benzalconio Dermo Cleen® para lograr su desinfección, así como cualquier otro material quirúrgico utilizado en los animales.

CLIDOX®-S Pharmaceutical Research Laboratories, esterilizante y desinfectante a base de dióxido de cloro.

Extran MA01 ®Egasa S A de C.V., detergente concentrado alcalino (NaOH, pentasodio tripolifosfato)

Cidezime ® Johnson & Johnson Company, detergente enzimático.

Presept ® Johnson & Johnson Company, tabletas efervescentes desinfectantes 2,5 gr. con 50% de Dichloroisocyanurate de sodio (NaDCC) precursor del ácido hipocloroso.

Savon Doux, Laboratories ANIOS.

Dermo Cleen ® solución concentrada de Cloruro de Benzalconio, fórmula: cada 100ml.Cloruro de Benzalconio 1g. Nitrito de sodio (antioxidante) 0.5g vehiculo c.b.p. 100ml

Tabla 4. Procedimiento de ingreso, Nivel de Seguridad I.

<p style="text-align: center;">Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Investigaciones Biomédicas Bioterio Manual de Procedimientos</p>
<p style="text-align: center;">Ingreso de Personas</p> <p style="text-align: center;">Nivel de Seguridad I</p>
<ol style="list-style-type: none">1. Registre su entrada en la oficina.2. Verifique que la puerta de la regadera correspondiente a su sexo, esté abierta.3. Cerciórese de que la luz del piloto localizado en la parte superior de la puerta esté apagado.4. Si el piloto se encuentra encendido, no podrá acceder, espere.5. Una vez en el interior del área de ingreso de personas, accione el interruptor localizado en el muro, el cual apagará el piloto, éste cerrará las puertas de acceso.6. Coloque sus prendas en el locker elegido y tome la llave.7. Abra la puerta de la regadera.8. Lave sus manos con el jabón líquido⁵ desinfectante y el cepillo, enjuague y repita la operación una vez más.9. Pase al vestidor.10. Tome el paquete de papel que contiene la ropa correspondiente a su talla.11. Deposite el bulto en la banca y abra el paquete, verificando que la tira indicadora de esterilidad este activada, de no ser así, tome otro paquete.12. Vístase en el orden que aparece su ropa.13. Accione el interruptor, el piloto se prenderá y podrá salir.14. Tome asiento en la banca "cambio de botas", obtenga un paquete de acuerdo a su talla.15. Coloque la primera bota, sin tocar el piso pase su pie al área seca. Posteriormente coloque la bota en el siguiente pie y pase al área seca.16. Obtenga los guantes de acuerdo a su tamaño y ajústelos por arriba de los puños de su pijama.17. Dirijase al cuarto de trabajo.

Tabla 5. Procedimiento de ingreso, Nivel de Seguridad II.

<p>Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Bioterio, Manual de Procedimientos.</p>
<p>Ingreso de Personas</p> <p>Nivel de Seguridad II</p>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Registre su entrada en la oficina (ver formato anexo) 2. Verifique que la puerta de la regadera correspondiente a su sexo, esté abierta. 3. Cerciórese de que el piloto localizado en la parte superior de la puerta esté apagado. 4. Si el piloto se encuentra encendido, no podrá acceder, espere. 5. Una vez en el interior del área de ingreso de personas, accione el interruptor localizado en el muro, el cual apagará el piloto, éste cerrará las puertas de acceso. 6. Proceda a desvestirse por completo. 7. Abra el casillero asignado y saque sus sandalias. 8. Coloque su ropa dentro del casillero. 9. Calce sus sandalias. 10. Pase a la regadera. 11. Abra las llaves y espere a que el agua alcance la temperatura deseada. 12. Remoje su cuerpo por completo. 13. Cierre la llave del agua. 14. Tome el jabón desinfectante líquido⁵, aplíquelo con la gasa estéril en todo el cuerpo, en el siguiente orden: <ul style="list-style-type: none"> Cabello Cara Cuello Extremidades superiores, del hombro a la mano Tronco Extremidades inferiores, de la ingle al pie. 15. Deje actuar el jabón por un minuto. 16. Proceda a retirar el jabón con agua durante 3 minutos. Iniciando desde la cabeza hasta las extremidades inferiores. 17. Abra la puerta de la regadera y pase al vestidor. 18. Recoja el bulto de ropa correspondiente a su talla. 19. Deposite el bulto en la banca y abra el paquete, verificando que la tira indicadora de esterilidad este activada, de no ser así, tome otro paquete. 20. Utilice la toalla para secarse y una vez terminado este proceso cuélguela arriba de la banca. 21. Vístase en el orden que aparece su ropa. 22. Accione el interruptor, el piloto estará apagado y podrá salir. 23. Tome asiento en la banca "cambio de botas", obtenga un paquete de acuerdo a su talla. 24. Coloque la primera bota, sin tocar el piso pase su pie al área seca. Posteriormente coloque la bota en el siguiente pie y pase al área seca. 25. Obtenga los guantes de acuerdo a su tamaño y ajústelos por arriba de los puños de su pijama. 26. Dirijase al cuarto de trabajo.

La calidad del aire disponible para los animales de laboratorio es de suma importancia particularmente por dos aspectos: primero por su estado físico en términos de temperatura, humedad y la velocidad, a la cual se mueve y en segundo porque éste puede actuar como vector de diversos materiales como polvo y partículas contaminadas química y microbiológicamente (Clough, G. 1999).

El sistema de aire acondicionado permite el control de factores como la temperatura, la humedad y la inyección de aire estéril, propicia gradientes de presión dentro de la instalación dirigiendo el aire de los sitios con menor contaminación a aquellos de mayor.

La esterilización final del aire, se realiza mediante filtros de alta eficiencia (HEPA), especializados en eliminar gran cantidad de partículas (Tabla 6) del medio externo e inyectarlas al interior del bioerario. Estos filtros también son utilizados dentro del aire acondicionado de hospitales y otras instalaciones similares (Schonholtz, G. 1976).

Tabla 6. Método utilizado en la filtración del aire

Método	Tratamiento	Referencia	Aplicaciones
Filtración	Filtros HEPA del inglés <i>high efficiency particulate air</i> (filtro de partículas de alta eficiencia) con eficiencia de filtración en partículas $0.5\mu\text{m}$ de 99.997%	Dyment (1976)	Sistemas de ventilación.

Modificado de "The UFAW Handbook on the Care & Management of Laboratory Animals" (Smith, M. 1999).

Las cajas utilizadas en el bioerario son de materiales termoestables (policarbonato, polisulfonato, polipropileno) resistentes a las condiciones de esterilización, el procedimiento para la reutilización de éstas, comprende: la eliminación de residuos sólidos, inmersión en agua con detergente alcalino²,

lavado de las paredes, eliminación de los residuos del detergente mediante el enjuague, secado, llenado (material de cama), ensamble, empaclado en bolsas especiales para autoclave y esterilización.

