

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO



FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“Determinación de Buenas Prácticas de Producción de ratones (*Mus musculus*) en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia”

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado por:

ÁNGELA AÍDA MAZÓN FIERRO

RIOBAMBA – ECUADOR

2010

AGRADECIMIENTO

A mi familia, mi madre que ha sido para mí, ejemplo y apoyo en todo el camino, a mis hermanos Mónica, Guido y David por ser mis compañeros en todas las circunstancias de la vida.

Es necesario agradecer a las instituciones que han apoyado la consecución de este proyecto: la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Empresa Eléctrica Riobamba S.A., Ilustre Municipio de Riobamba, Empresa Purifluidos, CESTA.

A mis todos y cada uno de mis maestros por compartir sus conocimientos y permitirme llegar a la obtención de este logro en mi vida en especial al Dr. Francisco Portero, cuya dirección ha sido de vital importancia, Dra. Sandra Escobar, Dra. Aída Fierro, y a las Autoridades de la Facultad de Ciencias. A mis amigos Vero, Waldo y Germán, gracias a todos por hacer de este camino una maravillosa experiencia.

A Dios, que sabe que aun nombrándolo al final es el primero en mi vida.

DEDICATORIA

A mi hija, Cori Martina, por ser esa luz que Dios me ha regalado para iluminar mi vida todos los días.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dra. Yolanda Díaz
DECANA DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS

Dr. Luis Guevara
DIRECTOR DE ESCUELA

Dr. Francisco Portero
DIRECTOR DE TESIS

Dra. Sandra Escobar
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Aída Fierro
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Tec. Carlos Rodríguez
DIRECTOR CENTRO DE
DOCUMENTACIÓN

NOTA DE TESIS ESCRITA

Yo, Ángela Aída Mazón Fierro soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

ÁNGELA AÍDA MAZÓN FIERRO

INTRODUCCIÓN

El uso de modelos animales para el estudio de “desórdenes humanos” ha jugado un rol crítico en entender los procesos de enfermedades y, de hecho, han sido de gran valor para el diseño y test de regímenes de tratamiento. Una gran variedad de especies, vertebrados e invertebrados, han sido utilizados con estos fines. La docencia e investigación biológica, biomédica, y el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos importantes para la salud humana y animal, requieren la utilización de animales de laboratorio.

Los ratones han sido domesticados durante siglos, incluso milenios, y se han utilizado en la investigación científica desde la década de 1600. Sin embargo, el desarrollo de métodos que utilizan al ratón de laboratorio como un modelo de investigación empezó realmente con experimentos genéticos en el año 1900. (3)

Hoy en día, el ratón de laboratorio es reconocido como el modelo preeminente para la investigación genética moderna. Los ratones también se utilizan en una variedad de otros tipos de investigación, incluyendo el cáncer, la inmunología, la toxicología, metabolismo, biología del desarrollo, la diabetes, la obesidad, el envejecimiento y la investigación cardiovascular. Ellos son apreciados por muchas cualidades, incluyendo su tamaño pequeño, corto tiempo de generación, y la facilidad de reproducción en el laboratorio. El hecho de que son genéticamente los mejor caracterizados de todos los mamíferos aumenta su valor para todos los campos de estudio. (50)

El diseño de los experimentos que utilizan ratones de laboratorio exige la definición detallada de las características genéticas y ambientales. Solo así, utilizando animales definidos y estandarizados se obtendrán resultados reproducibles. Mantener los animales en condiciones sofisticadas durante los experimentos puede ser inútil si los mismos fueron previamente sometidos a agentes infecciosos, nutrición inadecuada, estuvieron en contacto con agentes químicos perjudiciales o albergados en condiciones que alteraron sus características comportamentales, fisiológicas y hasta anatómicas. Todo lo que suceda desde el nacimiento hasta la muerte del animal debe ser preocupación del investigador, pues

a todo lo largo de este intervalo pueden introducirse variables que afecten adversamente los resultados experimentales. (13)

En nuestro medio la Ciencia y la Tecnología de animales de laboratorio aún no alcanzan los requerimientos óptimos. Existe un número muy limitado de profesionales y técnicos especializados en los diferentes aspectos de la cría y el mantenimiento de los animales. Los usuarios, no están, en la mayoría de los casos, preparados para definir la calidad del animal que necesitan y generalmente desconocen la historia previa de los que usan y las diferencias de los bioterios que los originaron. (39)

En Ecuador existen varios centros de experimentación animal localizados en diferentes Universidades y Laboratorios Industriales Farmacéuticos; sin embargo cada uno se rige a normativas internas desarrolladas bajo la visión de manuales aprobados internacionalmente.

Países como Canadá, España, Inglaterra, Estados Unidos, México y Argentina, han establecido leyes y reglamentos nacionales que regulan la producción, cuidado y uso de los animales de experimentación, cada una de estas no difiere grandemente, ya que tienen como base acuerdos internacionales como Declaración Universal de los Derechos de los Animales (UNESCO 1986) y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NRC, 1996). (7)

La Facultad de Ciencias de la ESPOCH cuenta con dos espacios físicos en donde se crían, mantienen y utilizan animales de laboratorio. Las especies que se producen son ratas albinas (*Rattus norvegicus*) también llamadas ratas noruegas y ratones albinos (*Mus musculus*), muchos de estos animales son utilizados para prácticas estudiantiles, así como para proyectos de investigación de tesis.

Por esta razón es necesaria la determinación y análisis de los factores que pudieran intervenir en el desarrollo de las especies ya sean que estos se encuentren en el ambiente físico que lo rodea de manera inmediata o del encierro secundario, es decir, macro y micro ambiente. Indiscutiblemente es de vital importancia la calidad genética y microbiológica para obtener resultados confiables y repetibles en las investigaciones realizadas.

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, como institución educativa promotora de la investigación científica, de acuerdo con su visión: "Ser una institución universitaria líder en la Educación Superior y en el soporte científico y tecnológico para el desarrollo socioeconómico y cultural de la provincia de Chimborazo y del país, con calidad, pertinencia y reconocimiento social", ha decidido acertadamente implementar un bioterio en la Escuela de Bioquímica y Farmacia, el cual será un gran aporte para los estudios que se desarrollarán posteriormente. Para lo cual se requiere una infraestructura adecuada, personal calificado y animales de experimentación estandarizados para certificar la validez y eficiencia de los experimentos, su publicación y su posterior aplicación. Al mismo tiempo se debe establecer normas, desarrollar políticas, realizar regulaciones y efectivizar su producción con ética y calidad.

La investigación científica requiere precisar los estudios avanzados a través de experimentos lo más semejantes posible a la reacción humana. La organización Panamericana de la Salud (OPS) expresaba en su XI Reunión Interamericana de 1980: "Los países que han logrado un gran avance en el control de las enfermedades humanas y animales son aquellos que han establecido entidades que se dedican al mejor desarrollo de la Ciencia del manejo de los Animales de Laboratorio". (4)

De tal forma que el presente trabajo de tesis tiene como objetivo general determinar los parámetros de Buenas Prácticas de Producción de *Mus musculus* en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, y los objetivos específicos son: Analizar los factores microambientales y macroambientales en los que habitan los animales de experimentación (*Mus musculus*) del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia. Realizar el control sanitario de los animales de experimentación *Mus musculus* del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH. Elaborar un manual de Buenas Prácticas de Producción para el Bioterio, con el fin de mejorar los medios experimentales e investigativos en los cuales son utilizados los animales de experimentación.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1	PARÁMETROS BIOLÓGICOS DEL RATÓN.....	5
TABLA N° 2	VALORES REFERENCIALES DE QUÍMICA SANGUÍNEA.....	6
TABLA N° 3	PARÁMETROS NORMALES EN ORINA.....	6
TABLA N° 4	PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.....	7
TABLA N° 5	CLASIFICACIÓN SANITARIA DE LOS MODELOS ANIMALES.....	21
TABLA N° 6	CATEGORIZACIÓN DE MOLESTIAS PERMITIDAS.....	24
TABLA N° 7	FACTORES MACROAMBIENTALES RECOMENDADOS RATÓN <i>Mus musculus</i>	34
TABLA N° 8	ESPACIO RECOMENDADO PARA RATONES.....	35
TABLA N° 9	PARÁMETROS BACTERIOLÓGICOS PARA AGUA POTABLE.....	39
TABLA N° 10	PARÁMETROS FÍSICOS PARA AGUA POTABLE.....	39
TABLA N° 11	PARÁMETROS NUTRICIONALES.....	41
TABLA N° 12	RACIONES DE NUTRIENTES RECOMENDADAS.....	41
TABLA N° 13	CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS INFECCIOSOS POR GRUPOS DE RIESGO.....	44
TABLA N° 14	NIVELES DE CONTENCIÓN DE LOS ANIMALARIOS.....	45

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1	RESULTADOS DEL CONTROL DEL MACROAMBIENTE.....	71
CUADRO N° 2	RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL MICROAMBIENTE Y EL AIRE.....	72
CUADRO N° 3	RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AGUA Y ALIMENTO.....	72
CUADRO N° 4	RESULTADOS DEL CONTROL PARASITARIO.....	73
CUADRO N° 5	RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO.....	74
CUADRO N° 6	RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LOS ANIMALES.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1	FUNCIONAMIENTO DEL CICUAL.....	26
FIGURA N° 2	DISEÑO BIOTERIO.....	29
FIGURA N° 3	ESQUEMA DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	57

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1.	GENERALIDADES.....	1
1.2.	BUENAS PRÁCTICAS PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	1
1.3.	CARACTERÍSTICAS DEL RATÓN <i>Mus musculus</i>	2
1.3.1.	VALORES FISIOLÓGICOS.....	4
1.3.2.	CLASIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	8
1.3.3.	CLASIFICACIÓN GENÉTICA.....	10
1.3.4.	MÉTODOS DE APAREAMIENTO.....	14
1.4.	EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	14
1.4.1.	ASPECTOS QUE INFLUYEN EN LA EXPERIMENTACIÓN Y EL BIENESTAR ANIMAL.....	16
1.4.2.	CONTROL SANITARIO.....	17
1.4.3.	BARRERAS SANITARIAS.....	22
1.4.4.	EL BIENESTAR ANIMAL COMO REQUISITO DE CALIDAD.....	23
1.5.	BIOTERIO E INSTALACIONES.....	25
1.5.1.	DISEÑO DEL BIOTERIO	27
1.5.2.	MEDIO AMBIENTE	29
1.5.3.	MACROAMBIENTE.....	30

1.5.4.	MICROAMBIENTE.....	35
1.5.5.	CONTROL DE PLAGAS	42
1.5.6.	ELIMINACIÓN DE DESECHOS.....	42
1.5.7.	CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD	43
1.6.	ÉTICA Y LEGISLACIÓN.....	45
1.6.1.	ALTERNATIVAS AL USO DE ANIMALES	47
1.6.2.	LEGISLACIÓN COMPARADA	47
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	57
2.1.	LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN	57
2.2.	METODOLOGÍA DE TRABAJO.....	58
2.2.1.	ASPECTOS DE LA METODOLOGÍA.....	58
2.2.2.	IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL.....	58
2.2.3.	PLANIFICACIÓN.....	60
2.2.4.	EJECUCIÓN.....	61
2.2.5.	PROCESAMIENTO DE RESULTADOS	70
3.	RESULTADOS	71
4.	CONCLUSIONES.....	75

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ANEXO 1 GRÁFICOS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS.

ANEXO 2 GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. GENERALIDADES

Las Buenas Prácticas de Producción (BPP), es un conjunto de normas, de procedimientos operacionales y prácticas establecidas y promulgadas por determinados organismos que se consideran de obligado cumplimiento para asegurar la calidad de las producciones. (2)

Las normas de BPP constituyen, en esencia, una filosofía de trabajo, son un sistema de organización de todo lo que de alguna forma interviene en la realización en el proceso productivo. La adopción de las BPP para todos los que participan en el proceso productivo contribuye a: Obtener mayor productividad, incrementar la seguridad del personal que participa en el mismo, mejorar la calidad de los productos. (46)

Esta terminología de Buenas Prácticas se recoge en los diferentes países y es aplicable a cualquier tipo de producción. En el caso de los animales de experimentación no existe una norma mundial de Buenas Prácticas en la producción de animales de experimentación, lo que todos refieren son Guías para el Cuidado y uso de animales de laboratorio. (46)

Un buen Programa de Buenas Prácticas en la producción y reproducción de animales, debe incluir instalaciones, ambiente, equipamiento y cuidado que permitan al animal crecer, reproducirse, mantener su buena salud, tener un bienestar adecuado y minimizar las variaciones que pueden afectar los resultados de las investigaciones en los cuales son empleados. (101)

1.2. BUENAS PRÁCTICAS PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Existe abundante evidencia de que las condiciones ambientales en que se crían y experimentan los animales influyen decisivamente en las respuestas a los diferentes tratamientos. Si se requieren repuestas estandarizadas, las condiciones en que se

mantiene a los animales deben ser fijas y comparables en todos los laboratorios del mundo. (7)

En general, los cambios en el ambiente son registrados por los receptores externos de los animales que envían la información al Sistema Nervioso Central (SNC), el que, a su vez, informara al sistema neuroendocrino para restaurar cualquier desbalance homeostático. Esto producirá cambios en el modelo animal y, con ello, alteraciones, reconocibles o no, en las respuestas ocasionadas por el tratamiento experimental. Estas alteraciones pueden traducirse en una modificación del tipo de respuesta o en un aumento de la variabilidad de los resultados, entre o dentro de los laboratorios. (9)

Los principales factores ambientales que afectan a los animales pueden clasificarse en:

- Climáticos (temperatura, humedad, ventilación, etc.).
- Físicoquímicos (iluminación, ruido, anestésicos, composición del aire y cama, etc.).
- Habitacionales (forma, tamaño, tipo y población de las jaulas, etc.).
- Nutricionales (dietas, agua y esquema de administración).
- Microorganismos y parásitos, con especial referencia a los patógenos específicos de cada especie.
- Situación experimental.

1.3. CARACTERÍSTICAS DEL RATÓN *Mus musculus*

TAXONOMÍA

Clase: Mamalia
Orden: Rodentia
Familia: Muridae
Género: *Mus*
Especie: *musculus*

El ratón doméstico es una especie cosmopolita, comensal del hombre. Se adapta ampliamente a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas muy frías hasta regiones tropicales. En general las especies prefieren lugares más secos que húmedos. (88)

Es de hábitos nocturnos, sociales y su comportamiento está influenciado por feromonas. Posee un agudo sentido de la audición, y responde a un amplio rango de secuencias ultrasónicas, por ejemplo cuando la hembra con cría sale del nido, sus crías emiten sonidos ultrasónicos que inmediatamente son percibidos por la madre. En el laboratorio los ratones se alteran por sonidos de muy baja frecuencia, por lo que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan dentro del mismo. (89)

El sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar comida y depredadores, sino también para percibir un orden social.

La visión es muy pobre, la retina tiene muy pocos conos, y por lo tanto no pueden percibir los colores. Poseen una glándulas con forma de herradura en la órbita del ojo llamadas Glándulas Harderianas, cuando el ratón está estresado excreta una sustancia amarronada "porfirina" en la zona periocular.

El sistema social depende de la densidad de población, viven en grandes colonias y el rango social está bien desarrollado. Generalmente son muy dóciles a excepción de algunas cepas exocriadas que mantienen su agresividad, muestra de ello es el canibalismo de los ratones jóvenes puede ser un serio problema en colonias endocriadas. El manejo de los recién nacidos deben hacerse manipulados de manera suave y tranquila, y devolver la camada al nido lo más pronto posible. Por su pequeño tamaño corporal son muy susceptibles a cambios ambientales, aún pequeños cambios de temperatura (2 a 3 °C) pueden afectar la temperatura corporal del animal y modificar su fisiología. (88)

El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm. desde la punta de la nariz a la punta de la cola, el largo de la cola es igual al largo del cuerpo y con un peso aproximado de 30g Las crías al nacer tienen un peso aproximado de 1 a 2 g y gana rápidamente peso durante la lactación. Son omnívoros y el bazo del macho es mayor que el de la hembra. El tamaño del cuerpo del adulto varía de acuerdo a:

- Variables intrínsecas: genotipo, sexo y edad.
- Variables extrínsecas: dieta, número de ratones por caja y temperatura ambiental.