La cama o lecho del animal empleada en el bioterio SANI-CHIPS[®], Harlan Teklad, Cama para Animales de Laboratorio, Laboratory Grade, es elaborada de hojuelas de maderas duras (haya, abedul y maple), se caracterizan por su pureza, cualidades físicas y ausencia de contaminantes intrínsecos y extrínsecos, tanto químicos como microbiológicos. Permite la esterilización, sin la modificación de sus propiedades, manteniendo sin variación el microambiente.

El agua tiene que estar siempre a disposición del animal. Ésta, al igual que el ambiente, está sujeta a contaminación química y microbiológica, por lo tanto, sólo deberá utilizarse agua previamente tratada mediante acidificación, cloración, filtración o algún otro método de descontaminación, así como, conservar ésta condición, aún cuando durante su consumo pueda ser contaminada por el animal. Los recipientes deberán ser descontaminados en condiciones similares al contenido de éstos.

El origen del agua de bebida del bioterio es: el agua potable sometida a un proceso de filtración, acidificación, envasado y esterilización, así estará lista para el consumo por los animales de laboratorio.

Los bebederos usados en el bioterio son decontaminados y esterilizados para su reutilización, se acomodan en charolas y son llenados con agua para su esterilización. Las tapas (taparrosas con pipeta de acero inoxidable) se lavan, enjuagan y esterilizan junto con los bebederos.

Las dietas comerciales están formuladas para satisfacer las necesidades nutrimentales del animal, asegurando encontrarse libres de contaminación química o microbiológica, aunque éstas pueden contaminarse durante el transporte o almacenamiento, por lo tanto es recomendable que puedan esterilizarse, sin menoscabo de su concentración nutritiva, para así evitar riesgo potencial de contaminación y desnutrición, en los animales.

La limpieza del material se lleva acabo por diferentes procedimientos, en el caso de los bebederos se realizo de la siguiente manera: se les tira el agua anterior, se sumergen el una solución de agua y detergente alcalino (Extran), las paredes internas del recipiente se tallan con un escobillón, se enjuagan para eliminar los residuos de detergente y materia orgánica, se acomodan en charolas para ser llenados con agua acidificada para su esterilización.

Las tapas (taparrosas con pipeta de acero inoxidable) se sumergen en solución de agua y pastillas de cloro dejándose remojar por 15 min., después de este tiempo se talla el interior de la pipeta y las superficies con un cepillo, se enjuagan y se esterilizan junto con los bebederos.

La ropa y botas utilizadas son lavadas con detergente comercial y cloro, secadas y empaquetada para su esterilización.

Las cajas después de su desinfección son llenadas con material de cama para ser empaquetadas y esterilizadas.

Las tapas (rejillas de acero inoxidable) son lavadas y empaquetadas en papel aluminio para su esterilización y almacenamiento.

Los microaisladores son lavados y empaquetados en bolsas para autoclave para su esterilización.

El alimento es vaciado en bolsas especiales para su esterilización y uso dentro del bioterio.

Todo lo que entra en contacto directo con el animal, deberá pasar por alguno de los anteriores métodos de esterilización y/o desinfección.

BIBLIOTECA CUCBA

En las unidades de alojamiento para animales de laboratorio, el contar con buenas prácticas de higiene, ayuda a prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas y a mantener la salud en general, tanto del personal como de los animales. Además de estos aspectos de higiene que incluyen la prevención de enfermedades, está una importante contribución al bienestar animal y al logro de resultados experimentales confiables (Russell, A. 1999).

La efectividad de los procedimientos utilizados en el bioterio los cuales impiden el ingreso de contaminantes químicos y microbiológicos que conforman la barrera de protección, es medida en proporción al funcionamiento individual de éstos, dado que el empleo de cada uno de ellos es realizado de forma independiente.

Es importante aclarar, que aún cuando las probabilidades de contaminación se reduzcan, por contar con los requerimientos mínimos indispensables y se utilicen dispositivos de desinfección, asepsia y esterilización, existirá la posibilidad de que estos no sean llevados a cabo o utilizados de forma correcta por quien o quienes los usan, o que en su defecto existan fallas en los equipos que permitan la introducción de agentes químicos o microbiológicos que favorezcan la contaminación.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es comprobar que los mecanismos de desinfección y esterilización utilizados en estas instalaciones evitan el ingreso de contaminación microbiológica al área de producción y alojamiento de animales, y que el uso de los mismos es el correcto.

La transmisión de enfermedades puede ser prevenida por altos grados de limpieza general combinados con un sistema de barreras físicas y biológicas.

Las barreras físicas pueden facilitar el aislamiento de animales dentro de unidades, las cuales no son directamente accesibles a personas u otros animales ajenos a dichas unidades. La posibilidad de contaminación con microorganismos a partir del acceso de aire, alimento, agua, y personal, etc., está limitado. Las barreras biológicas, admiten la presencia de un nivel de flora microbiológica, pero permiten al animal estimular su cuerpo con mecanismos de defensa para obtener un balance entre el organismo y el huésped, mientras que al mismo tiempo previenen y limitan el acceso de otros microorganismos. La interacción y relativa efectividad de estos dos sistemas de control pueden ser descritas por la buena calidad microbiológica del grupo animal (Hansen, K. 2000).

Para mantener y reproducir animales en condiciones libres de los gérmenes patógenos conocidos, no sólo es necesario contar con las instalaciones, el equipamiento, el personal capacitado y los procedimientos operativos, sino un elemento indispensable, es la verificación del estado microbiológico de cada uno de ellos, para así determinar su eficiencia.

El riesgo de contaminación está presente, debido a la actividad realizada dentro y fuera del bioterio, el ingreso y movimiento de personas, animales, insumos, etc., actividades que repercuten de forma considerable en el bienestar animal.

JUSTIFICACIÓN:

En la actualidad los animales de laboratorio son útiles en diversas áreas de investigación científica donde se utilizan como modelos experimentales, para ello se requiere animales en óptimas condiciones que cuenten con una microflora definida de acuerdo al certificado de salud, que especifica los microorganismos que no se encuentran presentes en dichos animales.

Por lo tanto, para proporcionar a la investigación animales confiables que aseguren el éxito experimental es necesario implementar técnicas de limpieza y esterilización que permitan conservar su buena calidad microbiológica. El presente estudio contribuirá al establecimiento de las condiciones óptimas de alojamiento en las instalaciones donde se mantienen y reproducen los animales lo que se reflejará directamente en su salud, así como en la validación y confiabilidad de los resultados experimentales.

HIPÓTESIS:

La contaminación en las instalaciones donde se mantienen y reproducen roedores para investigación repercute en la calidad experimental, por lo que la desinfección y esterilización del ambiente del bioterio permiten mantener la buena calidad microbiológica de los animales y por lo tanto la confiabilidad en los resultados.

OBJETIVO GENERAL:

Verificar el estado actual de los mecanismos (barreras) que impiden el ingreso de microorganismos a las instalaciones del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la efectividad de los mecanismos de descontaminación y esterilización utilizados en estas instalaciones.
- Promover el buen uso de los recursos de descontaminación y esterilización.
- Identificar los sitios vulnerables, por donde puedan ingresar algunos microorganismos potencialmente patógenos.

DISEÑO EXPERIMENTAL:

El presente trabajo, se realizó en las instalaciones del bioterio de la planta baja edificio B2 del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM.

Distribución del bioterio.

El bioterio (Figura 2) es considerado una barrera absoluta con un corredor de distribución (M), consta de cinco salas de alojamiento de ratones (G, H, I, J, K), una sala de producción de ratón y hámster (L) y una de producción de rata (E).

El acceso de personas a los cuartos de alojamiento y producción (Interior del Bioterio) se realiza a través de los vestidores (B, C).

El material estéril ingresa por la autoclave (esterilización) y el resto pasa por el transfer, previa descontaminación en el cuarto de lavado (D).

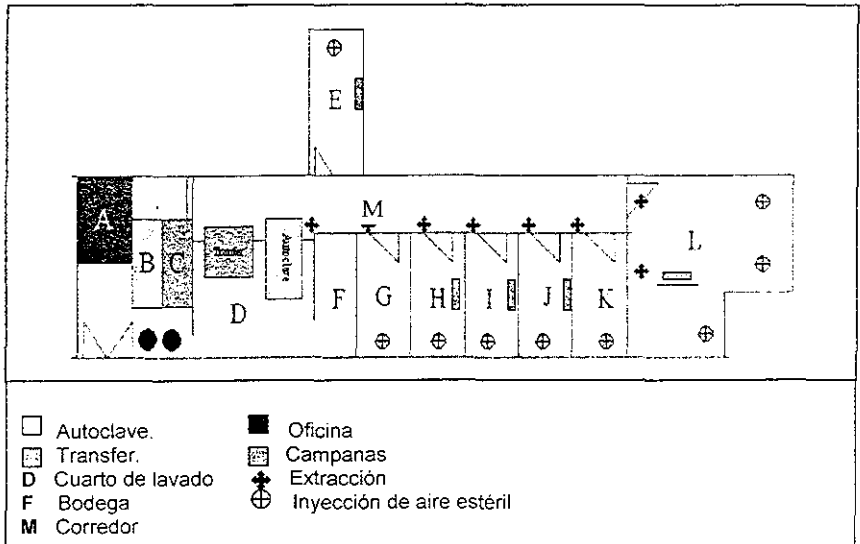


Fig. 2. Distribución del Bioterio planta baja Edif. 2B del IIB/ UNAM

Dentro del bioterio todos los cuartos cuentan con inyección de aire estéril (E, G, H, I, J, K), y la extracción se efectúa en el pasillo, la sala L mantiene los dispositivos de inyección y extracción, dentro del mismo.

Los animales alojados en éstas instalaciones son considerados libres de gérmenes patógenos específicos (figura 1), son mantenidos bajo condiciones controladas de alojamiento y manejo mediante la aplicación de métodos de higiene y esterilización de todo material que pueda estar en contacto con ellos, por lo tanto considerando la posibilidad del ingreso de contaminantes por esta vía, éstos materiales serán motivo de monitoreo.

Se determinó que las fuentes potenciales de contaminación son:

- Alimento.
- Agua de bebida.
- Bebederos.
- Material de cama.
- Cajas.
- Tapas.
- Microaisladores.
- Ropa (uniforme, gorro, cubre bocas).
- Botas.
- Guantes.
- Aire acondicionado.
- Campanas de flujo laminar.
- Personal.

Por ser éstas las que se encuentran sometidas a alguno de los procesos de esterilización, asepsia o desinfección utilizados en el bioterio y están en contacto directo con el animal.

MUESTRA:

Las muestras, fueron tomadas del material y personal que ingresó a las instalaciones de mantenimiento y producción, habiendo pasado por alguno de los sistemas de descontaminación. Las muestras fueron inoculadas en medio agar nutritivo para el crecimiento de bacterias aerobias.

Tabla. 7. Límites de Confianza para la Detección de infección Usando Diferentes Tamaños de Muestra y Coeficientes de Infección.

Sample Size (N) ^b	Estimado Asumido de Infección (%)											
	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	40	50
5	0.05	0.10	0.14	0.18	0.23	0.41	0.56	0.67	0.76	0.83	0.92	0.97
10	0.10	0.18	0.26	0.34	0.40	0.65	0.80	0.89	0.94	0.97	0.99	
15	0.14	0.26	0.37	0.46	0.54	0.79	0.91	0.95	0.99			
20	0.18	0.33	0.46	0.56	0.64	0.88	0.95	0.99				
25	0.22	0.40	0.53	0.64	0.72	0.93	0.98					
30	0.25	0.45	0.60	0.71	0.79	0.96	0.99					
35	0.30	0.51	0.66	0.76	0.83	0.97						
40	0.33	0.55	0.70	0.80	0.87	0.99						
45	0.36	0.69	0.75	0.84	0.90	0.99						
50	0.39	0.64	0.78	0.87	0.92	0.99						
60	0.45	0.70	0.84	0.91	0.95							
70	0.51	0.76	0.88	0.94	0.97							
80	0.55	0.80	0.91	0.96	0.98							
90	0.60	0.84	0.94	0.97	0.99							
100	0.63	0.87	0.95	0.98	0.99							
120	0.70	0.91	0.97	0.99								
140	0.76	0.94	0.99									
160	0.80	0.96	0.99									
180	0.84	0.97										
200	0.87	0.98										

^aFrom ILAR (1976a), Hsu *et al.* (1980), and Small.
^bN = $\frac{\log(1 - \text{probability of detecting infection})}{\log(1 - \text{assumed infection rate})}$

(Modificado de: Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats. 1991 y Wolfensohn, S. 2003).

El tamaño de la muestra utilizada en el experimento se determinó mediante el análisis de la probabilidad de riesgo de infección por agentes externos.

Tomando en cuenta datos que muestran la prevalencia de algunos agentes infecciosos en los Estados Unidos (Jacoby, R, 1999), utilizando para esto los coeficientes de prevalencia y los límites de confianza mostrados en la siguiente tabla (Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats. 1991 y Wolfensohn, S. 2003): para lo cual asumimos un estimado de infección del 25%.

Toma de muestra:

- A los materiales esterilizados que ingresan al bioterio por medio de la autoclave se hará inmediatamente después de terminado el ciclo de esterilización: bebederos (n=28), agua (n=19), bolsas de alimento (n=20), cajas (n=15), material de cama (n=18), micro aisladores (n=18), tapas (n=16), uniforme (n=16), guantes (n=16) y botas (n=20).
- Al personal (n=15) que ingreso al Bioterio utilizando los vestidores y el equipo allí proporcionado para su entrada, debiendo seguir los procedimientos de descontaminación recomendados por el manual de procedimientos para el ingreso de personas nivel de seguridad I y II del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.
- A el aire (20) filtrado que sale de los conductos hacia cada uno de los cuartos dentro del Bioterio, y al de las campanas de flujo laminar (n=16).