Muchos factores ambientales y genéticos influyen sobre la longevidad del ratón, entre estos factores se encuentra la dieta, la densidad animal por caja, las infecciones subclínicas, los métodos de apareamiento, la predisposición genética a tumores, la cepa, el sexo y la presencia o ausencia de genes mutantes deletéreos. Tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se obtienen de 10 a 12 camadas. En general, los ratones híbridos, producto del cruzamiento entre dos cepas puras, viven más que los parentales. Se estima que el 95% de los animales utilizados en investigación biomédica son roedores: 90% ratones y ratas, 2% hamsters, 2% cobayos, 1% otros. (64)

VENTAJAS DEL USO DE ROEDORES

- Fácil Cuidado y mantenimiento, costo accesible de manutención
- Alta capacidad reproductiva
- Tiempo corto de generación
- Existe mucha información sobre diferentes especies de roedores
- Gran numero de cepas bien definidas y stocks de roedores tradicionales de laboratorio
- Diversidad de características específicas que sirven como modelos (61)

1.3.1. VALORES FISIOLÓGICOS

PARÁMETROS BIOLÓGICOS BÁSICOS

Los valores típicos de diversos parámetros biológicos, la química sanguínea, orina y hematología se presentan a continuación (Ver Tabla N° 1). Una variación significativa de los valores se pueden producir entre los ratones individuales, las cepas y las existencias, los laboratorios y los métodos de muestreo. Es imprescindible que los laboratorios establezcan los valores normales para su instalación específica. (58)

TABLA N° 1 PARÁMETROS BIOLÓGICOS DEL RATÓN

PARÁMETRO	VALOR TÍPICO
Número cromosomas (2n)	40
Promedio de vida	2-3 años
Peso al nacer	1 a 2 g
Edad destete	19 a 21 días
Peso destete	10 a 12 g
Edad pubertad	35 días
Peso corporal de adultos	20 a 40 g
Edad reproductiva	42 días
Duración del ciclo sexual	4 a 5 días
Reproductividad sexual	10 a 20 horas
Tamaño de la camada	6 a 12 crías
Periodo reproductivo óptimo	7 a 8 meses
Productividad crías al año	50 a 100 crías
Temperatura corporal	36.5-38.0 ° C (97,5-100,4 ° F)
Temperatura rectal	37.5 +/- 0.5 ° C
Ritmo del metabolismo	180 a 505 kcal / kg / día
Ingesta de alimentos	12 a 18 g/100 g peso corporal / día
Ingesta de agua	15 mL/100 g peso corporal / día
Frecuencia respiratoria	138 (94-163) respiraciones / min
Ritmo cardiaco	470 (325-780) latidos / min

Fuente: Consejo Canadiense de Protección de los Animales CCAC 2001

QUÍMICA SANGUÍNEA

Los valores aproximados para los parámetros de química clínica se muestran en la Tabla N° 2 Los valores representan los rangos de los valores promedios reportados para los ratones de entre 1 y 12 meses de edad. Representa los datos de los ratones de cepas distintas, sexos y condiciones de laboratorio y la vivienda. (58)

TABLA N° 2 VALORES REFERENCIALES DE QUÍMICA SANGUÍNEA

PARÁMETRO	VALOR
Glucosa mmol/L	9.71-18.60
Urea mmol/L	12.14-20.59
Colesterol Total mmol/L	1.27-2.48
Proteína total g/L	42-60
Albúmina g/L	21-34
Globulina g/L	18-82
Amino- transferasa Aspartato (AST, SGOT) U/L	55-251
Amino- transferasa Alanina (ALT, SGPT) U/L	28-184
Fosfatasa Alcalina U/L	28-94

Fuente: Consejo Canadiense de Protección de los Animales CCAC 2001

ANÁLISIS DE ORINA

La evaluación de la orina del ratón se ve complicado por los volúmenes pequeños que suelen estar disponibles. Para los estudios que requieren múltiples o análisis de orina cuantitativo. Los parámetros normales de orina se muestran en la Tabla N° 3. El tratamiento de agua potable con cloro, ácido, o antibióticos óticos pueden afectar la palatabilidad del agua, y puede reducir la ingesta de agua. (58)

TABLA N° 3 PARÁMETROS NORMALES EN ORINA

PARÁMETRO	VALOR
Color	Claro o ligeramente amarillo
Volumen específico	0.5-2.5 mL/24 h
Gravedad específica	1,030
pH	5.0
Glucosa	0.5-3.0 mg/24 h
Proteínas	0.6-2.6 mg/24 h

Fuente: Consejo Canadiense de Protección de los Animales CCAC 2001

HEMATOLOGÍA

La hematología es el estudio de la sangre y por lo general se refiere al estudio de sus componentes celulares, como eritrocitos o glóbulos rojos, los leucocitos o glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas. Los parámetros hematológicos de referencia se encuentran en la Tabla N° 4. La sangre puede ser analizada con equipos automatizados (recuento sanguíneo completo automatizado) y por el examen microscópico de frotis de sangre. El frotis de sangre se realiza mediante la colocación de un punto (más pequeño que una gota) de sangre cerca de un extremo del portaobjetos de vidrio, generalmente cerca de la etiqueta. (20)

Es importante que la etiqueta quede hacia arriba para que el frotis y la etiqueta estén en el mismo lado, evitando así la posibilidad de que quede inadvertida. (58)

TABLA N° 4 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

PARÁMETRO	VALOR
Glóbulos rojos X 10 ¹² /L	7.9-10.1
Hemoglobina g/L	110-145
Hematocrito %	38.5-45.1
MCV fl	48.0-56.0
MCHC g/dL	25.9-35.1
Plaquetas sanguíneas X 10 ⁹ /L	600-1200
Glóbulos blancos X 10 ⁹ /L	5.0-13.7
Neutrófilos 10 ⁹ /L	0.4-2.7
Linfocitos 10 ⁹ /L	7.1-9.5
Volumen sanguíneo (mL/kg)	70-80

Fuente: Consejo Canadiense de Protección de los Animales CCAC 2001

1.3.2. CLASIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA

En función de la fuente de obtención y las condiciones de cría del animal, así como la carga microbiana asociada al mismo, los animales de laboratorio se clasifican en diferentes categorías higiénico-sanitarias. (22)

En 1969, Townsende en el Centro de Animales de Laboratorio de Carshaltan, Inglaterra publica un esquema de clasificación de los animales de laboratorio, en el cual éstos pueden asociarse en cinco categorías:

CATEGORÍA I: Animal Haloxénico (tradicionalmente Convencional)

Animales mantenidos sin ningún proceso especial (instalaciones abiertas) tradicionalmente llamados Convencionales. Deben estar libres de toda evidencia de enfermedades infecciosas especialmente transmisibles al hombre, tanto en el examen clínico como post – mortem.

Se refiere a las siguientes entidades biológicas:

- Toda *Salmonella* y *Shigella*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Yersinia pseudotuberculosis*
- *Leptospira spp*
- Dermatofitos
- *Sarcoptes scabiei*. (11)

CATEGORÍA II: Animal Miroxénico.

Son comparables a los animales convencionales mantenidos bajo condiciones sanitarias estrictas y estándares. Los mismos albergan una fracción inoculada de microorganismos no patógenos tomadas de la microbiota de un haloxénico; deben mantener o ser del mismo *status* de la Categoría I y además estar libres de:

- *Listeria monocytogenes*
- *Bacillus piliformis*

- Estadios intermedios de Céstodos y de Artrópodos parásitos obligados.
- Especies determinadas demandan la ausencia de los Virus: *Ectromelia* (Ratón) (11)

CATEGORÍA III: "Animal Gnotobiótico con microbiología definida"

Son comparables a los animales derivados de cesárea (Axénicos) a los que se les introducen voluntariamente especies microbianas conocidas. Deben ser del mismo *status* de la Categoría II y además estar libres de:

- *Bordetella bronchiseptica*
- Toda *Pasteurella*
- Todas las Coccidias (*Eimerias spp*) y Helmintos patógenos

Además especies determinadas demandan la ausencia de:

- *Streptobacillus moniliformis* (Ratones y Ratas)
- *Corynebacterium kutscheri* (Ratones)
- *Streptococcus pneumoniae*
- Todas las especies de *Mycoplasma* (Ratones y Ratas) (11)

CATEGORÍA IV: Animal Heteroxénico (Libre de gérmenes patógenos, SPF)

Son comparables a los animales descritos como libres de gérmenes patógenos específicos (*Specific Pathogens Free*, SPF). Estos son derivados de un Axénico o Gnotobiótico que adquiere una microbiota proveniente de su medio, son mantenidos en Zonas Protegidas (sistemas cerrados). Deben ser del mismo *status* de la Categoría III y además estar libres de:

- Estreptococos (excepto Grupo D)
- Neumococos
- Helmintos
- Protozoos patógenos
- Virus que afectan estas especies (11)

CATEGORÍA V: Animal Axénico (Libre de gérmenes, GF)

Son animales que no albergan ninguna especie microbiana viviente detectable. Los mismos son el resultado del uso de sistemas cerrados estériles y son libres de todo organismo demostrable (virus, bacterias, hongos, parásitos y organismos saprófitos). Son conocidos como animales "Germ Free" o "Axénicos", los cuales son derivados por histerotomía (cesárea) o histerectomía aséptica, criados y mantenidos en un aislador mediante técnicas "Gnotobióticas". Estos animales no siempre se obtienen en la práctica, debido a los agentes transmitidos verticalmente. (26)

Este esquema de clasificación por categorías ha sido sujeto a revisiones regulares y a pesar de algunos cambios menores en cuanto al establecimiento y definición de las entidades microbianas (bacterias, hongos, parásitos y virus) que deben o no estar presentes según la categoría específica, el mismo ha resistido la prueba del tiempo. (68)

1.3.3. CLASIFICACIÓN GENÉTICA

Según el Manual de genética de roedores de laboratorio, con relación a sus tipos genéticos, los animales se clasifican en: Colonias Exocriadas (putbred stocks), Cepas Endocriadas (inbred strains); Híbridos, Colonias Parcialmente Endocriadas, Cepas Endocriadas Apareadas al Azar, Cepas Endocriadas Recombinantes, Mutantes, Cepas Congénicas, Cepas Coisogénicas y Subcepas y desviación genética. (11)

COLONIAS EXOCRIADAS

Mantenidas de forma de evitar el cruzamiento de familiares cercanos. El objetivo es mantener el pool y la dispersión genética inicial por tantas generaciones como sea posible. Para esto deben ser mantenidas como colonias cerradas, sin selección y de manera de dar menos del 1% de endocria por generación. El logro de este objetivo dependerá del tamaño de la colonia, el método de elección de los próximos reproductores y el método de cruzamiento que se elija.

Los sistemas de cría recomendados para las colonias exocriadas dependen del tamaño del núcleo de reproducción a saber:

10 a 25 Machos reproductores por generación. Se recomienda:

- Sistemas que maximizan evitar la endocria.

100 Machos reproductores por generación. Se recomiendan:

- Sistemas que maximizan evitar la endocria.
- Sistemas de cruzamiento rotatorio.

Más de 100 Machos reproductores por generación. Se recomiendan:

- Sistemas de cruzamiento rotatorio.
- Cruzamiento al azar.

Sistemas que maximizan evitar la endocria: están basados en que cada macho reproductor contribuye con un macho y cada hembra reproductora contribuye con una hembra para la próxima generación de reproductores. Estos nuevos reproductores se aparean de forma de evitar el cruzamiento de familiares cercanos.

Sistemas de cruzamiento rotatorio: su objetivo es evitar el cruzamiento de familiares cercanos y asegurar que la próxima generación del núcleo reproductor provenga de un grupo de padres más amplio que el esperable por azar.

Cruzamiento al azar: el núcleo de reproducción para la próxima generación se elige al azar en la colonia total y son apareados por sorteo, sin tener en cuenta el grado de parentesco. Pueden ocurrir apareamientos de familiares cercanos, lo cual es una desventaja, pero no ocasionaran un nivel alto de endocria cuando la colonia es de tamaño considerable. (11)

CEPAS ENDOCRIADAS

Obtenidas a partir de una pareja única, por continuo cruzamiento entre hermanos o entre padres e hijos. Después de 20 o más generaciones con este método, se obtiene un coeficiente de endocria (probabilidad de que dos genes de cualquier locus sean idénticos)

del 98,6%. Este es el nivel mínimo aceptado internacionalmente para que una cepa sea designada endocriada. Estas cepas deben ser mantenidas por continuo apareamiento del mismo tipo.

En general, la endocria disminuye el rendimiento reproductivo y tiende a disminuir la expectativa de vida. Con frecuencia, el proceso de endocria pone al descubierto anomalías genéticas encubiertas en las colonias exocriadas. (11)

HÍBRIDOS

Existen dos tipos, el F1 y el F2. El primero resulta del cruzamiento de dos cepas endocriadas. Todos ellos son isogénicos (significa que todos los individuos son genéticamente idénticos como gemelos monocigotos) pero heterocigotos en todos los genes en que las cepas progenitoras difieran. En general, son más adaptables a los cambios ambientales que las cepas de sus padres y tienen mejor rendimiento reproductivo. Solo se usa la primera generación. Los F2 son los animales resultantes del cruzamiento entre dos híbridos F1. Tienen una base genética mayor que los F1. (11)

COLONIAS PARCIALMENTE ENDOCRIADAS

Colonias en las cuales el cruzamiento entre hermanos no ha alcanzado aun 20 generaciones.

CEPAS ENDOCRIADAS APAREADAS AL AZAR

Cepas que tuvieron por lo menos 20 generaciones de cruzamiento entre hermanos, pero no están siendo mantenidas con este tipo de cruzamiento. Esto puede realizarse por algunas generaciones para producir un gran número de animales experimentales por un método como el de las luces de tráfico (traffic light).

CEPAS ENDOCRIADAS RECOMBINANTES

Producidas a partir de dos cepas endocriadas que se aparean para obtener los híbridos F1. Estos se vuelven a cruzar para formar el híbrido F2. De estos últimos se seleccionan, al azar, machos y hembras que se endocrían nuevamente, dando origen a múltiples líneas. El reordenamiento y fijación de los genes, originalmente presentes en las cepas progenitoras, ocurre en forma azarosa en las cepas endocriadas recombinantes así obtenidas.

MUTANTES

Animales resultantes de una mutación natural o inducida. La variación genética de estos animales es similar a la de la cepa que le dio origen. Generalmente, tienen características reproductivas pobres.

Producidas por retrocruzamiento (backcrossing), es decir, cruzamiento repetido de animales portadores de un gen mutante con animales de una cepa endocriada que, normalmente, no es portadora de dicho gen. Se obtienen retrocruzando, por 10 a 12 generaciones, el híbrido F1 portador de la mutante seleccionada con la cepa portadora del fondo genético requerido. La línea así obtenida se mantiene luego en estado homocigótico por cruzamiento entre hermanos. Con este sistema no se transfiere solamente el gen mutante sino, también, una porción cromosomal adyacente cuyo tamaño depende del número de generaciones de retrocruzamiento usado para obtener la cepa congenica (11).

CEPAS COISOGENICAS

Se obtienen ocasionalmente, cuando ocurre una mutación en una cepa endocriada. En este caso, la mutante solo difiere de la cepa original en un único locus.

SUBCEPAS Y DESVIACIÓN GENÉTICA

Pueden existir diferencias genéticas entre cepas o colonias que comparten el mismo nombre original, pero que fueron mantenidas en diferentes localidades. Por definición, esas cepas se llaman subcepas. También, pueden producirse diferenciaciones genéticas en una cepa o colonia mantenida en una localidad determinada durante un periodo largo de tiempo y por eso, es muy importante el monitoreo genético permanente. Cuando se requiere asegurar la preservación de una determinada genética por largos periodos, se puede recurrir a las técnicas de preservación de embriones por congelamiento a muy bajas temperaturas. (11)

1.3.4. MÉTODOS DE APAREAMIENTO

Pares monogámicos: consiste en albergar juntos una hembra y un macho en forma permanente. Este método facilita el sistema de registros y permite aprovechar el estro posparto cuando este ocurre. Es un método más costoso en espacio, trabajo y materiales.

Harenes: un macho se coloca junto con dos o más hembras. Es un método que ahorra machos, pero dificulta los registros. Pueden emplearse dos sistemas:

Harén permanente: el grupo se mantiene junto durante su vida reproductiva y se aprovecha el estro posparto, pero se dificultan registros detallados y hay riesgo de sobrepoblación.