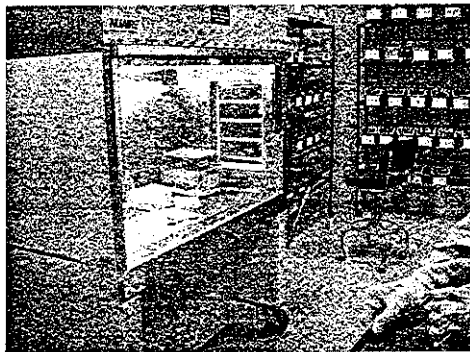


Figura 3. Cambio de caja de los animales dentro de la campana.

Preparación del medio de cultivo.

1. Preparar la cantidad de medio necesario para la toma de muestras de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial, para posteriormente hacer el vaciado en condiciones de esterilidad.
2. Las cajas se sellaran con película auto adherente.



Figura 4. Material para la toma de muestra.

Toma de muestra en agua de bebida y bebederos.

Material: Hisopos estériles.

1. Introducir un hisopo al bebedero (tapón y pipeta) y/o al interior del frasco con agua, según sea el material del cual se obtendrá la muestra.
2. Inocular la caja.
3. Incubar a 37°C por 24 horas.

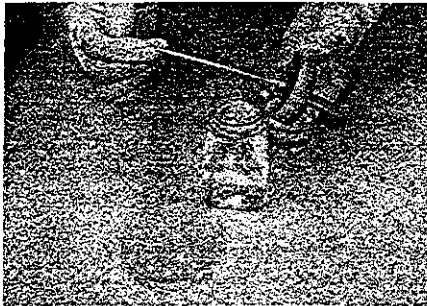


Figura 5. Toma de muestra a bebederos

Toma de muestra en alimento.

Material: Hisopos estériles.

Pinzas estériles.

Agua destilada estéril.

1. Al terminar el ciclo de esterilización, abrir la bolsa del alimento y con las pinzas tomar al azar pellets del centro del bulto.
2. Tomar una muestra de la superficie del pellet con el hisopo e inocular una caja.
3. Incubar a 37°C por 24 horas.

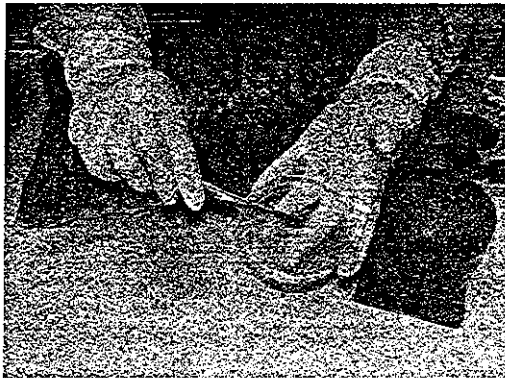


Figura 6. Toma de muestra del alimento.

Toma de muestra en ropa, botas y guantes.

Material: Hisopos estériles.

Agua destilada estéril.

1. Dentro de la autoclave tomar la muestra destapando el paquete y pasando el hisopo mojado de agua destilada por la superficie del material.
2. Inocular las cajas con medio.
3. Incubar a 37°C por 24 horas.

Toma de muestra en cajas, tapas y micro aisladores.

Material: Hisopos estériles.

Agua destilada estéril.

1. Sin sacar el material de la autoclave, pasar el hisopo mojado de agua destilada estéril por todas las superficies internas de la caja, del micro aislador o de las tapas, según la muestra que se desee obtener.
2. Inocular las cajas con medio.
3. Incubar a 37°C por 24 horas.

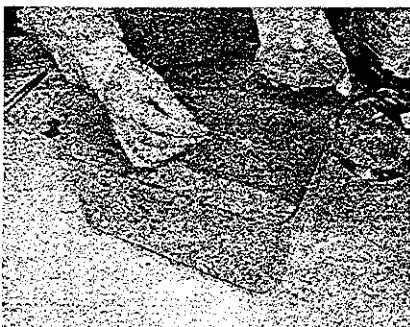


Figura 7. Toma de muestra a cajas.

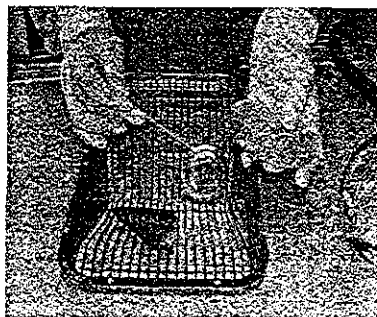


Figura 8. Toma de muestra a tapas (rejillas).

Método para la toma de muestra en aire (campanas y salidas de aire acondicionado).

Material: Medio de cultivo.

1. Exponer las cajas con medio preparado a las salidas de aire y a las campanas previamente en uso por al menos 10 min. Posteriormente exponerlas por aproximadamente 10 min.
2. Incubar a 37°C por 24 horas.

Toma de muestra en material de cama.

Material: Hisopos estériles.

Vaso de precipitado de 250 ml estéril.

Pinzas estériles.

Agua destilada estéril.

1. Al terminar el ciclo de esterilización y aun dentro de la autoclave y caliente, abrir el paquete de cajas y tomar una porción del material de cama de una caja e introducirlo al vaso de precipitado que contendrá de agua destilada estéril.
2. Homogenizar.
3. Tomar una muestra con el hisopo e inocular una caja.
4. Incubar a 37°C por 24 horas.

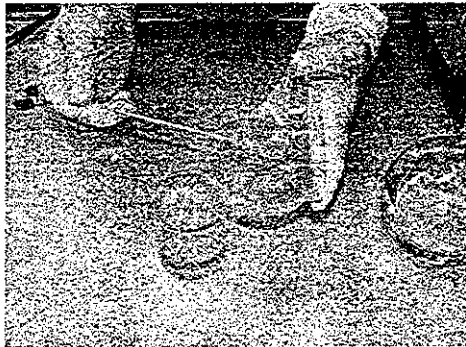


Figura 9. Toma de muestra a material de cama.

Toma de muestra al personal que ingresa al bioterio.

Material: Hisopos estériles.

Agua destilada estéril.

Las muestras serán tomadas de las palmas de las manos antes de colocarse los guantes, se inocularán en cajas de petri con medio de cultivo.

Fueron utilizados como controles positivo y negativo: agua destilada estéril (-) y ampollas de *Bacillus termophilus* (+), muestreadas en las mismas condiciones al resto de los materiales.

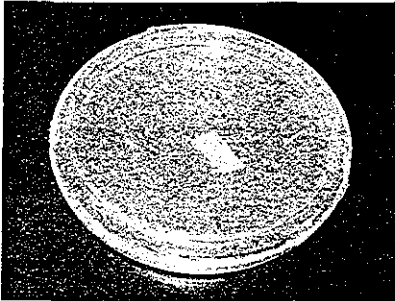


Figura 10. Control negativo.