Retiro de la jaula: las hembras grávidas son retiradas a cajas separadas en el último periodo de gestación, para facilitar los registros. Se evita la sobrepoblación, pero se pierde la posibilidad de aprovechar el estro posparto. (11)

1.4. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Según Schwartz (1978): "Un modelo animal se define como un organismo viviente con una inherente adquisición natural a procesos patológicos inducidos o espontáneos que de una u otra manera semejan el mismo fenómeno ocurrido en el humano".

Según Nomura, del Instituto Central de Animales de Laboratorio en Kawasaki (Japón).

El animal de laboratorio definido es aquel que:

Primero: es engendrado y producido en condiciones controladas.

Segundo: mantenido en un entorno controlado.

Tercero: que posee claros antecedentes genéticos y microbiológicos.

Cuarto: que existe una comprobación sistemática de estos antecedentes.

Como vemos en estas definiciones se evidencia que:

Animal de Laboratorio = Animal de Experimentación = Biomodelo Experimental

Todo acto experimental que entrañe un ataque al estado de bienestar animal, susceptible de causarle dolor, sufrimiento, angustia o agravio. Tiene como misión evidenciar o aclarar fenómenos biológicos sobre especies animales determinadas. (54)

La importancia de la interpretación de los resultados y la apreciación de la extrapolación de estos de una especie a otra depende del modelo experimental utilizado. No existe un modelo perfecto extrapolable al hombre, pero existen una infinidad de modelos experimentales, cuyas respuestas fragmentarias incrementan el significado biológico del fenómeno observado. El animal de laboratorio tiene que ser respetado como ser vivo, entender que padece necesidades y sufre dolor, por ley es obligación del personal que lo cuida, mantiene y utiliza (investigador), asegurar su bienestar y confort mientras viva.(77)

Adicionalmente, minimizar las variables no-experimentales optimiza el uso de animales en un estudio determinado. Las condiciones ambientales en que se crían y experimentan los animales influyen decisivamente en las respuestas a los distintos tratamientos. (45)

ANIMAL COMO REACTIVO BIOLÓGICO

Se trata de un animal cuya calidad genética y ambiental ha sido controlada y asegurada y por tanto, es capaz de dar una respuesta fiable y reproducible a la pregunta experimental. Se suman a ello todas las consideraciones de cuidado para el bienestar de cada uno según especie y sus requerimientos etológicos, de manera que no se generen alteraciones o adaptaciones que modifiquen el modelo animal, alterando la respuesta investigativa.

Para obtener este tipo de animal es necesario conocer el concepto de "barrera" (que comprende las medidas y condiciones bajo las cuales se producen y reproducen los animales en los bioterios), para garantizar que mantenga condiciones definidas, tanto desde el punto de vista genético como sanitario. (13)

El concepto "homogeneidad del reactivo biológico" implica definir las condiciones del animal en cuanto a características somáticas peso, sexo y edad, genéticas igualdad o similitud biológica de su información genética a partir del mantenimiento de una tasa de consanguinidad elevada- y sanitarias -según los requerimientos del experimento: axénicos (sin gérmenes), gnotoxenicos (con gérmenes controlados) o estándares con flora nativa.

Entiéndase por barrera: La temperatura adecuada para cada especie; nivel de ruido, intensidad de la luz, paso por autoclave de las cajas, camas y del agua y la comida de los animales: verificación por control microbiológico medioambiental de las condiciones de las salas de cría y mantenimiento de los animales; cambio de ropa de investigadores y operarios para el ingreso a las salas de animales, son algunas barreras que garantizan que no se introduzcan nuevas bacterias o contaminantes que alteren o cambien el modelo animal. (3)

1.4.1.ASPECTOS QUE INFLUYEN EN LA EXPERIMENTACIÓN Y EL BIENESTAR ANIMAL

El cuidado, la utilización apropiada y el trato humanitario de los animales empleados en investigación, pruebas de laboratorio y educación requieren de un conocimiento especializado de los ambientes, procesos y procedimientos relacionados con su uso y cuidado. Ello también implica el establecimiento de condiciones de infraestructura y ambientes de trabajo propios y específicos. En la actualidad, en la mayoría de los países que cuentan con esta ciencia y tecnología desarrolladas se exige que dichas condiciones sean certificadas y categorizadas según competencias y necesidades. Por eso, es importante la formulación de un programa de aseguramiento de la calidad que incluya control sanitario y genético, y entrenamiento y validación permanente de procesos y procedimientos de laboratorio (dentro de ellos, el conocimiento de la etología de cada especie animal utilizada). (42)

Se debe planear un adecuado ambiente físico y social, hospedaje, espacio y manejo para el albergue de los animales, considerando factores como:

- La especie, raza o cepa de animales y sus características individuales tales como sexo, edad, tamaño, conducta y salud.
- La habilidad de los animales para integrar grupos con sus semejantes, a través de la vista, olfato y posible contacto, ya sea que los animales se mantengan aislados o en grupos.
- El diseño y construcción del alojamiento.
- La disponibilidad y adecuación de elementos enriquecedores del medio ambiente.
- Las metas del proyecto y el diseño experimental (por ejemplo: producción, crianza, investigación, pruebas de laboratorio y educación).
- La intensidad de la manipulación animal y el grado de alteración, cambio o patología que puedan causar los procedimientos.
- La presencia de materiales peligrosos o que causen enfermedad.
- La duración del período de permanencia de los animales.

Esto implica que el diseño de las áreas de albergue, las zonas de trabajo y las áreas de almacenamiento, lavado, esterilización y desplazamiento deben ser cuidadosamente diseñadas por personal experto en el tema. El equipo de trabajo, además de ser idóneo, debe contar con el apoyo de un CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio), que vele porque cada proyecto de investigación cumpla con los requisitos adecuados y humanitarios de trato y manejo de los animales, y garantice la capacitación y entrenamiento requeridos por los investigadores y el personal que se aproxime a los animales. (42)

1.4.2. CONTROL SANITARIO

Constituye el programa básico de cuidado de los animales en salas de experimentación o bioterios. Allí los animales se integran a una serie de cuidados sanitarios que les protege de microorganismos no definidos como parte de su condición y por otro lado, se resguarda a quienes los manejan de no contaminarse de microorganismos, especialmente de tipo zoonótico. Este programa incluye procedimientos de rutina diaria, semanal o mensual que permiten la óptima remoción de materiales y elementos potencialmente colonizables por microorganismos que pueden afectar el entorno y la condición biológica

del mismo animal. Para ello es indispensable establecer parámetros de monitoreo sanitario al animal y a su medio de albergue.

Se hace referencia a la práctica repetida de una batería de pruebas, por un lado, para evidenciar que el animal mantiene las características de la flora con las cuales fue certificado para el tipo de estudio diseñado y por otro, para hacer un seguimiento permanente a las condiciones del medio ambiente donde se aloja y cuida el animal, verificando de manera constante y periódica el no ingreso de nuevos microorganismos que puedan introducir cambios o variables en este. (38)

El control al material biológico incluye evaluación sexológica, de heces y orina; el no biológico, peritaje del agua, comida, cama, cajas y medioambiente.

El mantenimiento adecuado y estable de las condiciones microbiológicas requiere la definición de protocolos de higiene, desinfección y esterilización, tanto del material biológico como no biológico, y del medio ambiente. Para eso es importante tener claramente definidos los protocolos de su obtención, definición y sustento conceptual y científico.

La frecuencia e intensidad de los procedimientos de limpieza dependen de las características fisiológicas y conducta normal del animal. Los métodos de intervenciones higiénicas varían de acuerdo con muchos factores, entre ellos: tamaño, tipo y propiedades físicas del encierro; tipo, número, tamaño, edad y condición reproductiva de los animales; tipo y uso de los materiales de cama; temperatura y humedad relativa; naturaleza de los materiales que crean la necesidad de la higiene; fisiología normal y características de conducta de los animales, y rapidez con que se contaminan las superficies del albergue. (35)

Algunos sistemas de alojamiento o protocolos experimentales pueden requerir técnicas de manejo específicos, tales como la manipulación aséptica o la modificación de la frecuencia del cambio de cama, situación que debe ser cuidadosamente evaluada por parte del investigador y el director del bioterio, pues esto puede modificar la conducta del animal y cambiar el modelo. (38)

En las instalaciones para alojar animales no se deben usar agentes que enmascaren los olores, sustituirse las buenas prácticas de higiene o ventilación adecuada ni, tampoco, exponer a los animales a compuestos volátiles que podrían modificar los procesos fisiológicos y metabólicos básicos.

La higiene incluye la limpieza del encierro primario y secundario, con procedimientos validados y buenas prácticas de laboratorio para garantizar el bienestar animal y por lo tanto, los resultados de las investigaciones. La detección de agentes infecciosos específicos, como los priones, requiere un manejo de protección y total destrucción en el proceso de desinfección.

La evaluación sanitaria de los animales empleados en investigación sirve para clasificarlos y asimismo, establecer su participación según la calificación requerida para cada tipo de ensayo biológico. Asimismo, para su posible y permitido uso en docencia. Esta determinación sanitaria permite, a la vez, conocer las condiciones de producción y mantenimiento y la inexistencia de riesgos para las personas que están en contacto con ellos. (36)

Las clasificaciones más conocidas y más utilizadas son:

- Gnotobioticos: nacen libres de gérmenes, pero se contaminan intencionalmente con determinados microorganismos.
- Axénicos (*germfree*): libres de todo germen demostrable.

Entre los métodos de obtención de los animales incluidos en los dos grupos anteriores, encontramos la histerectomía de una madre convencional, reproducción por emparentamiento de dos animales gnotobioticos, etc.

Una vez obtenidos, los animales deben dejarse en aisladores previamente esterilizados, que garanticen el mantenimiento de su calidad sanitaria. También debe seguirse el mismo

protocolo con el agua, la comida, la cama y el aire. Estos métodos de obtención y mantenimiento son estrictos porque el objetivo es evitar cualquier tipo de contaminación con microorganismos a través de estas fuentes.

- Animales SPF (*specific pathogen free*): libres de patógenos específicos, mantenidos en sistemas separados del ambiente externo mediante barreras físicas, diseñadas específicamente para prevenir su contaminación con patógenos potenciales. El término, por sí mismo, no ofrece una idea exacta de la calidad sanitaria de los animales si no se conocen los microorganismos patógenos ausentes en ellos.
- Convencionales: no necesitan barreras tan estrictas para su crianza y están libres de enfermedades transmisibles al hombre. Cuando su uso es permitido y siguiendo protocolos aprobados por comités de ética, se utilizan para docencia o entrenamiento.

Con el fin de definir mejor la calidad sanitaria de los animales de laboratorio, fueron propuestos y utilizados varios sistemas de clasificación que tienen en cuenta su flora microbiana, su carga parasitológica y su sistema de manejo. Uno de los métodos más difundidos fue el utilizado por el ahora desaparecido Centro de Animales de Laboratorio del Consejo de Investigaciones Médicas, del Reino Unido (LAC/MRC) en su Sistema de Acreditación de Criadores de Animales de Laboratorio. Este clasificaba los roedores y lagomorfos con estrellas. A continuación, un resumen de la clasificación por categorías y sus usos (Ver Tabla N° 5). (36)

Una estrella: Comparable a animales criados sin barreras, tradicionalmente llamados "convencionales", pero libres de las enfermedades comunes a los animales comunicables al hombre. Estos suelen ser útiles para colegios y universidades que enseñan ciencias biológicas.

Dos estrellas: Comparables a los llamados "convencionales", mantenidos bajo mayores patrones de manejo y por lo tanto, no infectados con cestodos, lo que indicaría contaminación directa o indirecta de la colonia con otros animales. También deben estar libres de enfermedades epidémicas serias, específicas para cada especie. Pueden ser satisfactorios para algunos experimentos de corta duración.

Tres estrellas: Comparables a los derivados por histerectomía.

Cuatro estrellas: Comparables a los designados como SPE

Los pertenecientes a las categorías de tres y cuatro estrellas están libres de un amplio rango de patógenos y son aptos para casi todas las disciplinas. Tienden a ser el grado estándar de animales de laboratorio en los países desarrollados.

Cinco estrellas: Comparables a los libres de gérmenes.

TABLA N° 5 CLASIFICACIÓN SANITARIA DE LOS MODELOS ANIMALES

CATEGORÍA ACTUAL	DENOMINACIÓN TRADICIONAL	AUSENCIA DE	MANEJO DE BARRERAS	ADECUADO PARA
(*) Una estrella	Convencional	Enfermedades zoonóticas	Cuidado veterinario estándar	Docencia
(**) Dos estrellas	Convencional	Enfermedades epidémicas específicas	Cuidado veterinario: monitoreo microbiológico permanente	Experimentos de corta duración
(***) Tres estrellas	Libres de gérmenes patógenos específicos	Organismos incapaces de pasaje transplacentario y otro, raros en colonias con alto estándar de manejo	Simples de alto estándar de manejo: definición de procedimiento operacional estándar	Experimentación biológica y biomédica
(****) Cuatro estrellas	Libres de gérmenes patógenos específicos	Libres de amplio rango de patógenos	Sofisticadas: alto estándar de manejo validación de POES	Experimentación biológica y biomédica
(*****) Cinco estrellas	Libres de gérmenes	Cualquier organismo demostrable	Sistema estéril	Técnicas especiales y específicas de experimentación biológica y biomédica

Fuente: Centro de Animales de Laboratorio del Consejo de Investigaciones Medicas R.U.

Como resultado de un programa conjunto para la cooperación y desarrollo en ciencia y tecnología entre los gobiernos de Japón y Estados Unidos, elaboraron un Manual de Monitoreo Microbiológico de Animales de Laboratorio.

Si bien allí no se establece una clasificación sanitaria de los animales, se aporta una lista de agentes conocidos o sospechados como patógenos, para ratas y ratones, que pueden interferir con los resultados experimentales. También se entrega una descripción de los agentes, características de la infección, métodos de control y prevención, y métodos de ensayo del agente patógeno. Es una excelente guía para el control requerido en colonias de ratas y ratones que abastezcan animales definidos sanitariamente. (36)

1.4.3. BARRERAS SANITARIAS

La barrera total es la suma de las barreras parciales, desde la más sencilla a la más sofisticada. No poder afrontar instalaciones costosas no justifica la falta de empleo de otras barreras simples como, por ejemplo, cerrar con llave las puertas para limitar el acceso de visitantes o del personal no autorizado en determinados sectores, o el lavado frecuente de las manos con procedimientos adecuados. Las barreras sanitarias consisten en instalaciones, equipos, procedimientos y rutinas deben estar validadas. Su utilización debe realizarse siguiendo estrictos Procedimientos Operativos Estandarizados (POE's) escritos, en cuya aplicación deben estar familiarizados y entrenados los usuarios.

Los POE's deben estar disponibles en cada área de trabajo a la que corresponden. La dirección del establecimiento o el departamento que corresponda deben contar con un ejemplar completo. A continuación, una lista de las principales barreras sanitarias y algunos comentarios sobre su instalación y utilización. (83)

- Ubicación del bioterio fuera del alcance de peligros sanitarios (separación de instalaciones de diferente grado sanitario, alejamiento de lugares frecuentados por animales salvajes o personas enfermas, etc.) y utilización de sistemas y materiales

de construcción que eviten el alojamiento de plagas y faciliten los procesos de sanitización.