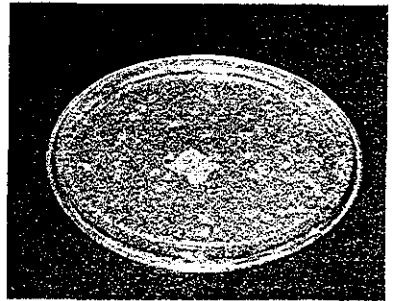


Figura 11. Control positivo

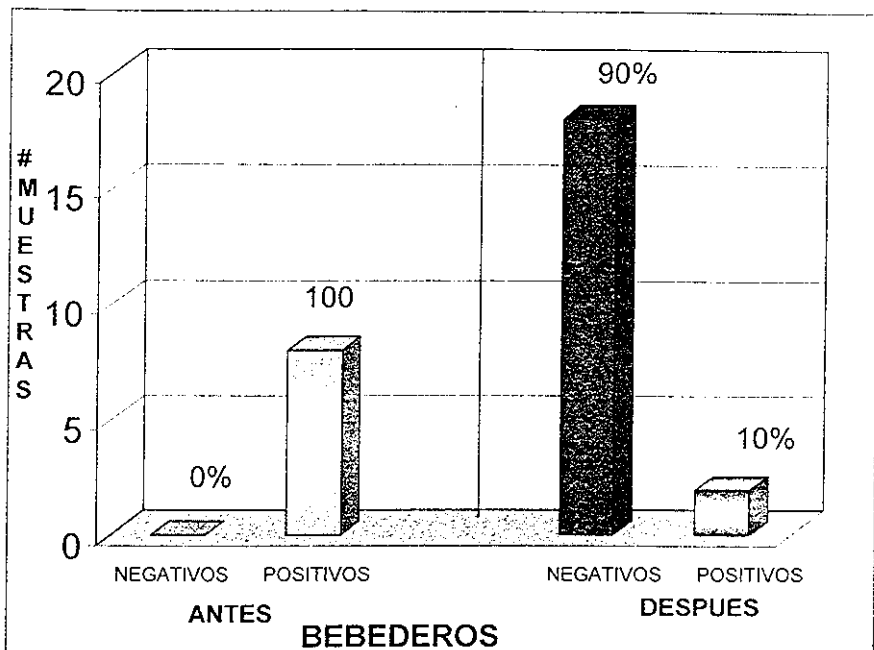
Todas las muestras se incubaron a 37 °C y fueron revisados a las 24, 48 y 72 horas posteriores.

Después del periodo de incubación se determino crecimiento bacteriano como: negativo o positivo de cada una de las muestras.

RESULTADOS:

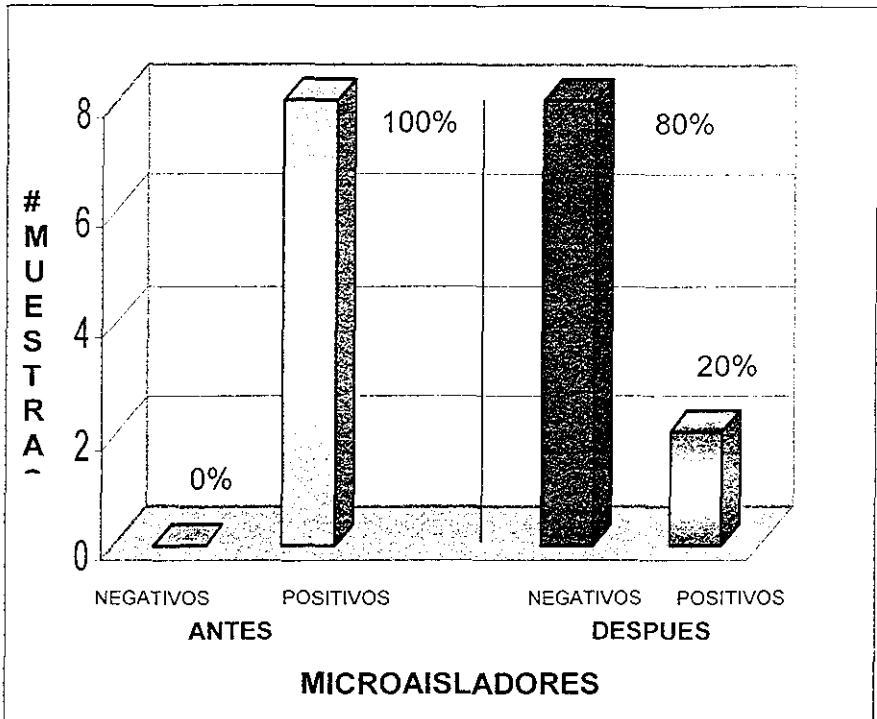
Los resultados obtenidos del muestreo a los materiales utilizados en el bioterio arrojaron datos importantes respecto a la forma en que se estaba llevando a cabo los procedimientos de descontaminación y esterilización.

En el caso de los bebederos, inicialmente los datos obtenidos mostraron que existían altos índices de contaminación, el 100% de las muestras dieron positivo a crecimiento bacteriano (Gráfica. 1) aun después de haber sido lavados y esterilizados, lo cual indicaba que alguno de los pasos en el procedimiento de descontaminación no se estaban realizando de forma correcta puesto que no se realizaba el tallado de la tapa y pipeta como se recomendaba; tras la modificación del método de lavado y descontaminación los resultados presentaron una disminución hasta de un 90% en los índices de contaminación y solo un 10% de crecimiento bacteriano (Gráfica.1).



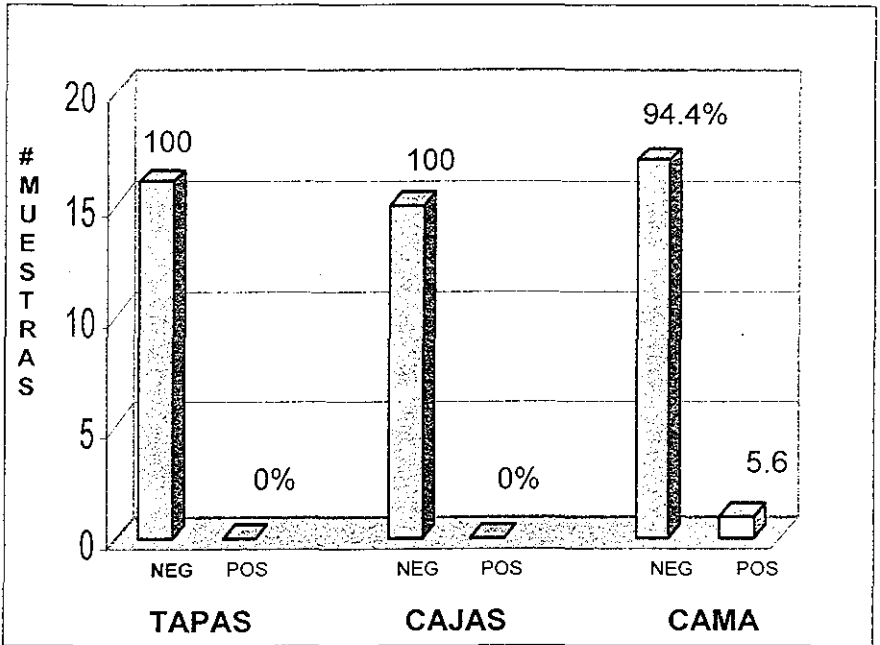
Gráfica 1. Resultados del muestreo a bebederos, antes y después de la modificación del método de lavado.

Al igual que en el caso de los bebederos las muestras obtenidas de los micro aisladores presentaron una alta incidencia de contaminación el 100%, en este caso la deficiencia se presentó debido a que los micro aisladores eran puestos a remojar en la misma agua en la que habían estado las cajas, se sugirió que después del lavado de las cajas el agua fuera reemplazada o en su caso que los micro aisladores fueran lavados primero, los resultados fueron una disminución en la contaminación de un 80% (Gráfica.2).



Gráfica 2. Resultados del muestreo a micro aisladores, antes y después de la modificación del método de lavado.

Los resultados obtenidos del muestreo a tapas y cajas demostraron que estos estaban libres de contaminación con 0% de crecimiento bacteriano. En el material de cama solo se presentó un caso de contaminación de un total de 18 muestras representando un 5.6% de crecimiento bacteriano, aun con este resultado se tiene la confianza de que el procedimiento funciona para la eliminación de microorganismos del material de cama (Gráfica.3).



Gráfica 3. Resultado del muestreo realizado a tapas, cajas y material de cama.

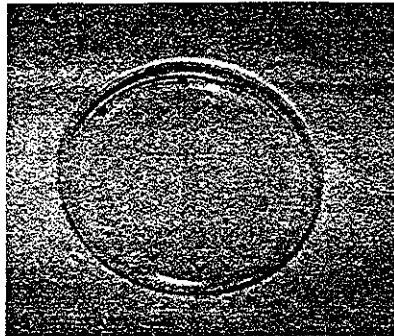
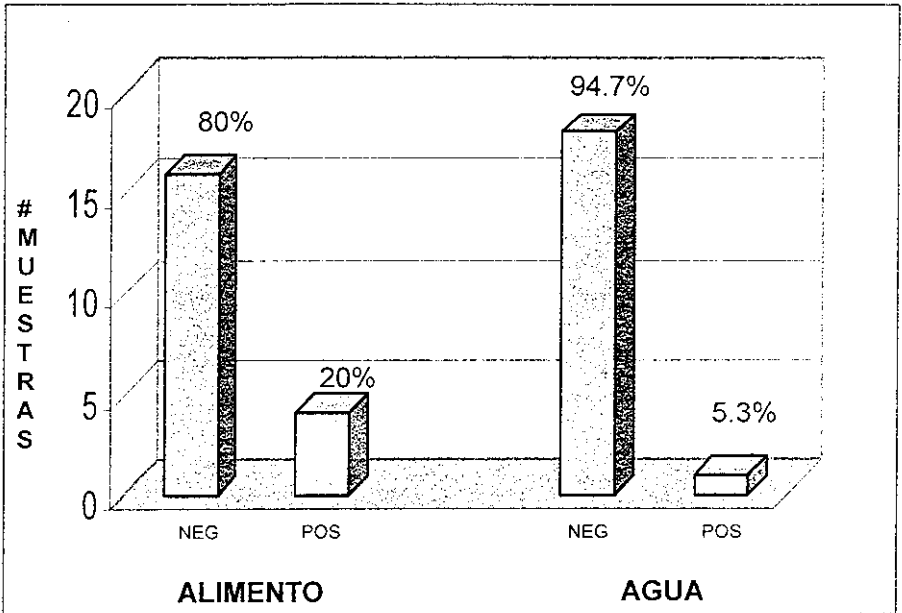


Fig. 12 muestra de material de cama.

Los resultados del muestreo realizado en el alimento nos permitieron percatarnos de las fallas en los tiempos de autoclaveado del mismo, ya que si eran recomendados 15min. a 121 C° (Smith, M. 1999) estos no siempre se cumplían, en ocasiones eran sometidos a esterilización solo durante 10 min.

tiempo insuficiente para la eliminación de microorganismos. Las muestras tomadas del alimento esterilizado presento un 20% de contaminación. El agua de bebida presento una contaminación del 5.3% (gráfica 4).



Gráfica 4. Resultado del muestreo a alimento y agua.

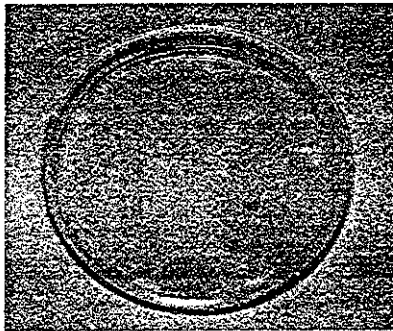
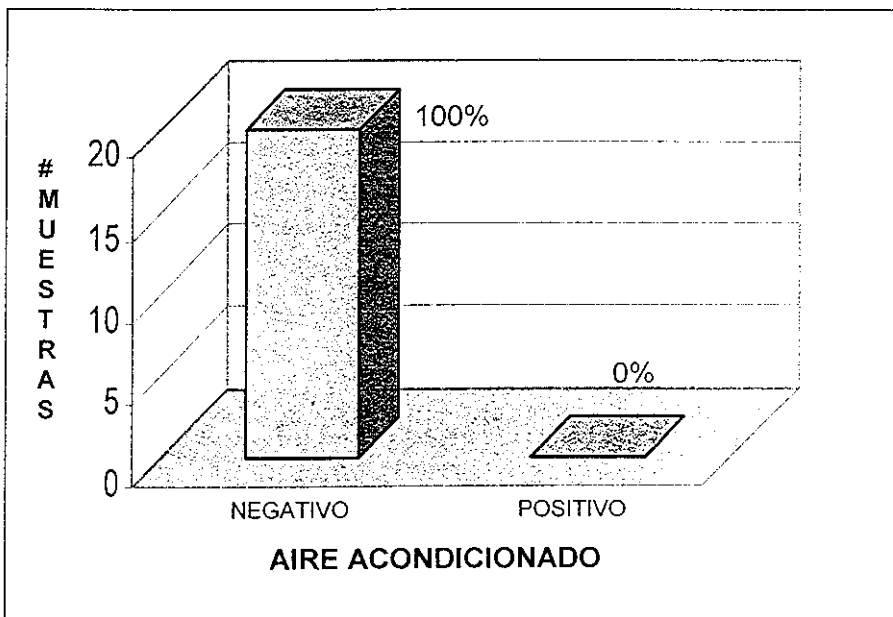
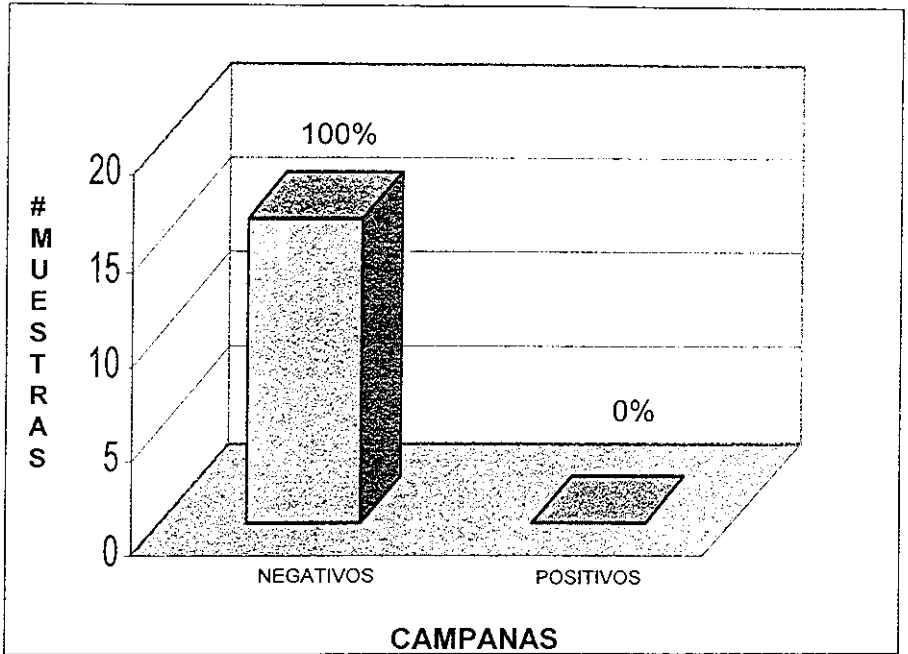