- Diseño del bioterio adecuado, para asegurar el aislamiento de las zonas de animales y de los elementos sanitizados respecto de las zonas con mayor grado de contaminación. Es aconsejable la utilización de código de colores.
- Filtración adecuada del aire de ingreso y gradiente de presión desde las zonas más limpias a las más contaminadas (presión mayor en corredor limpio) salvo en bioterio de animales infectados, donde la presión menor debe estar en las salas de animales y el aire debe filtrarse también a la salida de estas.
- Flujo de personas y materiales, destinado a evitar contaminación cruzada.
- Barreras anti-roedores y anti-insectos en las zonas de acceso (chapas lisas de, aproximadamente, 40 cm de altura y lámparas ultravioleta con elemento electrocutante).
- Limitación de la entrada de personas a lo estrictamente indispensable, implementando el uso, en grado progresivo, de trampas con desinfectante para calzado, cambio de calzado, vestimenta de ropa exterior sanitizada, ducha y uso de uniforme estéril, incluyendo mascararas, gorro y guantes.
- Equipos de desinfección o esterilización (tanques o maquinas de lavado, hervidores, cámaras de vapor fluente, sistemas de sanitización de agua filtración, cloración, acidificación, etc., estufas de esterilización, autoclaves, cámara de esterilización con acido peracético, salidas por túneles provistos de lámparas ultravioleta o de sistema de fumigación).
- Uso de insecticidas y desinfectantes adecuados por métodos valida dos.
- Cuarentena y monitoreo de todos los animales que llegan del exterior.
- Monitoreo rutinario del personal y de los animales para identificar portadores de patógenos indeseables.
- Adiestramiento del personal auxiliar, técnico y profesional en el cumplimiento de las rutinas y procedimientos y en la utilización correcta de las barreras físicas. (83)

1.4.4.EL BIENESTAR ANIMAL COMO REQUISITO DE CALIDAD

En la actualidad se da gran importancia al ambiente del albergue del animal experimental, puesto que afecta los resultados del proceso investigativo, aspectos técnicos, éticos y

debe ser documentado en el diseño experimental. La preocupación por el mejoramiento y adecuación de los ambientes ha llegado incluso hasta postular "ambientes enriquecidos" que favorezcan la recreación y desarrollo lúdico. (10)

Las razones para ello no son solamente humanitarias sino científicas o técnicas: mantener un modelo animal estable promueve la adecuada respuesta al estímulo o interrogante experimental. En todos los contextos hay una correlación positiva entre lo humanitario y la eficiencia científica. Está comprobado que los animales estresados no se constituyen en unos buenos sujetos de investigación. (10)

CATEGORIZACIÓN DE MOLESTIAS

Con el fin de poder proceder a la aplicación de principios universales para el buen manejo de los animales de laboratorio se han establecido categorías para clasificar las molestias que se pueden generar durante la fase de experimentación. Como se muestra en la Tabla N° 6.

TABLA N°6 CATEGORIZACIÓN DE MOLESTIAS PERMITIDAS

Molestias menores	Molestias moderadas	Molestias severas
<ul style="list-style-type: none">- Toma de muestra de sangre.- Examen rectal.- Toma de muestra de flujo vaginal.- Administración forzada de sustancias inocuas. Experimentos terminales bajo anestesia.- Vacunas coadyuvantes. Toma de radiografías en animales no anestesiados.	<ul style="list-style-type: none">- Toma frecuente de muestras de sangre.- Prueba de pirógenos.- Cateterización y canulación.- Uso de yesos o inmovilización.- Cesárea.- Recuperación de anestesia general.- Inmunización sin adyuvantes completos.- Trasplantes de piel.	<ul style="list-style-type: none">- Extracción de fluido ascítico. Sangría total sin anestesia previa.- Inducción de defectos genéticos.- Privación prolongada de comida, agua o suero.- Pruebas de dosis letal 50 y concentración letal 50.- Inmovilización con relajantes sin sedación.- Inducción de infecciones experimentales.

Fuente: Principios de la Ética Biomédica 1999

1.5. BIOTERIO E INSTALACIONES

Bioterio es un lugar compuesto generalmente de múltiples jaulas, donde se ingresa a un animal para su estudio, con un procedimiento previo adecuado como etiquetado, fichado, etc. Etimológicamente la palabra Bioterio proviene de del griego Bio: vida y de terio: que expresa una idea de lugar. (98)

El bioterio es el lugar físico donde se crían, mantienen y/o utilizan animales de laboratorio. Este lugar debe brindar un adecuado macroambiente y microambiente, acorde a la especie animal que se esté alojando. Ya que no todos los animales requieren las mismas condiciones.

El bioterio es el lugar donde se alojan animales que cuentan con una calidad genética y microbiológica definida. Dichos animales son reactivos biológicos generalmente utilizados en investigación o para producción. El bioterio debe contar con un ambiente estandarizado, lo que significa que se controla la calidad y cantidad de luz, las renovaciones de aire por hora, la temperatura y la humedad entre otros factores, y estos serán acordes a las necesidades de la especie que allí se aloje. El agua, el alimento, el lecho, las jaulas y todo el material que entre en contacto con los animales reciben un tratamiento especial, sobre todo si se trata de animales inmunodeficientes. (65)

ADMINISTRACIÓN

La estructura administrativa es una parte fundamental del Bioterio ya que de esta instancia depende la regulación, control y normalización de la legislación interna que lleva las directrices del funcionamiento. El personal involucrado en el mantenimiento y manejo de los animales deberá ser personal entrenado y calificado, para poder conocer las necesidades específicas de la especie con la que se va a trabajar. (79)

Para una administración efectiva es necesaria la creación de un Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. (CICUAL)

Cuando una institución utiliza animales para la investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, se debe conformar un

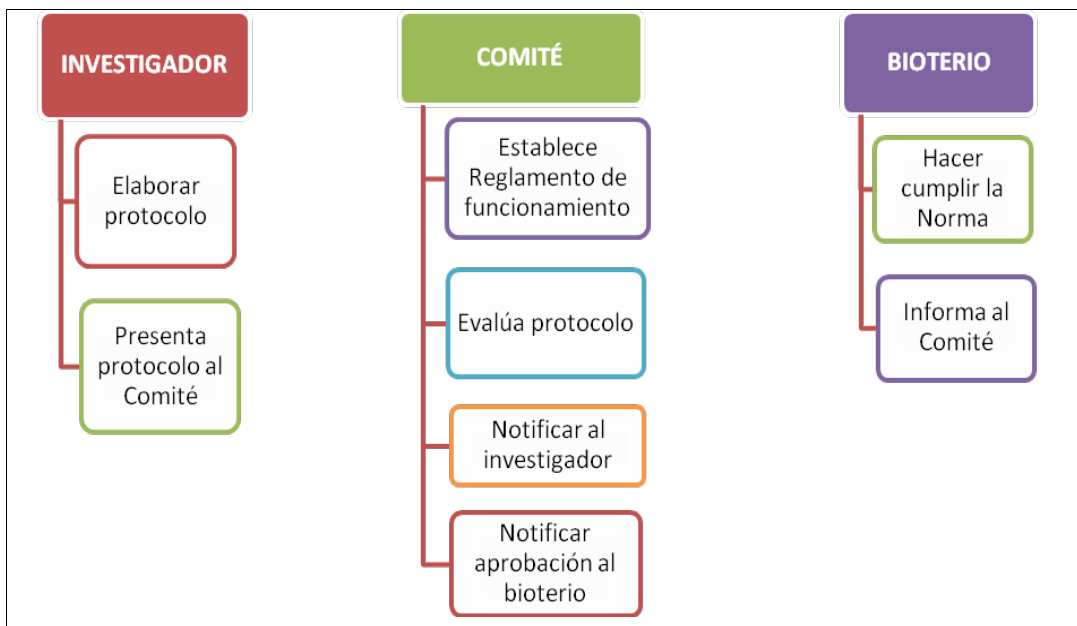
Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de carácter institucional. El mismo que se explica en la Figura N° 1.

La responsabilidad de la creación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio recae sobre el director o titular respectivo de la institución involucrada. (99)

Los miembros del Comité deben incluir:

- Un Médico Veterinario titulado con experiencia comprobable en la medicina y ciencia de los animales de laboratorio.
- Un investigador de alta jerarquía de la propia institución con experiencia comprobable en el manejo de animales de laboratorio.
- Otras personas de acuerdo con las necesidades propias de la institución.

La función principal del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio es la de asegurar la existencia de un mecanismo institucional encargado de revisar que el cuidado y uso de los animales de laboratorio con propósitos de investigación, pruebas y/o enseñanza, sea de manera apropiada y humanitaria. (99)



FUENTE: Ciencia y Tecnología en experimentación animal México 2001

FIGURAS N°1 FUNCIONAMIENTO DEL CICUAL

Serán atribuciones del Comité las siguientes:

- Debe reunirse regularmente y realizar un informe anual acerca del estado que guarda el cuidado y uso de los animales de laboratorio en su institución mismo que entregará tanto a las autoridades de la Secretaría como a las propias de la institución.
- Verificar las normas y guías establecidas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio según sus propias necesidades institucionales.
- Evaluar y aprobar los protocolos de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas y enseñanza, que impliquen el uso de animales.
- Tener autoridad para detener procedimientos relacionados con el uso de los animales, si no cumple con el procedimiento aprobado por el Comité y someter a eutanasia a aquellos animales en los que el dolor/sufrimiento no puede ser aliviado. (99)

1.5.1. DISEÑO DEL BIOTERIO

El diseño de los bioterios o sitios donde se cuida y usa el animal como modelo de experimentación requiere condiciones mínimas adecuadas para su desarrollo. Como se muestra en la Figura N° 2. A continuación, describiremos de manera concisa los espacios mínimos que debe tener cada uno de estos sitios. (15)

RECEPCIÓN

Debe ser un espacio independiente del resto de las áreas de animales y estar destinado a dar alojamiento a aquellos sujetos de nueva adquisición, evitando así su contacto con los de colonias ya establecidas y la posible transmisión de enfermedades. Sus dimensiones deben ajustarse a las acciones inherentes al manejo, acomodo y control de los sujetos involucrados, así como permitir una operación higiénica e independiente para cada especie animal empleada, de acuerdo con el criterio veterinario. (66)

CUARENTENA Y ACONDICIONAMIENTO

El bioterio debe contar con un sector específico e independiente para este propósito. Sus dimensiones dependerán de la cantidad de animales adquiridos de fuentes externas. Debe permitir la separación física de especies y la realización de evaluaciones y tratamientos, indispensables para favorecer un periodo de acondicionamiento óptimo en los animales, durante el cual se estabilizan y familiarizan con sus nuevas instalaciones, previo a su uso experimental. (66)

ÁREAS DE PRODUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES

Cualquier área destinada a la manutención de animales de laboratorio por 24 horas o más, debe considerarse como área de alojamiento. Las diferentes especies deben ser alojadas en zonas independientes, de acuerdo con los proyectos de investigación y el propósito experimental o reproductivo al cual estén sujetos.

Debe proveerse espacio suficiente durante etapas críticas como la gestación y la lactancia, para que los animales se reproduzcan y se mantengan en condiciones apropiadas. (66)

ÁREA PARA PROCEDIMIENTOS

Dependiendo de la orientación del programa de trabajo del bioterio, este debe contar con un cuarto de procedimientos diversos para la manipulación experimental de animales, sus tratamientos, recolección de fluidos corporales, identificación, preparación quirúrgica u otros. Esta área permite el trabajo con animales de un grupo mientras el resto de la camada o compañeros no se excitan frente al procedimiento. (66)

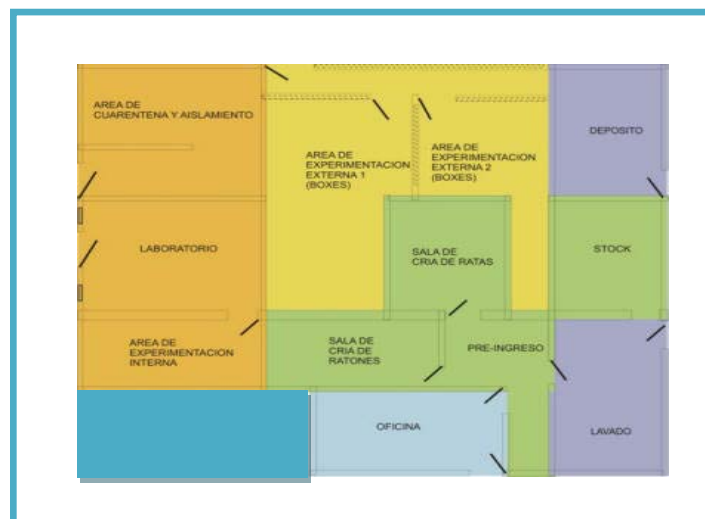
ÁREA DE CIRUGÍA

Es un sector del bioterio destinado y equipado de acuerdo con el desarrollo de procedimientos experimentales, analíticos o de enseñanza e investigación que requieran el empleo de técnicas quirúrgicas en condiciones asépticas. Sus dimensiones y equipamiento

responden a las necesidades de las especies animales mantenidas por la institución, de conformidad con el criterio veterinario. (66)

ÁREA DE RECUPERACIÓN

Destinada y equipada de acuerdo con las necesidades de atención de animales sometidos a procedimientos invasivos. Su diseño, dimensiones y equipamiento responden a las necesidades de las especies animales de la institución, de conformidad con el criterio veterinario. Es un área destinada a la estabilización física y emocional del animal, previa al reingreso a su jaula de mantenimiento después de un procedimiento quirúrgico. (66)



Fuente: Universidad del Litoral. Argentina <http://www.fcv.unlp.edu.ar.html>

FIGURA N° 2 DISEÑO BIOTERIO

1.5.2. MEDIO AMBIENTE

Para mantener la salud del animal de experimentación y evitar errores en los resultados experimentales, se hace necesario un ambiente controlado y confortable; sin embargo la posibilidad de controlar todas las variables para un mantenimiento óptimo es mínima, ya que es evidente que el requerimiento del ambiente puede variar con las especies y los propósitos para los cuales los animales están siendo usados, o sea, según el protocolo experimental.

En toda investigación es de gran interés minimizar las variables ambientales, las cuales son conocidas como importantes. En la estandarización y control de los factores ambientales que afectan los animales de laboratorio existen dos factores específicos:

- El Macroambiente (Cuarto o local)
- El Microambiente (Cajas) (14)

1.5.3. MACROAMBIENTE

TEMPERATURA Y HUMEDAD

El mantenimiento de la temperatura corporal dentro de los límites de la variación normal es esencial para el bienestar de los ratones. Generalmente la exposición de los animales no adaptados a temperaturas superiores a los 29.4°C o por debajo de 4.4° C, sin que tengan acceso a protección en un refugio u otro mecanismo, pueden producir efectos clínicos que pueden poner en peligro la vida. Los animales se pueden adaptar a condiciones extremas mediante mecanismos morfológicos, fisiológicos y de conducta, pero tales adaptaciones llevan tiempo y pueden alterar los resultados experimentales o afectar los rendimientos. (56)

Algunas situaciones pueden requerir temperaturas ambientales más altas, tales como la recuperación post-operatoria, el hospedaje de roedores sin pelo y de neonatos que han sido separados de sus madres. La magnitud del incremento de temperatura depende de las circunstancias del alojamiento, algunas veces es suficiente elevar la temperatura en el encierro primario en vez de elevarla en el encierro secundario. (58)

Debido a la carencia de estudios bien controlados, las temperaturas de bulbo seco recomendadas para varias especies animales están basadas en el criterio profesional y la experiencia. En el caso de animales en espacios confinados, se debe mantener al mínimo el rango de flujo diario de la temperatura, para evitar grandes demandas repetidas de los procesos metabólicos y de conducta, necesarias para compensar los cambios térmicos en el medio ambiente. La humedad relativa también se debe controlar, pero no tan estrechamente como la temperatura; el rango aceptable de humedad relativa es de 30 a 70%. (2)

VENTILACIÓN

Los propósitos de la ventilación son: suministrar oxígeno adecuadamente, eliminar la carga térmica producto de la respiración animal, la iluminación y los aparatos; diluir los gases y partículas contaminantes, ajustar el contenido de humedad del aire del cuarto, y en donde sea apropiado crear diferencia de presión de aire entre espacios adyacentes. Sin embargo, el establecer un índice de ventilación en el cuarto no asegura la adecuación de la ventilación en el encierro primario del animal y por lo tanto no garantiza la calidad del microambiente. (82)

El grado de movimiento del aire o corriente de aire (chiflón) causa incomodidad y consecuencias biológicas, que en la mayoría de las especies, aun no han sido establecidas. El tipo y la localización de los difusores del suministro de aire, las ventanillas de salida del mismo y su interrelación con el número, localización, disposición y tipo de encierro primario en el cuarto u otro encierro secundario, afecta la eficiencia de la ventilación del encierro primario y por lo tanto deben tomarse en consideración. (82)

Durante muchos años se ha usado la recomendación de 10 a 15 cambios por hora del volumen total de aire del encierro secundario y aún se considera un estándar general aceptable. (86)

La ventilación de los cuartos con aire reciclado ahorra cantidades considerables de energía pero conlleva algún riesgo. Muchos patógenos de los animales están contenidos en el aire o viajan en fómites, tales como el polvo, por lo tanto reciclar el aire de salida en los sistemas de Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado (HVAC por sus siglas en inglés) que dan servicio a muchos cuartos, presenta el riesgo de contaminación cruzada. Antes de reciclar el aire de salida, debe someterse a filtros de partículas de alta eficacia (HEPA por sus siglas en inglés), para eliminar las partículas contenidas en el aire; el grado y la eficacia de la filtración deben ser proporcionales al riesgo estimado. Los filtros HEPA están disponibles con varias eficacias de filtración, que pueden seleccionarse de acuerdo a la magnitud del riesgo. (2)

En caso de que existan gases tóxicos o los que causan olores como el amoníaco puede ser eficaz el tratamiento del aire reciclado para eliminar estas sustancias mediante la

absorción química o la extracción; sin embargo, es preferible el uso de aire no reciclado para ventilar las áreas de ocupación y de utilización animal. Se puede usar aire reciclado y filtrado con filtros HEPA, sin filtración de los gases (ej. con filtros de carbón activado) pero sus aplicaciones son limitadas y solamente en caso de:

- El aire del cuarto se mezcla con por lo menos 50% de aire nuevo (esto significa que el suministro total de aire no exceda el 50% con aire reciclado)
- Las prácticas de atención a los animales tales como el cambio de material de lecho, la frecuencia del lavado de jaula y la preparación del aire reciclado sean suficientes para disminuir al mínimo los gases tóxicos y los olores
- El aire reciclado sea acondicionado apropiadamente y mezclado con suficiente aire nuevo para cumplir con los requerimientos de temperatura y humedad de los animales en ese espacio.