Figura 12. Muestra de alimento.

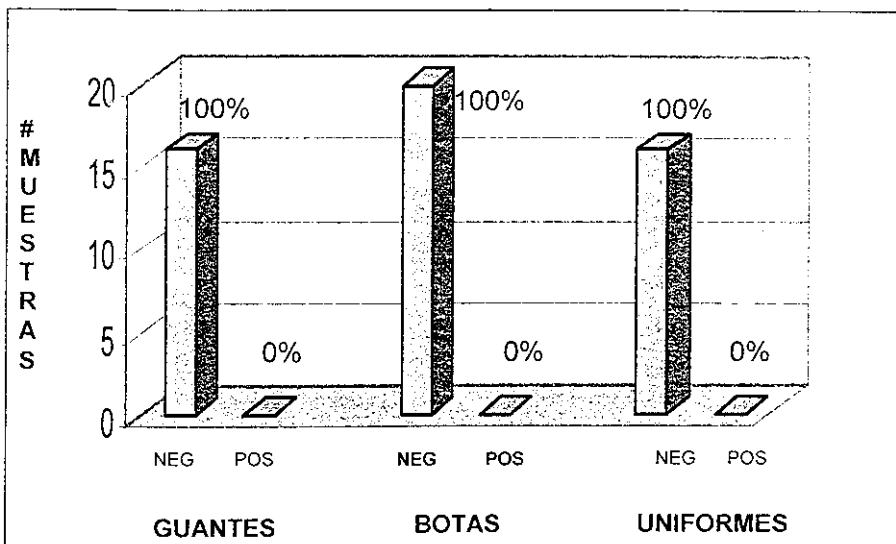
Las muestras obtenidas de los conductos de aire acondicionado estéril, campanas de flujo laminar y material utilizado para ingreso al bioferio como: uniformes, botas y guantes, presentan que éstos se encuentran libres de contaminación, con un 0% de crecimiento bacteriano (gráfica 5, 6, 7).



Gráfica 5. Resultados del muestreo a los conductos de inyección de aire estéril.



Gráfica 6. Resultados del muestreo a las campanas de flujo laminar.



Gráfica 7. Resultados del muestreo a la ropa utilizada para ingreso al bioterio (Guantes, botas y uniforme).

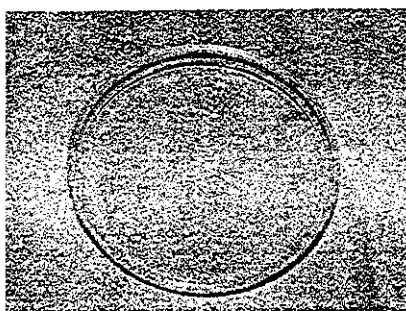
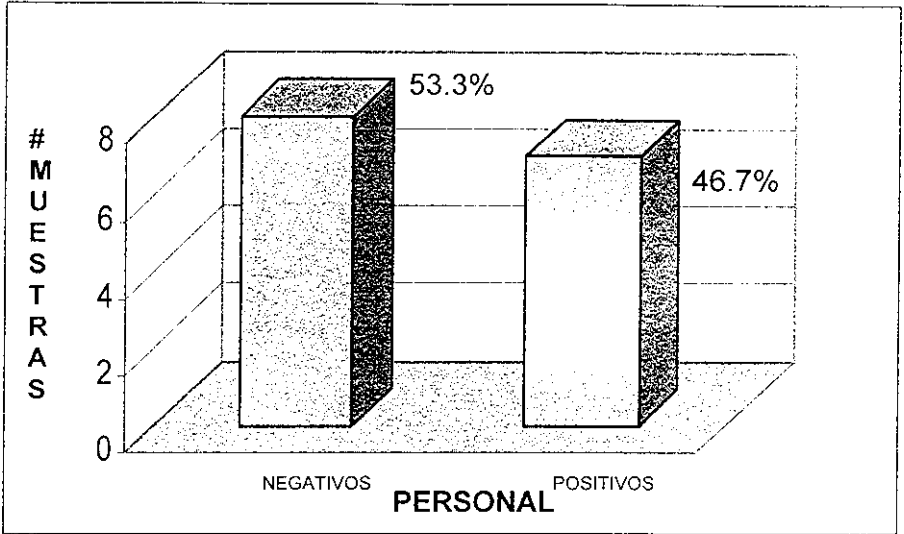


Figura 12. Muestra de uniformes.

El resultado del muestreo a personal de ingreso señaló la existencia de contaminación debido a la negligencia.



Gráfica 8. Resultado del muestreo al personal de ingreso al bioterio.

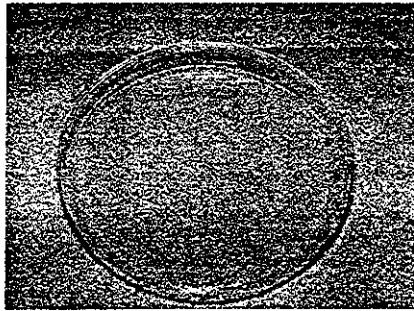


Figura 13. Muestra del personal.

DISCUSIÓN:

Es importante contar con apropiadas prácticas de descontaminación y esterilización dentro del bioterio, las cuales permitirán mantener la salud del animal de laboratorio y evitaran comprometer la validez de los experimentos. En las instalaciones del bioterio del IIB se proporcionan las condiciones de alojamiento bajo barreras, que deben ser monitoreadas con frecuencia para su buen funcionamiento. Sin embargo, antes del establecimiento del sistema de barreras en el bioterio la aparición de un brote infeccioso provocó el sacrificio total de la colonia de roedores. Por tanto el conocer el estado actual de las condiciones ambientales resulta importante para la detección de posibles focos de infección.