El tratamiento del aire reciclado tanto para eliminar partículas así como contaminantes gaseosos es caro y puede resultar ineficiente si no se le da un mantenimiento suficiente y apropiado a los sistemas de filtración. Estos sistemas deben ser mantenidos debidamente y verificados para mantener al máximo su efectividad. Para que la operación de cualquier sistema de Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado (HVAC) sea exitosa se requiere mantenimiento y evaluación regulares, incluyendo la evaluación de su funcionamiento a nivel del encierro secundario; estas evaluaciones deben incluir el volumen de entrada y salida de aire y cuando sea aplicable los diferenciales de presión estática. (2)

ILUMINACIÓN

La luz puede afectar la morfología, fisiología y conducta de los animales. Los fotoestresores potenciales son: fotoperiodo, fotointensidad y calidad espectral de la luz inapropiados, al establecer los niveles de iluminación apropiados para los cuartos de ocupación animal, se deben considerar numerosos factores que puedan afectar las necesidades que tienen los animales; entre estos se incluyen la intensidad de la luz; la duración de la exposición, la longitud de onda, la exposición previa, la pigmentación del animal, las horas de exposición en relación al ciclo circadiano, la temperatura corporal, el status hormonal, la edad, especie, sexo, variedad o linaje del animal. (2)

En general, la luz debe difundirse a través de las áreas de alojamiento animal y brindar suficiente iluminación para el bienestar de los animales y para permitir las buenas prácticas de su atención, inspección adecuada, incluyendo las jaulas colocadas en el entrepaño más inferior del estante; y de las condiciones de trabajo seguras para el personal. La luz en los cuartos de los animales debe ser suficiente para una visión adecuada y para la regulación neuroendócrina de los ciclos circadianos y diurnos. (94)

Los ratones son nocturnos. Debido a que la rata albina es más susceptible a la retinopatía fototóxica que otras especies se le ha utilizado como referencia para establecer los niveles de iluminación de los cuartos. Parece ser que niveles de luz de aproximadamente 325 luxes (30 bujías pie) a 1 m. aproximadamente (3.3 pies) del piso son suficientes para el cuidado de los animales, sin causar signos clínicos de retinopatía fototóxica en ratas albinas y se ha encontrado que niveles superiores a 400 luxes (37 bujías pie) medidas en un cuarto vacío a 1 metro del piso son satisfactorios para los roedores siempre y cuando se sigan prácticas de manejo que eviten daño retinal en animales albinos. Sin embargo, la experiencia previa del individuo puede afectar su sensibilidad a la fototoxicidad; se ha reportado que de acuerdo a evidencias histológicas, morfométricas y electrofisiológicas, la luz de 130-270 luxes por encima de la intensidad en que ha sido criado es cercana al umbral de daño retinal en algunas ratas albinas. (84)

Algunas guías recomiendan una intensidad de luz tan baja como 40 luxes medidos a nivel de una caja intermedia del estante. Los ratones jóvenes albinos y pigmentados, prefieren iluminaciones mucho más bajas que los adultos, aún cuando la mayoría de las veces el potencial daño retinal asociado con el alojamiento de estos roedores en niveles de luz más altos es reversible.

Por lo tanto, la intensidad de luz a nivel de la jaula, para animales que han mostrado ser susceptibles a la retinopatía fototóxica, debe ser entre 130 y 325 luxes. (21)

RUIDO

El ruido que producen los animales y las actividades de cuidado son inherentes a la operación de un bioterio. Por lo tanto, el control del ruido se debe considerar en el diseño y operación de las instalaciones. La evaluación de los efectos potenciales del ruido sobre los

animales justifica la consideración de la intensidad, frecuencia, rapidez de inicio, duración y vibración potencial del sonido y el rango de audición, historia de la exposición al ruido y susceptibilidad a su efecto de la especie, tipo o subtipo. (94)

La separación de las áreas de ocupación humana y animal reduce al mínimo las molestias a ambos ocupantes de las instalaciones. La exposición a sonidos más altos de 85 dB puede tener tanto efectos auditivos como no auditivos, que incluyen eosinopenia y aumento del peso de las adrenales y disminución de la fertilidad en roedores. Los ratones pueden oír frecuencias de sonidos que son inaudibles para los seres humanos, por eso se deben considerar cuidadosamente los efectos potenciales de equipo y materiales que producen ruido en el rango de audición de los animales cercanos.

Las actividades que puedan ser ruidosas deben realizarse, en la medida de lo posible, en cuartos o áreas separadas de las de alojamiento y uso de los animales. No se deben usar radares, alarmas y otros generadores de sonidos en los cuartos de los animales, a menos que sean parte de un protocolo aprobado o de un programa de enriquecimiento del medio ambiente. (21)

Los rangos recomendados de los factores macroambientales para ratones *Mus musculus*, podemos verlos en la Tabla N° 7.

TABLA N° 7 FACTORES MACROAMBIENTALES RECOMENDADOS PARA RATÓN *Mus musculus*

PARÁMETRO	RANGO RECOMENDADO
Humedad Relativa	30 a 70%
Temperatura de bulbo Seco °C	18-26
Cambios/h del Volumen Total	10 a 15
Intensidad de luz(lux)	130 a 270 joven 130 a 325 adulto
Intensidad de ruido (dB)	50 a 70

Fuente: Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación (CCAC)

1.5.4. MICROAMBIENTE

RECOMENDACIONES DE ESPACIO

La necesidad de espacio para los animales es un asunto complejo y considerar únicamente su peso o superficie corporal es insuficiente. Por esta razón, las recomendaciones de espacio que se presentan aquí están basadas en el juicio profesional y la experiencia. Estos espacios deben considerarse como recomendaciones de los tamaños apropiados de jaula para los animales alojados bajo las condiciones encontradas comúnmente en las instalaciones para hospedar animales de laboratorio (76).

La asignación de espacios se debe revisar y en caso necesario modificar para resolver las situaciones individuales de alojamiento y satisfacer las necesidades de los animales. Para valorar la adecuación del hospedaje se pueden usar índices del rendimiento animal, tales como: salud, reproducción, crecimiento, conducta, actividad y utilización del espacio. El requerimiento mínimo es que el animal disponga de espacio suficiente para voltearse y para expresar los acomodos posturales normales. (77)

La necesidad de espacio que ofrezcan los encierros primarios, deben ser aprobados a nivel institucional por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. La evaluación de las necesidades de espacio de los animales debe ser un proceso continuo. En la Tabla N°8 se describe el espacio necesario según el peso corporal de la animal. (17)

TABLA N°8 ESPACIO RECOMENDADO PARA RATONES

Animales	Peso Corporal (g)	Área de Piso/Animal (cm²)	Altura ^a cm
Ratones	<10	38.71	12.7
	Hasta 15	51.61	12.7
	Hasta 25	77.42	12.7
	>25 ^b	96.77	12.7

Fuente: Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación (CCAC)

a. De piso a techo de la jaula.

b. Los animales más grandes pueden requerir más espacio para satisfacer los estándares de rendimiento.

JAULAS

El encierro primario en una jaula, constituye los límites del ambiente inmediato del animal.

Los encierros primarios aceptables permiten:

- Satisfacer las necesidades fisiológicas y de conducta de los animales incluyendo la micción y la defecación, el mantenimiento de la temperatura corporal, los movimientos normales y postura, y cuando esté indicado la reproducción.
- Las interacciones sociales entre individuos de la misma especie y el establecimiento de jerarquía dentro del encierro o entre encierros.
- Que los animales permanezcan limpios y secos.
- Una ventilación adecuada.
- El acceso de los animales al agua y alimento, y también brindar facilidades para el llenado, relleno, cambio, servicio y limpieza de los utensilios con los cuales se proporcione el agua y el alimento.
- Tener un medio ambiente seguro, que impida el escape de los animales o el entrapamiento de sus apéndices entre superficies opuestas o en aberturas estructurales.
- La ausencia de bordes cortantes o proyecciones que puedan causar lesiones a los animales.
- Permitir la observación de los animales con la mínima molestia para ellos.

Los encierros primarios deben construirse con materiales que equilibren las necesidades del animal con la facilidad para llevar a cabo la sanidad. Deben tener superficies lisas, impermeables, con el mínimo de rebordes o sobresalientes, ángulos, esquinas y superficies que se traslapen, de tal manera que la acumulación de suciedad, desechos y humedad se reduzcan y sea posible una limpieza y desinfección satisfactoria. Deben estar contruidos con materiales durables que resistan la corrosión y que soporten la manipulación ruda sin desportillarse, cuartearse u oxidarse. (14)

Todos los encierros primarios deben mantenerse en buenas condiciones de uso para evitar los escapes o las lesiones en los animales, promover la comodidad física y facilitar la sanidad y el servicio. El equipo oxidado o enmohecido que amenace la sanidad o seguridad de los animales debe ser reparado o reemplazado.

Algunos sistemas de alojamiento tienen equipos de ventilación y jaulas especiales, incluyendo filtros encima de las jaulas, jaulas ventiladas, aisladores y cubículos. Por lo general, el propósito de estos sistemas es minimizar la diseminación de los agentes causales de enfermedades, transmitidos por el aire entre jaulas o grupos de jaulas. Estos a menudo requieren prácticas de manejo diferentes, tales como, alteración de la frecuencia del cambio de lecho, el uso de técnicas asépticas de manipulación y regímenes de limpieza, desinfección o esterilización especializada, para evitar la transmisión microbiana por otras rutas diferentes a la aérea. Se recomiendan las jaulas de piso sólido con lecho para los roedores. (14)

LECHO

El material de cama de los animales es un factor controlable del medio ambiente, que puede influir en su bienestar y en los resultados experimentales. Ningún lecho es ideal para ninguna especie en particular bajo todas las condiciones de manejo y experimentales y ninguna es ideal para todas las especies. Varios autores han descrito las características deseables del lecho y los medios para evaluarlo. Se han utilizado camas de maderas blandas, aunque el uso de madera blanda picada o de sus virutas, sin tratamiento, está contraindicado en algunos protocolos, debido a que puede afectar el metabolismo animal. No se recomiendan las virutas de cedro porque emiten hidrocarburos aromáticos inductores de las enzimas microsomas hepáticas y citotoxicidad y se ha reportado que aumentan la incidencia de cáncer. Para reducir la concentración de hidrocarburos aromáticos y poder prevenir este problema se ha usado el tratamiento con calor, aplicado a este material previo a su utilización. Al comprar los materiales de lecho se deben examinar los métodos de manufactura, control de calidad y almacenamiento seguido por los fabricantes. (76)

El lecho no se debe colocar sobre el piso durante el transporte y almacenamiento sino en tarimas, estantes o carros, de tal manera que se preserve su calidad y se reduzca al mínimo la contaminación. Durante la esterilización en autoclave la cama puede absorber humedad, resultando en una menor capacidad de absorción y favoreciendo el crecimiento de microorganismos; por lo tanto, se deben dar los tiempos de secado y las condiciones de almacenaje apropiadas. Entre las características principales de un lecho se considera:

- Absorbe la humedad
- Exenta de polvo
- No permite el crecimiento bacteriano
- No comestible
- No mancha
- No ocasiona traumatismos
- Fija el amoníaco
- Se puede esterilizar
- No forma productos indeseables después de la esterilización
- Fácil de almacenar. No es desecante para los animales
- No contaminada. No tóxica. Químicamente estable a lo largo del uso
- No nutritiva
- Desagradable al gusto, difícil de masticar o de guardar en la boca
- No maloliente
- Apropia para la nidación
- Apropia a la incineración
- Fácil de obtener. Relativamente barata
- Resistente al fuego
- Uniformidad entre los lotes
- Optimiza el comportamiento normal
- No es perjudicial para los lavajaulas
- No presenta peligro o riesgos para el personal. (22)

AGUA

Diariamente, los animales deben tener acceso a agua potable no contaminada y de acuerdo a sus necesidades particulares. La calidad y definición de agua potable puede variar según la localidad. Puede ser necesaria la determinación periódica del pH, dureza y contaminación química y microbiológica para asegurar que la calidad del agua es aceptable, especialmente si los componentes normales del agua de una localidad dada pueden influir en los resultados del estudio en que se use esa agua. (91)

Cuando los protocolos experimentales requieren agua altamente pura, se le puede tratar o purificar para eliminar o reducir al mínimo la contaminación. Se debe considerar cuidadosamente la selección del tratamiento del agua porque muchas de ellas tienen el potencial de causar alteraciones fisiológicas, cambiar la microflora o alterar los resultados experimentales.

Los parámetros bacteriológicos requeridos para la aceptación de agua potable se describen en la Tabla N° 9, los parámetros físicos se encuentran en la Tabla N° 10.

Los utensilios para dar de beber, tales como las pipetas de los bebederos y las válvulas automáticas, se deben revisar diariamente para verificar un adecuado mantenimiento, limpieza y operación. En ocasiones, los animales tienen que ser entrenados a utilizar los componentes de los sistemas de provisión automática. Es mejor cambiar bebederos que rellenarlos, debido a la potencial contaminación microbiológica cruzada; pero en caso de rellenar bebederos se debe tener cuidado de regresarlos a la misma jaula de donde fueron tomados. (22)

TABLA N° 9 PARÁMETROS BACTERIOLÓGICOS PARA AGUA POTABLE

MICROORGANISMO	LÍMITE PERMISIBLE
Bacterias Aerobias mesófilas	Máximo 30 UFC / mL de muestra
Coliformes totales	2 NMP en 100mL de muestra
Escherichia Coli	0 NMP en 100mL de muestra

Fuente: Guías OMS 2005

TABLA N° 10 PARÁMETROS FÍSICOS PARA AGUA POTABLE

PARÁMETROS FÍSICOS	CONCENTRACIONES MÁXIMAS PERMITIDAS	CARACTERÍSTICAS
Color	15 UCV ^a	Apariencia
Sabor y Olor	-	Deben ser aceptables
Temperatura	-	Debe ser aceptable
Turbiedad	5 UNT ^b	Apariencia; para que la desinfección final sea eficaz, mediana de la turbiedad ≤ 1UNT, muestra única ≤ 5 UNT
COMPONENTES INORGÁNICOS		
pH	6.5 - 9.5	pH bajo: corrosión pH alto: sabor, sensación jabonosa preferiblemente < 8.0 para que la desinfección con cloro sea eficaz

Fuente: Guías OMS 2005

a Unidad de color verdadero.

b Unidad nefelometría de turbiedad.

ALIMENTO

Los animales deben ser alimentados con dietas apetitosas, no-contaminadas y nutricionalmente adecuados, diariamente o de acuerdo a sus requerimientos particulares, a menos que el protocolo en el que están siendo empleados lo demande de otra manera. Los subcomités de nutrición del *National Research Council Committee* han preparado documentos completos acerca de los requerimientos nutricionales de los animales de laboratorio (92)

Los gerentes de las colonias de animales deben emplear su buen juicio al comprar, transportar, almacenar y manipular los alimentos para reducir al mínimo la introducción de enfermedades, parásitos y vectores potenciales de enfermedades y contaminantes químicos a las colonias animales. Se aconseja a los encargados de compras examinar a los fabricantes, sus prácticas y procedimientos de provisión para proteger y asegurar la calidad del alimento (Ej. almacenaje, control de plagas y procedimiento de manipulación). Las instituciones deben exigir a los fabricantes de alimentos que presenten periódicamente los resultados de los análisis del contenido de nutrientes críticos de las dietas. El usuario debe conocer la fecha de fabricación y otros factores que afecten la vida media de almacenamiento del alimento. (34)

Las áreas en las cuales se almacenan o procesan los ingredientes de las dietas deben mantenerse limpias y cerradas para evitar la entrada de plagas. El alimento no debe almacenarse en el piso sino en tarimas, estantes o carros. Los sacos abiertos, en tanto no se usen, deben guardarse en envases a prueba de plagas para reducir al mínimo la contaminación y para evitar la diseminación de enfermedades potenciales. La exposición a temperaturas superiores a los 21° C (70° F), humedades relativas extremas, condiciones malsanas, luz, oxígeno, insectos y otras plagas, acelera el deterioro del alimento. (90)

Los requerimientos nutricionales para ratones *Mus musculus* adultos jóvenes, se muestran más específicamente en la Tabla N°11 descrita posteriormente.

TABLA N° 11 PARÁMETROS NUTRICIONALES^a

ESPECIE	CONSUMO DIARIO DE AGUA	EXCRECIÓN DIARIA DE ORINA	ALIMENTACIÓN/ DÍA	PROTEÍNAS DIGESTIBLES ^b %
RATÓN	3-7 mL	1-3 mL	3-6 g	12

Fuente: Consejo Nacional de Investigación NRC Canadá 1995

- a. Los valores promedios y rangos tomados de la literatura corresponden a valores medios para animales adultos jóvenes.
- b. Refiere a proteínas ideales o digestibles requeridas; los niveles de proteínas brutas (PB) pueden ser considerablemente más altos.

La mayoría de las dietas secas para animales hechas a base de ingredientes naturales y que contienen conservadores se pueden usar hasta seis meses después de su fabricación, siempre y cuando las condiciones de almacenaje hayan sido apropiadas. Sin embargo, la vitamina C en los alimentos industrializados por lo general solo tienen una vida de almacenamiento de tres meses, el uso de formas estabilizadas de vitamina C puede extenderla. En caso de que se tenga que alimentar a los animales con una dieta que contiene vitamina C caducada, será necesario suplementar adecuadamente con esa vitamina. Con frecuencia las dietas purificadas y las químicamente definidas son menos estables que las dietas a base de ingredientes naturales y su vida de almacenamiento generalmente son menores a seis meses; estas dietas deben almacenarse a temperatura de 4° C o más baja. (33)

Las raciones de nutrientes en ratones *Mus musculus* suele variar según la edad y peso corporal, sin embargo el Consejo Nacional de Investigación de Canadá de 1995 nos sugiere un rango específico por cada nutriente en la Tabla N°12.

TABLA N° 12 RACIONES DE NUTRIENTES RECOMENDADAS

PARÁMETRO	REQUERIMIENTO
Proteína Cruda %	17-24
Grasa cruda %	4-11
Fibra Cruda %	3-6
Ceniza %	5-7

Fuente: Consejo Nacional de Investigación NRC Canadá 1995

1.5.5. CONTROL DE PLAGAS

Son esenciales los programas para prevenir, controlar o eliminar la presencia de, o la infestación de plagas. Se debe implementar un programa de control y aseguramiento regular, calendarizado y documentado, el programa ideal previene la entrada y elimina la colonización de las plagas en las instalaciones.

El uso de pesticidas pueden inducir efectos tóxicos en los animales experimentales e interferir con los resultados de la investigación y por lo tanto su uso en estas áreas debe limitarse a lo indispensable. Antes de usar pesticidas, se debe consultar con los investigadores cuyos animales puedan estar expuestos a ellos. Siempre que sea posible se deben emplear medios no-tóxicos para el control de plagas, tales como, los reguladores del crecimiento de insectos. (101)

Una parte del plan general de seguridad de la casa de los animales debe contemplar un plan en caso de desastres, que considere tanto al personal como a los animales. El director del bioterio deben ser miembros del comité institucional de seguridad y debe participar en la respuesta en caso de catástrofe. (19)

1.5.6. ELIMINACIÓN DE DESECHOS

Los desechos convencionales, biológicos y peligrosos deben ser removidos y eliminados en forma regular y segura. Existen varias opciones para una eficaz eliminación de los desechos. Se puede garantizar la seguridad y el cumplimiento de las regulaciones a través de la firma de contratos con empresas especializadas y autorizadas. La incineración de los desechos en el lugar donde se originan debe cumplir con las regulaciones federales, estatales y municipales. (69)

Debe haber botes de basura en número suficiente y correctamente identificados, distribuidos estratégicamente en todas las casas de los animales. Los contenedores de desechos deben ser a prueba de fugas y estar equipados con tapas que cierren herméticamente. Es una buena práctica usar bolsas interiores en los contenedores de basura y además lavarlos con regularidad.

En caso de almacenar en frío el material antes de su eliminación, las áreas deben estar separadas de otras áreas de almacén. Es esencial contar con un almacén refrigerado, separado de otros refrigeradores, para almacenar los animales muertos y los desechos de tejidos animales, este espacio de almacenamiento debe mantenerse por debajo de 7° C para reducir el proceso de putrefacción de los desechos y cadáveres. Además debe llevar el rotularlo correctamente. (83)

Los desechos peligrosos deben hacerse seguros antes de ser removidos de las instalaciones mediante la esterilización, el aislamiento u otro medio apropiado. El cumplimiento de las regulaciones relativas al uso y disposición de los agentes peligrosos, es responsabilidad de la institución. Los cadáveres de animales infectados pueden ser incinerados en el sitio de origen o bien acopiados por un contratista autorizado. Los procedimientos institucionales de empaque, etiquetado, traslado y almacenamiento de estos desechos deben integrarse a las políticas de salud y seguridad ocupacional.

Los desechos peligrosos que sean tóxicos, cancerígenos, inflamables, corrosivos, o de alguna otra manera inestable, deben colocarse en recipientes identificados correctamente y eliminarse conforme a la recomendación del especialista en seguridad y salud ocupacional. En algunas circunstancias estos desechos pueden mezclarse o comprimirse. (25)

1.5.7.CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD

Por motivos de seguridad, los animales deben estar alojados en un local independiente, separado del laboratorio. Si se trata de un local contiguo, deberá estar construido de tal modo que sea posible aislarlo de las partes públicas del laboratorio en caso de necesidad, así como para las operaciones de descontaminación y desinfección. Cuando hablamos de bioseguridad es necesario hacer referencia a los peligros relativos que entrañan los microorganismos infecciosos, clasificados por grupos de riesgo (grupos de riesgo 1, 2, 3 y 4 (OMS). Esta clasificación por grupos de riesgo se utilizará exclusivamente para el trabajo de laboratorio. (83) En la Tabla N° 13 se resume esta información.

**TABLA N° 13 CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS INFECCIOSOS
POR GRUPOS DE RIESGO**

Grupo de riesgo 1 (<i>riesgo individual y poblacional escaso o nulo</i>)	Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
Grupo de riesgo 2 (<i>riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo</i>)	Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.
Grupo de riesgo 3 (<i>riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo</i>)	Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.
Grupo de riesgo 4 (<i>riesgo individual y poblacional elevado</i>)	Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Fuente: Manual de bioseguridad en el laboratorio OMS 2005

En lo que respecta a los agentes patógenos que van a utilizarse en el laboratorio de animales, hay que tener en cuenta los siguientes factores:

- La vía normal de transmisión.
- Los volúmenes y las concentraciones que van a manejarse.
- La vía de inoculación.

En cuanto a los animales que van a usarse en el laboratorio, los factores que hay que tener en cuenta son los siguientes:

- El carácter de los animales, es decir, su grado de agresividad y tendencia a morder.
- Sus endoparásitos y ectoparásitos naturales.
- Las zoonosis a las que son susceptibles.
- La posible diseminación de alérgenos.

Como en el caso de los laboratorios, los requisitos relativos a las características de diseño, el equipo y las precauciones son cada vez más estrictos a medida que aumenta el nivel de seguridad. Esos requisitos se describen y se resumen en la Tabla N° 14. Las directrices son acumulativas; es decir, cada nivel incorpora los requisitos de los niveles inferiores. (57)

TABLA N° 14 NIVELES DE CONTENCIÓN DE LOS ANIMALARIOS

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE CONTENCIÓN	PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO Y EQUIPO DE SEGURIDAD
1	NBSA-1	Acceso restringido, ropa y guantes protectores
2	NBSA-2	Procedimientos del NBSA-1, más señales de advertencia del riesgo. CSB de clase I o II para las actividades que producen aerosoles. Descontaminación de desechos y jaulas antes del lavado.
3	NBSA-3	Procedimientos del NBSA-2, más acceso controlado. CSB y ropa protectora especial para todas las actividades.
4	NBSA-4	Procedimientos del NBSA-3, más acceso estrictamente restringido. Muda de ropa antes de entrar. CSB de clase III o trajes de presión positiva. Ducha a la salida. Descontaminación de todos los desechos antes de su salida de las instalaciones.

Fuente: Manual de bioseguridad en el laboratorio OMS 2005

NBSA: Nivel de bioseguridad de las instalaciones para los animales
CSB: Cámaras de seguridad biológica

1.6. ÉTICA Y LEGISLACIÓN

Debido a las voces en contra del sufrimiento innecesario de animales en experimentación, se ha llevado a la agenda, en comunidades locales o en el plano internacional, el análisis de riesgos y ventajas de la investigación científica. Esta actitud es constructiva y contribuye a mejorar el conocimiento de la sociedad sobre las virtudes de la investigación científica y a reducir los riesgos de su aplicación. En el caso de las vivisecciones, en muchos países la actual legislación exige suprimirla de manera total, puesto que el conocimiento actual permite contar con otros modelos para acceder al mismo conocimiento repetitivo y básico. Se ha logrado, además, reducir las practicas de vivisección solo a casos extremos según requerimientos, pero garantizando el trato humanitario al animal sacrificado. (73)

En EE.UU., la Academia Nacional de Ciencias y los Institutos Nacionales de Salud han emitido normas especiales para la investigación en animales, que imponen, por ejemplo, la obligación de demostrar que las instituciones cuentan con las instalaciones adecuadas para el bienestar de los animales. Además, el uso de animales en la investigación está estrictamente controlado y regulado por las leyes federales -incluyendo el Acta del Bienestar de los Animales- que regulan la eliminación y reducción del dolor, así como otros aspectos del cuidado animal, tales como albergue, alimentación, ejercicio, y bienestar psicológico.

Estas normas y prácticas son comunes en todo el mundo; sin embargo, la experimentación con animales no está legislada ni regularizada en muchos países de Latinoamérica. (25)

Hay quienes opinan que se exagera en las atenciones a animales experimentales y que se desvían recursos, muy necesarios, debido al cuidado a los animales, pero no comprenden que se trata de un escenario de investigación que, al igual que otros laboratorios para otro tipo de ensayos, requiere condiciones específicas. No se trata de investigación sobre el comportamiento del animal en su hábitat natural, es investigación sobre reacciones y comportamiento frente a un factor por parte de un organismo completo. Ello exige que se garantice que la respuesta será solo a ese factor y no a otros, medioambientales, que influyan en la respuesta evaluada. Sin embargo, se reconoce que al aumentar su bienestar y mantener condiciones medioambientales estables se obtienen resultados más fiables y se disminuye el número de experimentos necesarios.

Para garantizar el mejor tratamiento posible, cada institución debería establecer un Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), que supervise, examine y vigile cada posible experimento. Estos comités deberían incluir a miembros de la comunidad científica, un bioeticista y un veterinario o experto en animales de experimentación. La responsabilidad más grande de estos comités en los países latinoamericanos es acompañar los proyectos de investigación en la realización de los procedimientos que lo requieran, y garantizar la existencia de programas de formación y entrenamiento adecuados. (87)

El cuidado de los animales deberá tener un capítulo importante en la bioética futura. Si bien una parte del trabajo se hace ahora en preparaciones aisladas, aun es inevitable la

etapa de experimentación animal, reducida en sus dimensiones, enriquecida por cuidados especiales, pero necesaria al fin. De la misma manera en que no se puede evitar la prueba final, en el propio ser humano, con todas las precauciones y el respeto que nos merecen nuestros semejantes. La investigación clínica en voluntarios informados es indispensable antes de poner a disposición de la sociedad toda nueva oferta de progreso en medicina. (37)

1.6.1. ALTERNATIVAS AL USO DE ANIMALES

Desde que el concepto de alternativas fue introducido recibió nombres variados según quienes lo emplearan. Hay quienes lo interpretan como un programa para eliminar totalmente al animal experimental. (8)

El concepto más generalizado actualmente parte de Russel y Burch, quienes definieron ALTERNATIVAS como cualquier técnica que:

- Reemplace el uso de animales
- Reduzca su número en un trabajo en particular
- Refine un método existente para disminuir el dolor o el malestar de los animales

Esto se conoce como el principio de las **3 R's** (Reemplazo, Reducción y Refinamiento). (16)

1.6.2. LEGISLACIÓN COMPARADA

Este tema compete a todos los individuos pero, con mayor razón, a los involucrados en la investigación biológica, desde el técnico auxiliar que está a cargo del cuidado de los animales, hasta el más alto directivo de la institución productora o usuaria de los mismos. La primera condición del investigador que trabaja con animales de laboratorio es el respeto por la vida, por el dolor o el sufrimiento a que estos pueden ser sometidos en los trabajos bajo su responsabilidad. (100)

Siempre que se utilizan animales en investigación habremos de considerar que un objetivo, tan importante como obtener resultados experimentales, será el de minimizar cualquier dolor o angustia que estos puedan sufrir. El refinamiento de los

procedimientos para conseguir que sean más humanos debe ser parte integrante de toda investigación científica. Esto es importante, tanto desde el punto de vista de la preocupación humanitaria como para cumplir con los requisitos de la legislación sobre animales de investigación. (91)

El uso de animales para la investigación científica ha sido objeto de múltiples reglamentaciones, acuerdos, postulados, leyes y consensos, lo que evidencia una preocupación porque se cumplan condiciones básicas de trabajo que promuevan un dialogo de pares en un ambiente de respeto. Se ha reconocido la declaración de los Derechos de los Animales (1978) y los principios éticos internacionales para la investigación biomédica con animales como los soportes mínimos que todo grupo de investigación debe considerar para desarrollar sus actividades. Estos principios también involucran aspectos de uso de animales en enseñanza básica y media. (97)

Gran parte del desarrollo científico y tecnológico en las ciencias biológicas y biomédicas ha sido posible gracias a la utilización de modelos animales experimentales. El uso de animales es un paso imprescindible en la investigación de medicamentos y técnicas terapéuticas antes de su aplicación tanto en la clínica humana como veterinaria. Sin embargo, se deben utilizar métodos alternativos al modelo animal siempre que sea posible.

El uso de animales en investigación debe seguir estrictas normas de conducta, en las cuales prime el respeto por su vida y su integridad, evitando sufrimientos innecesarios. Para ello fueron creados los comités de cuidado y uso de animales de experimentación, quienes adhieren a los principios que rigen su manejo adecuado y velan por la aplicación de dichos principios en las investigaciones. (72)

La primera condición del científico que trabaja con animales de laboratorio es el respeto por la vida, el dolor o el sufrimiento a que éstos pueden ser sometidos en los trabajos de experimentación bajo su responsabilidad. Siempre que se usen animales en investigación, se debe considerar que un objetivo tan importante como el de obtener resultados experimentales, será el de minimizar cualquier dolor o angustia que dichos animales puedan sufrir. El refinamiento de los procedimientos para conseguir que estos no causen sufrimiento debe ser parte integrante de toda investigación científica. Esto es importante

tanto desde el punto de vista de la preocupación humanitaria como para cumplir con los requisitos de la legislación sobre animales de investigación. (81)

Los investigadores que trabajen y experimenten con animales están moralmente obligados a manifestarles tres tipos de actitudes: respeto, afecto y gratitud.