Las cepas preservadas en el bioterio al ser adquiridas presentan un certificado de salud microbiológica en el cual se especifica los microorganismos que no están presentes en ellas, estos animales son denominados Libres de Patógenos Específicos o SPF (Fig.1). Algunas de las cepas que podemos encontrar en el bioterio son: ratones IL-6, Balb-c, C3H, CD1, ratones "nock out" y ratas Wistar, las cuales son utilizadas en las diversas disciplinas de investigación del instituto.

La mayoría los procesos de descontaminación y esterilización aplicados a los insumos empleados en el bioterio resultaron ser efectivos para la eliminación de microorganismos tal es el caso de: cajas, uniformes, botas, guantes, rejillas, aire acondicionado, campanas de flujo laminar, para el caso de agua y material de cama la contaminación que presentaron fue mínima, esta probablemente debida a la exposición con otros materiales.

Al realizar el análisis microbiológico para determinar la presencia de microorganismos en bebederos y micro aisladores se encontró que al inicio

del experimento la totalidad de las muestras (8 en ambos casos) presentaron un 100% de crecimiento bacteriano, por lo que se realizó una modificación en el procedimiento de lavado el cual favoreció en un 80% la eliminación de contaminación en micro aisladores y un 90% en bebederos.

De acuerdo con el manual de la UFAW (Smith. 1999), en donde se establecen los tiempos de esterilización para los materiales utilizados en el bioterio, los artículos alimenticios necesitan un tratamiento de 121° C durante 15 min. El personal encargado de esterilizar el alimento consumido en el bioterio no siempre seguía las especificaciones señaladas, dando ciclos de 121° C durante 10 min. por lo cual la contaminación encontrada fue del 20%, la recomendación hecha al personal encargado del manejo de la autoclave fue de seguir el procedimiento adecuado.

El bioterio consta de una serie de lineamientos que es necesario seguir en caso de que se desee hacer uso de las instalaciones para cualquier propósito tal es el caso de los procedimientos de ingreso de personal nivel de seguridad I y II (Tablas 4 y 5), cabe destacar que las muestras que resultaron positivas provenían de personal de ingreso que se apegaba al procedimiento de ingreso de personas Nivel de Seguridad I (los cuales tienen acceso restringido a los cuartos de producción).

CONCLUSIONES:

En el presente trabajo se determinó que la mayoría de los procedimientos de descontaminación y esterilización de los insumos utilizados en el bioferio resultaron ser efectivos para la eliminación de los microorganismos tal es el caso de: cajas, uniformes, guantes, botas, rejillas, aire acondicionado, campana de flujo laminar, agua y material de cama.

Después de los resultados obtenidos de las muestras que presentaron crecimiento bacteriano la sugerencia en la aplicación correcta de las recomendaciones de limpieza derivó en una disminución de contaminación.

En cuanto a los sitios que presentaron una mayor disposición para el ingreso de microorganismos al interior del bioferio la entrada del personal resultó ser el más vulnerable, debido a la negligencia del personal. Se sugiere la inspección constante del sitio para verificar que se realicen de forma correcta los procedimientos.

BIBLIOGRAFÍA:

Baker, H.G., Lindsey, J. R. y Weisbroth, S. H. Housing to control research variables. En " The Laboratory Rat ". Vol. 1, pp 169-192. Academic press, New York (1979).

Bazaga, S. F, Gil del Real, J. S. y Urquijo, J. P. Prevención y Seguridad, en *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal.*; Editado por: Zúñiga, J. M.; Marí, J. A. T.; Milocco, S. N. Y Piñeiro, R.; pp. 291-322; Madrid; España. (2001).

Clough, G. The Animal House: Design, Equipment and Environmental Control, en *The UFAW Handbook on Care and Management of Laboratory Animals (Volume 1).*; Editado por: Trevor Poole; for UFAW (Universities Federation of Animal Welfare).; pp. 97-134. U.K. (1999).

Cohen, B. J. y Loew, F. M. Laboratory Animal Medicine: Historical Perspectives, in *Laboratory Animal Medicine*; editado por: Fox, J. G., Cohen, B. J. y Loew, F. M.; pp. 1-16; USA. (1984).

Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. Objectives, Terminology, and Overview of Pathogen Status, in *Infectious Diseases of Mice and Rats.* pp 3-12, U.S.A. (1991).

Dávila, A. G. y Zúñiga, J. M. La Ciencia del Animal de Laboratorio y el procedimiento experimental, en *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal.*; Editado por: Zúñiga, J. M.; Marí, J. A. T.; Milocco, S. N. Y Piñeiro, R.; pp. 3-22; Madrid; España. (2001).

Gustafsson, B. E. The germ-free animal: its potential and its problems, in *The Germ-free Animal in Biomedical Research*; Editado por Coates, M. E. y Gustafsson, B. E.; pp. 1-8; London, England. (1984).

Hansen, K. H. Strategies for sampling animals for bacteriological examination, en *Handbook of Laboratory Animal Bacteriology*; pp. 1-14; USA. (2000);

Hugo, W. B. y Russell, A. D. Types of Antimicrobial Agents; en *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization (Tercera edición)*. Editada por: Russell, A. D.; Hugo, W. B. y Ayliffe, G. A. J.; Editorial. Blackwell Science.; pp. 629-674. U.K.. (1999).

Jacoby, R. O. y Lindsey, J. R., Risks of Infection among Laboratory Rats and Mice at Major Biomedical Research Institutions. *ILAR Journal* V 39:4 (1998).

Livingston, R. y Riley, L., Diagnostic Testing of Mouse and Rat Colonies for Infectious Agents. *Lab. Animal* 32:5 44-51 (2003).

Nacional Research Council (NRC) *Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio* (2002).

Newton, W.M. Environmental impact on laboratory animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 22, 1-28 (1978).

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

Pakes, S. P., Lu, Y. S. y Meunier, P. C. Factors That Complicate Animal Research , en *Laboratory Animal Medicine*; editado por: Fox, J. G., Cohen, B. J. y Loew, F .M.; pp. 649-660; USA. (1984).

Russell, A. D. Heat Sterilization; en *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization (Tercera edición)*. Editado por: Russell, A. D.; Hugo, W. B. y Ayliffe, G. A. J.; Editorial. Blackwell Science.; pp. 629-674. U.K. (1999).

Schonholtz, G. J., Maintenance of Aseptic Barriers in the Conventional Operating Room. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 58-A, 4 pp439-445 (1976).

Smith, M. S. Safety and Hygiene; en *The UFAW Handbook on Care and Management of Laboratory Animals (Volumen 1)*.; Editado por: Trevor Poole; para la UFAW (Universities Federation of Animal Welfare).; pp. 141-170. U.K. (1999).

Svendsen, P. Environmental Impact on Animal Experiments, en *Handbook of Laboratory Animal Science (Volumen 1)*.; Editado por: Svendsen, P. y Hau, J.; pp. 191-202; USA. (1994).

Wolfensohn, S. y Lloyd M. Introduction to Laboratory Animal Husbandry, en *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare (Tercera Edición)*. pp 85-106. UK(2003).

Won, Y-S, et al., Microbiological contamination of Laboratory Mice and Rats in Korea from 1999 to 2003. *Exp. Anim.* 55:1, 11-16, 2006.