Respeto: por tratarse de seres vivos y sensibles, que están experimentando sufrimiento y podrían terminar perdiendo la vida, tratárseles con todas las consideraciones que el caso merece.

Afecto: considerándolos partícipes con nosotros, del misterio de la vida.

Gratitud: reconocimiento por la importante ayuda al constituirse nuestros más íntimos colaboradores. (73)

Muchos laboratorios experimentales han adoptado estos principios éticos. Igualmente, se cuenta con abundante bibliografía sobre el tema. Y por último, cursos y textos que comprenden la formación en las ciencias de los animales de laboratorio, incluyen las pertinentes lecciones sobre la ética en el manejo y la utilización de los animales de laboratorio.

En la práctica, el cuidado de los animales de laboratorio recae en varias personas, pero legalmente y dependiendo de las leyes del país donde se lleve a cabo el estudio, la responsabilidad final con frecuencia recae en el investigador principal que esté realizando el procedimiento científico.(74)

ARGENTINA

No existe ninguna legislación en cuanto al uso de los animales de laboratorio, por lo que cada institución fija sus propias normas, y ejerce cierto control sobre el uso de los animales en la experimentación biomédica. La legislación existente, al igual que en la mayoría de los países latinoamericanos, es de carácter general. (81)

Ley 14.346. Protección de los animales contra actos de crueldad

Art. 3. Serán considerados actos de crueldad:

Practicar la vivisección con fines que no sean científicamente demostrables y en lugares o por personas que no estén debidamente autorizadas para ello; Intervenir quirúrgicamente animales sin anestesia y sin poseer el titular de médico o veterinario, con fines que no sean terapéuticos o de perfeccionamiento técnico operatorio, salvo casos de urgencia debidamente comprobada. Experimentar con animales de grado superior en la escala zoológica al indispensable según la naturaleza de la experiencia. (81)

MÉXICO

No existe normativa específica para el control, y regulación de la experimentación con animales vivos. Las autoridades sanitarias del Estado, son las encargadas de otorgar los permisos y autorizaciones para la realización de investigaciones con animales de laboratorio. (61)

Ley Protectora de animales del estado de México (1985) Capítulo V

De los experimentos con animales Artículo 23.- Para realizar algún experimento con animales los interesados deberán justificar ante las autoridades correspondientes, que la naturaleza del acto por realizar, es en beneficio de la investigación científica, y que para ello cuentan con la autorización de experimentación en animales, que se expidan por la Autoridades Sanitarias del Estado, y demostrar los siguientes requisitos:

- Que los experimentos no pueden realizarse con otras alternativas;
- Que son necesarios para el control, prevención y diagnóstico, para el tratamiento de enfermedades que afecten al hombre y a los animales;
- Que los animales no pueden ser substituidos por esquemas, dibujos, películas, fotografías, videocintas o cualquier otro procedimiento análogo. Al experimentador que no cumpla con algunos de los requisitos anteriores, se le aplicara la sanción respectiva de acuerdo a esta Ley o reglamentos.

Artículo 24: Los animales que vayan a ser utilizados en experimentos de disección, deberán previamente ser insensibilizados y al término de la operación, curados y alimentados en forma debida, si las heridas causadas son

considerables o implican mutilación grave, el animal será sacrificado bajo los medios más adecuados que eviten sufrimiento. (61)

COLOMBIA

Tiene una de las leyes latinoamericanas más completas, establece la responsabilidad de las autorizaciones de experimentación, en el Ministerio de Salud Pública, siempre y cuando, estas tengan una justificación científica. Al mismo tiempo, determina la forma en que los animales de experimentación deben ser tratados, y prohíbe la utilización de los mismos para investigaciones con fines educativos, o para experimentos sin fin científico (80)

LEY N°84 DE 1989 Del uso de animales vivos en experimentos e investigación.

Artículo 23: Los experimentos que se lleven a cabo con animales vivos, se realizarán únicamente con autorización previa del Ministerio de Salud Pública y solo cuando tales actos sean imprescindibles para el estudio y avance de la ciencia, siempre y cuando este demostrado.

- Que los resultados experimentales no puedan obtenerse por otros procedimientos o alternativas;
- Que los experimentos no puedan ser sustituidos por cultivo de tejidos, modos computarizados, dibujos, películas, fotografías, video u otros procedimientos análogos.

Artículo 24: El animal usado en cualquier experimento deberá ser puesto bajo los efectos de anestesia lo suficientemente fuerte para evitar que sufra dolor.

Si sus heridas son de consideración o implican mutilación grave, serán sacrificados inmediatamente al término del experimento.

Artículo 25: Se prohíbe realizar experimentos con animales vivos, como medio de ilustración de conferencias en facultades de medicina, veterinaria, zootecnia, hospitales o laboratorios o en cualquier otro sitio dedicado al aprendizaje, o con el propósito de obtener destreza manual. Los experimentos de investigación se

llevaran a cabo únicamente en los laboratorios autorizados previamente por las autoridades del Ministerio de Salud Pública y el decreto 1608 de 1978 en lo pertinente.

También se prohíbe el uso de animales vivos en los siguientes casos expresamente:

Cuando los resultados del experimento son conocidos con anterioridad;

Cuando el experimento no tiene un fin científico y especialmente cuando está orientado hacia una actividad comercial;

Realizar experimentos con animales vivos de grado superior en la escala zoológica al indispensable, según la naturaleza de la experiencia.

Artículo 26: Para todo experimento con animales vivos deberá conformarse un comité de ética. (90)

FRANCIA

Los investigadores franceses, deben hoy día, encontrar la mejor solución entre las exigencias de la investigación y el respeto hacia el animal teniendo en cuenta el sufrimiento que le es causado. Deberán asegurar que la salud y bienestar del animal no se amenace inútilmente.

Son numerosos los científicos que hoy desean tener una justificación firme de su proceder científico y mejorar de esta forma la imagen de la investigación ante la opinión pública. Por otro lado, antes de iniciar cualquier trabajo de investigación deben cumplir determinadas condiciones, tal vez secundarias en el plano ético, pero que se revisten de una cierta importancia para el desarrollo de la vida científica del investigado. (75)

Estatutos para una ética de la experimentación con animales

Artículo I: Sobre la necesidad de los experimentos con animales. Las necesidades de la investigación biológica, médica o veterinaria, y los límites actuales de los métodos alternativos, toman inevitable el recurso de la experimentación con animales para hacer progresar los conocimientos, mejorar el

diagnostico y el tratamiento de las enfermedades, y de un modo general preservar la salud.

Artículo 2: Sobre la sensibilidad y el sufrimiento de los animales. Los animales son seres sensibles y provistos de capacidad cognitivas y emocionales. Son capaces de sufrir. El experimento tiene el deber de garantizar que su salud y su bienestar no sean inútilmente amenazados. Evitar todo sufrimiento inútil será su primer cuidado.

Artículo 3: Sobre la capacitación del autor del experimento - Hacer experimentos con animales es un acto de responsabilidad personal. El autor del experimento se compromete a conformarse en todos los puntos a las exigencias legales y reglamentarias vigentes, a mantener y ampliar sus propias capacidades y las de sus colaboradores, y a garantizar la adecuación de los locales para el experimento y el alojamiento de las especies animales afectadas.

Artículo 4: Sobre la responsabilidad del autor del experimento - El autor del experimento tiene además una responsabilidad moral con los animales que utiliza para fines científicos. Debe por lo tanto aplicar todos los medios para justificar la ética de su actitud, en particular la legitimidad del objeto de la investigación y la pertinencia de los métodos considerados para realizarlo y para asegurarse de una probabilidad razonable que sus estudios conduzcan a la adquisición de conocimientos nuevos.

Artículo 5: Sobre la utilidad de una deliberación ética - El autor de la experiencia no puede ser juez exclusivo de la legitimidad ética de sus propios trabajos cuando se coloca en juego su relación con seres vivos. La comunidad científica en su conjunto siente también la necesidad de enriquecer su reflexión sobre lo que es tolerable y lo que no lo es, requiriendo así la creación de comités de ética específicos.

Artículo 6: Sobre el papel de los comités de ética en experimentos con animales - Estos comités aprecian la compatibilidad entre los protocolos de experimentación propuestos y los principios éticos a fin de auxiliar al autor del experimento en su proceder cuando el recurso al animal se impone. Tiene por objeto constituir una garantía complementaria de respeto a la vida animal y de la

justificación del proceder científico para la sociedad en su conjunto.

ESPAÑA

Con el objeto de asegurar la protección de los animales utilizados en experimentación se limita estrictamente su uso a ciertos fines: prevención de enfermedades, alteraciones de la salud, producción farmacéutica, protección del medio natural, formación y educación e investigación científica y médico legal. La norma busca satisfacer la demanda de un sector de la población que pide la reducción de la experimentación animal, el cumplimiento de las normas éticas en el manejo de animales y la creación de técnicas normalizadas que satisfagan las necesidades del método científico. La ley distingue entre animales de experimentación y animales de cría, que son los especialmente criados para su utilización en experimentos. Las especies propias para la experimentación se reducen. (26)

Los animales de laboratorio pueden y deben ser utilizados como reactivos biológicos y ecológicos, en beneficio de la Ciencia y la Salud Pública -se calcula que la experimentación con animales ha ayudado a incrementar la esperanza de vida del hombre en 20 años. Esta experimentación solo puede realizarse en el caso de que no se cuente con otras técnicas alternativas, aunque sean muy sofisticadas. No se puede olvidar que se trata de seres vivos, por lo que se ha de procurar el mejor cuidado para los animales, reduciendo el número de prácticas experimentales. (79)

Real decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (boe del 18 de marzo de 1988).

Artículo 2 : La utilización de animales en experimentación solo podrá tener lugar cuando esta persiga los siguientes fines: prevención de enfermedades, alteraciones de la salud y otras anomalías o sus efectos, así como el diagnóstico y el tratamiento de las mismas en el hombre, los animales vertebrados o invertebrados o las plantas; el desarrollo y la fabricación de productos farmacéuticos y alimenticios y otras sustancias o productos, así como la realización de pruebas para verificar su calidad, eficacia y seguridad. Valoración, detección, normalización o modificación de las condiciones fisiológicas en el hombre, los animales vertebrados o invertebrados o

las plantas. Protección del medio ambiente natural, en beneficio de la salud o bienestar del: hombre, los animales vertebrados o invertebrados o las plantas, la investigación científica, la educación y la formación, la investigación médico-legal. (37)

Artículo 7: Para que los establecimientos contemplados en el presente Real Decreto puedan ser registrados deberán cumplir los siguientes requisitos en orden al cuidado general y alojamiento de los animales de experimentación: que a los animales se les proporcionen condiciones adecuadas de alojamiento, medio ambiente, alimentación y bebida, así como cierto grado de libertad de movimientos y se limite al mínimo preciso cualquier restricción que les impida satisfacer sus necesidades fisiológicas y etológicas; estas condiciones deberán verificarse diariamente.

Que el bienestar y estado de salud de los animales sean supervisados por una persona competente con titulación superior que se disponga de medios e instalaciones que garanticen la eliminación, en el plazo más breve posible, de cualquier deficiencia que provoque alteraciones en el estado de salud o bienestar de los animales; las normas de trabajo e instrucciones de uso de todos los elementos constaran por escrito.(37)

Artículo 8: 1. Los establecimientos usuarios deberán disponer de instalaciones y equipo, tanto humano como material, apropiados a las especies a utilizar y a los experimentos a realizar, garantizando que los mismos puedan ejecutarse con la mayor efectividad posible, de forma que se obtengan los resultados perseguidos con el menor número posible de animales y produciendo a los mismos el mínimo grado de dolor, sufrimiento, estrés o lesión prolongados. Al frente del establecimiento deberá haber una persona responsable administrativamente del cuidado de los animales y del funcionamiento del equipo. 2. Asimismo, deberá contarse con asesoramiento veterinario para el control de todos los aspectos relacionados con la salud de los animales y con un veterinario u otra persona competente para cuidar del bienestar de los animales. (37)

Artículo 10: Quedan prohibidos los experimentos en los que se utilicen animales considerados en peligro de extinción, que figuran en el apéndice I del convenio de Washington de 3 de marzo de 1973, sobre el Comercio Internacional de Especies

Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, modificado el 22 de octubre de 1987; en el anexo c, parte 1, del Reglamento (CEE) 3626/1982, modificado por el Reglamento (CEE) 3143/1987 y en los Reales Decretos 3181/1980 y 1497/1986, a menos que se ajusten a lo dispuesto en las normativas citadas y los objetivos del experimento sean: la investigación tendente a la protección de las especies de que se trate o fines biomédicos esenciales, cuando se compruebe que tales especies son excepcionalmente las únicas adecuadas a tales fines.

La apreciación de estas excepciones y la autorización, en su caso, corresponderá a la autoridad competente, de conformidad con lo dispuesto en el artículo 4, a solicitud del establecimiento usuario, que la acompañará de una memoria descriptiva del experimento y objetivos que se persigan con el mismo. (37)

ESTADOS UNIDOS

En los Estados Unidos la primera ley que hace referencia al trato de animales de laboratorio data de 1966 y se conoció como Laboratory Animal Welfare Act.; esta ley fue ya modificada varias veces. Para el uso de animales de experimentación los investigadores se rigen por la Guide for the Care of Laboratory Animals, US Department of Health (DHEW) NIH 86,23 revisada en 1985, y los Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals used in Testing, Research and Training (National Research Council, 1986). Estas pautas son obligatorias para investigadores que trabajan en instituciones que reciben ayuda del gobierno federal y en los servicios de salud pública y los Institutos nacionales de salud del NIH (National Institute of Health). Entre las disposiciones que se contemplan en estos documentos figura que cada institución debe establecer un programa para cuidado y uso de animales, procedimiento que debe ser controlado por un comité de ética y de cuidado y uso de animales. (79)

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo analiza las buenas prácticas de producción del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH, sus instalaciones, el reactivo biológico o animales para experimentación que se alojan en el lugar, las rutinas de mantenimiento y legislación que rige su funcionamiento.

El Bioterio tiene un área de $16,8 \text{ m}^2$, y aloja a 119 ratones *Mus musculus* dividido en dos secciones por una pared de madera, ventanas con vidrios pintados de color negro, ventoleras que permanecen abiertas las 24 horas, 2 estanterías, 2 grifos para suministro de agua (40 cm y 1.10 m). Para ilustrar se observa la Figura N° 3.

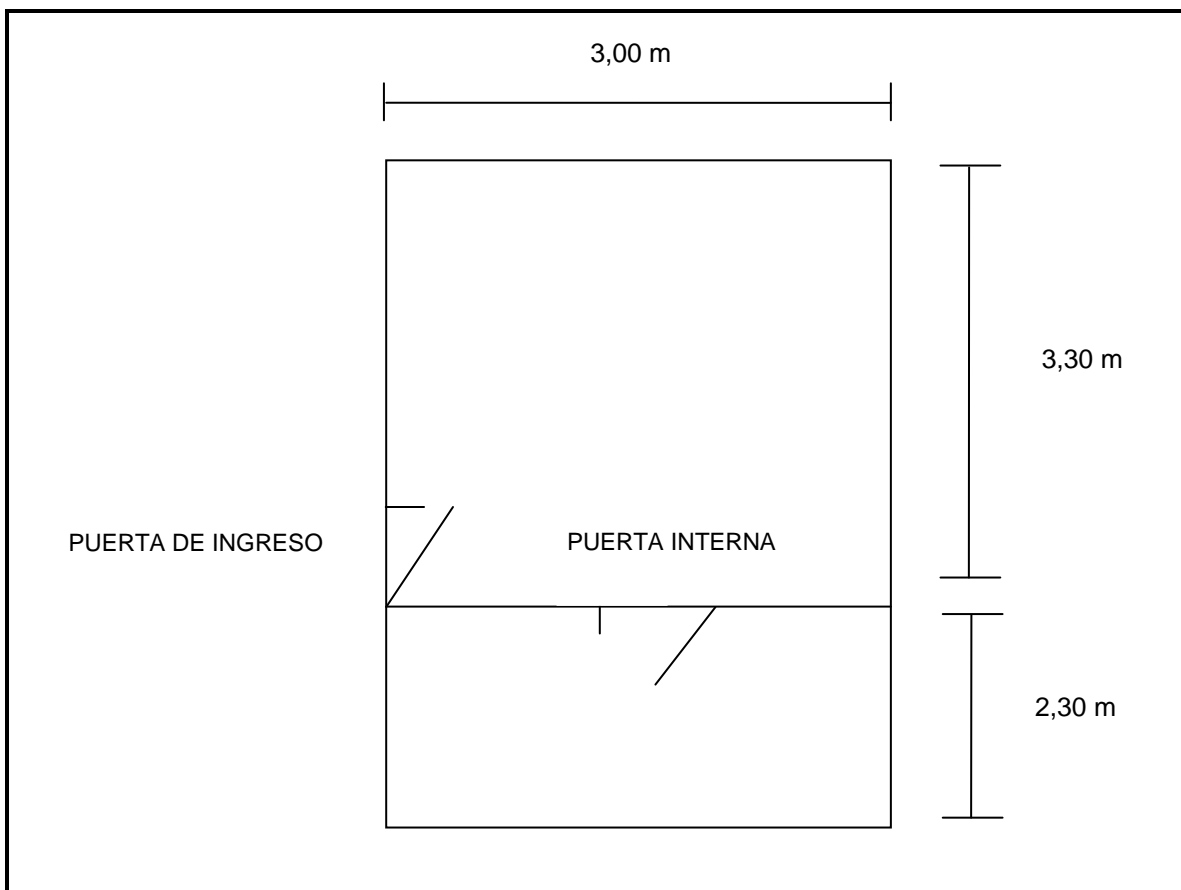


FIGURA N° 3 ESQUEMA DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

2.2. METODOLOGÍA DE TRABAJO

2.2.1. ASPECTOS DE LA METODOLOGÍA

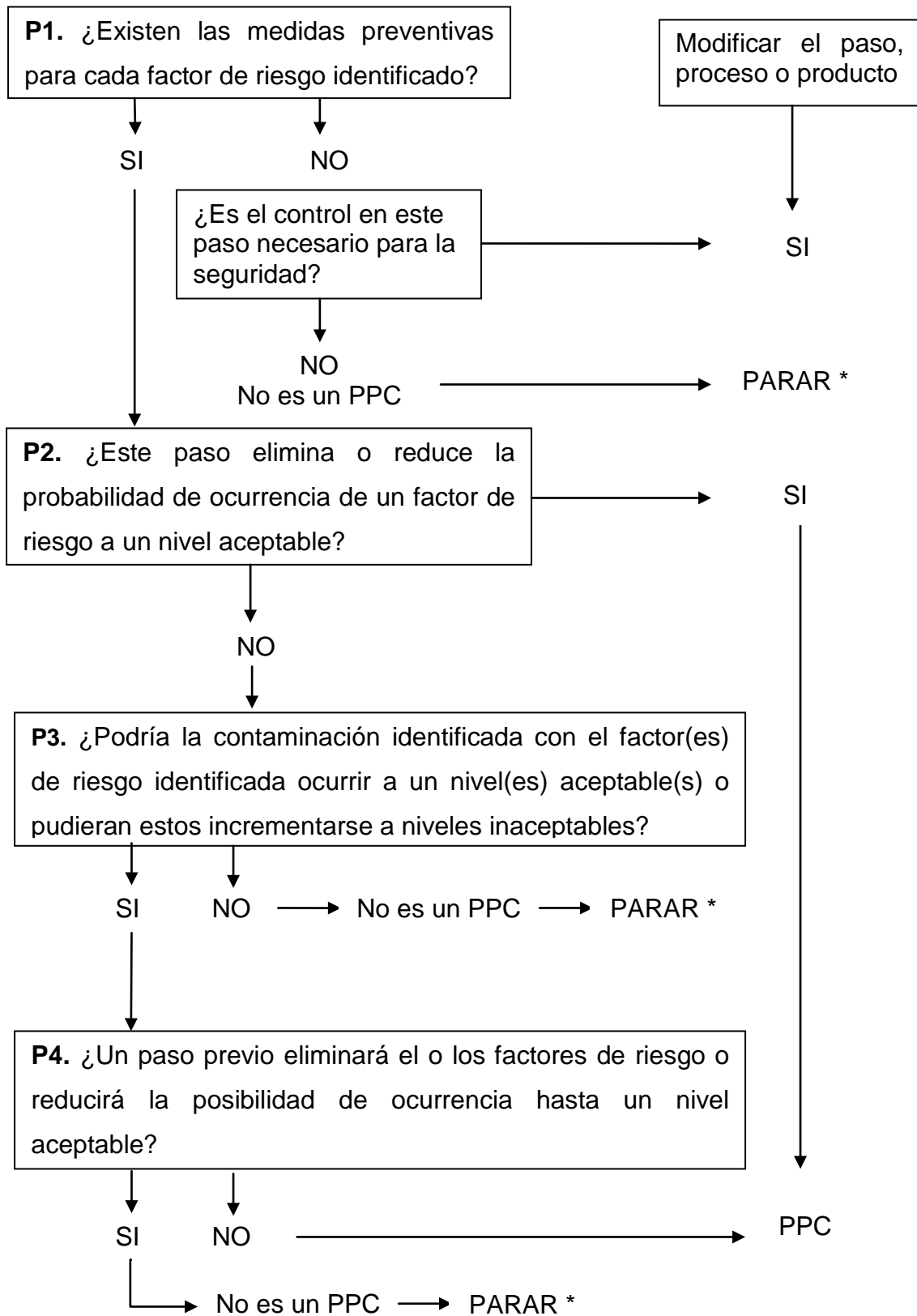
La metodología comprende las siguientes fases: identificación de los puntos de control en macroambiente, microambiente y animales para experimentación, planificación, ejecución y procesamiento de resultados.

2.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL

Los puntos críticos de control del macroambiente y microambiente del bioterio se identifican a través del árbol de decisiones, para posteriormente ser analizados y verificar si se encuentran dentro de los parámetros que establecen las normativas internacionales.

Entre los parámetros que comprenden el macroambiente tenemos: temperatura, humedad relativa, ventilación, iluminación, ruido, pisos, techos, paredes, estanterías, aire, ventanas. Los elementos que comprenden el microambiente son: espacio designado a cada animal, jaulas, lechos, agua, alimento, implementos para ejercicio.

ÁRBOL DE DECISIONES PPC



2.2.3.PLANIFICACIÓN

Se tomará muestras de acuerdo con la complejidad del sistema y el número de elementos en estudio en el macroambiente, microambiente y animales para experimentación.

Macroambiente

- **Temperatura:** recopilación de datos dos veces por día (10h00 y 19h00), durante 15 días.
- **Humedad relativa:** recopilación de datos dos veces por día (10h00 y 19h00), durante 15 días.
- **Iluminación:** recopilación de datos dos veces por día (10h00 y 19h00), durante 15 días.
- **Ruido:** recopilación de datos dos veces por día (10h00 y 19h00), durante 15 días.
- **Estanterías:** toma de muestras en las 13 divisiones de las 2 estanterías.
- **Ambiente:** el bioterio cuenta con un área de 16,8 m² la cual se analiza a través de un examen microbiológico.

Microambiente

- **Jaulas:** existen 119 ratones distribuidos en 28 jaulas de las cuales se tomara una muestra para comprobar la contaminación microbiana de las mismas.
- **Comederos:** cada una de las 28 jaulas cuenta con un comedero.
- **Agua:** se toma muestras de cuatro diferentes puntos en el sistema desde el pozo, la cisterna, grifo y bebederos.
- **Alimento:** se toma tres muestras del alimento en el lugar de almacenamiento, lo pellets en uso y del alimento distribuido en los comederos de los animales.

Animales para experimentación

a) Población

El bioterio de Escuela de Bioquímica y Farmacia cuenta con 119 animales para experimentación ratones *Mus musculus* de genética desconocida y sin codificación.

b) Muestra

10 animales de diferentes colonias, escogidas completamente al azar con las siguientes características.

- 4 animales de más de 24 semanas
- 4 animales de 6 a 12 semanas
- 2 animales de destete

2.2.4. EJECUCIÓN

CONTROL DE TEMPERATURA

Se procede a la recopilación de datos dos veces por día (10h00 y 19h00), durante 15 días. Se usa un termohigrómetro calibrado por el Centro de Metrología de la fuerza Terrestre el 20 de enero 2009.

CONTROL DE HUMEDAD RELATIVA

Se realiza la recopilación de datos dos veces por día (10h00 y 19h00), durante 15 días. Se usa un termohigrómetro calibrado por el Centro de Metrología de la fuerza Terrestre el 20 de enero 2009.

CONTROL ILUMINACIÓN

La recopilación de datos se realiza dos veces por día (10h00 y 19h00), durante 15 días. Se utiliza un luxómetro calibrado por le Empresa de Eléctrica S.A. Riobamba el 21 de diciembre 2009

CONTROL DEL RUIDO

La recopilación de datos se realiza dos veces por día (10h00 y 18h00), durante 15 días. Se utiliza un sonómetro PCE-322 A calibrado por le Empresa de Eléctrica S.A. Riobamba el 21 de diciembre 2009.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AMBIENTE

El bioterio cuenta con un área de 16,8 m² la cual se analiza a través de un examen microbiológico, a través de la siguiente técnica:

Materiales

- Cajas de agar sangre y agar PCA
- Incubadora a 35°C

Procedimiento

- Las cajas se colocan en un área, a una altura de 1 m del suelo y a 1 metro de distancia de cada obstáculo.
- Dejar las cajas abiertas durante 1 hora
- Incubar a 35°C durante 48 horas
- Contar las colonias desarrolladas
- Calcular el valor medio de las placas colocadas contemporáneamente en el mismo ambiente. (42)

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ESTANTERÍAS, JAULAS Y COMEDEROS

En las estanterías se toma muestras en las 13 divisiones de las 2 estanterías. Existen 119 ratones distribuidos en 28 jaulas de las cuales se tomara una muestra para comprobar la contaminación microbiana de las mismas. Cada una de las 28 jaulas cuenta con un comedero que también se analiza en el presente trabajo.

Materiales

- Plantillas de papel de 10 cm² para toma de muestras.
- Tubos con tapa rosca con 10 mL de agua de peptona al 0.1%
- Tubos con tapa rosca con 9 mL de agua de peptona al 0.1%
- Hisopos de algodón estériles de 12 a 15 cm de largo.
- Cajas petri estériles.
- Agar PCA
- Pipetas de 2mL y 1mL

- Baño de agua a 45°C
- Asa de 45° de vidrio estéril.

Procedimiento

- Remojar el hisopo estéril en la solución, presionar contra las paredes para desechar el exceso.
- Colocar la platilla en la superficie elegida, frotarla con el hisopo húmedo, rotando y haciendo trazos en sentido horizontal, vertical y diagonal, sumergir el hisopo contaminado en el tubo con la solución, agitar de abajo hacia arriba 10 veces, dejar reposar 3 minutos.
- Frotar 4 áreas adicionales de 10 cm², enjuagando el hisopo después de cada barrido.
- Agitar los tubos con las soluciones contaminadas contra la palma de la mano.
- Realiza diluciones de la muestra, 1 mL en el tubo 1 con 9 mL de agua de peptona, 1 mL del tubo 1 pasamos al tubo 2 con 9 mL de agua de peptona y sucesivamente hasta el número de diluciones que se elija.
- Sembrar 0.1 mL de las diluciones elegidas en las cajas petri.
- Contar las colonias y reportar por 10 cm² (42)

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA

Las muestras de agua son tomadas en cuatro diferentes puntos del sistema canalización de la ESPOCH, el pozo, la cisterna, grifo y bebedero.

Procedimiento

- Montar el equipo Millipore en condiciones de asepsia, y conectarlo al sistema de vacío.
- Colocar la membrana estéril (cuadriculado hacia arriba) en el soporte, con la ayuda de una pinza (de punta roma) previamente flameada con alcohol y enfriada.
- Montar nuevamente el equipo y fijarlo con la pinza adaptadora (pinza de pato).
- Agitar vigorosamente el frasco que contiene la muestra de agua y verter 100 mL en el embudo del equipo Millipore y filtrar al vacío; cuando haya pasado toda la muestra, con el filtro aún en su lugar, enjuague el embudo mediante la filtración de 100 mL de solución

buffer de fosfatos (procurar que el líquido recorra las paredes del embudo). Cerrar el vacío antes de retirar la membrana.

- Retirar la membrana tomándola con la pinza estéril y depositarla asépticamente sobre la placa de agar ENDO, asegurando el contacto de la membrana con el medio.
- Incubar a 37° C durante 24-48 h. (42)

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO ALIMENTO

Se toma tres muestras del alimento en el lugar de almacenamiento, de los sacos que ya están abiertos, en uso y del alimento distribuido en los comederos de los animales.

Procedimiento

- Montar el equipo Millipore en condiciones de asepsia, y conectarlo al sistema de vacío.
- Colocar la membrana Millipore estéril (cuadrulado hacia arriba) en el soporte, con la ayuda de una pinza (de punta roma) previamente flameada con alcohol y enfriada.
- Montar nuevamente el equipo y fijarlo con la pinza adaptadora (pinza de pato).
- Preparar una disolución del producto alimenticio de 1:10.
- Agitar vigorosamente el frasco que contiene la muestra de alimento y verter 100 mL en el embudo del equipo Millipore y filtrar al vacío; cuando haya pasado toda la muestra, con el filtro aún en su lugar, enjuague el embudo mediante la filtración de 100 mL de solución buffer de fosfatos (procurar que el líquido recorra las paredes del embudo). Cerrar el vacío antes de retirar la membrana.
- Retirar la membrana tomándola con la pinza estéril y depositarla asépticamente sobre la placa de agar ENDO, asegurando el contacto de la membrana con el medio.
- Incubar a 37° C durante 24-48 h. (42)

ANIMALES PARA EXPERIMENTACIÓN

Se toman 10 animales, ratones *Mus musculus* del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia para realizar el análisis físico, hematológico, parasitario y microbiológico

ANÁLISIS FÍSICO

Este análisis tiene por objetivo ver las características externas del ratón, peso, sexo y distancia cola-cabeza. Usando una balanza analítica calibrada, observando la distancia ano genital y una regla.

ANÁLISIS HEMATOLÓGICO

La extracción de sangre para este análisis debe ser del corazón, usando las técnicas apropiadas y previa anestesia al animal los resultados deberán ser comparados con las normativas internacionales.

IDENTIFICACIÓN DE ECTOPARÁSITOS

Identificación de Endoparásitos usando el método de Graham

Materiales

- Baja lenguas
- Cinta engomada
- Porta objetos
- Guantes de goma

Procedimiento

- Colocar la cinta engomada en el baja lenguas.
- Tomar la muestra de los animales arrastrando el baja lenguas por el vientre del animal, las patas y la piel.
- La cinta adhesiva se coloca sobre un portaobjetos con la cara engomada hacia el cristal, y se analiza en el microscopio. (42)

IDENTIFICACIÓN DE ENDOPARÁSITOS

Materiales

- Caja para muestras de heces
- Palillos
- Porta y cubreobjetos

Procedimiento

- En una lámina portaobjetos se colocan dos gotas, en la parte izquierda solución salina y en la derecha lugol.
- Se toma con un palillo la muestra de materia fecal, se debe escoger la parte que tenga elementos anormales y de otra parte para que así quede una muestra representativa.
- Se homogeniza en la lámina primero en la solución salina y luego en el lugol.
- Se le colocan los cubreobjetos. La suspensión no debe quedar muy gruesa pero tampoco muy delgada. (42)

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS

CULTIVO DE GARGANTA

La flora aislada incluye cocos y bacilos, tanto Grampositivos como Gramnegativos además de encontrarse cierto número de levaduras. Para un estudio satisfactorio del exudado faríngeo es necesario tomar una adecuada muestra de la región de amígdalas y faringe. El cultivo se efectúa para demostrar la presencia de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y otras especies del género *Streptococcus*.

Procedimiento

- Inocular inmediatamente una caja (placa) de agar sangre al 5%, hacer dos cortadas en el agar durante la siembra. Las cortadas deben ser aproximadamente de 1 cm de largo y el asa debe llegar al fondo de la caja. El propósito de las cortadas es introducir las bacterias

dentro del agar para alejarlos del oxígeno atmosférico y así incrementar la hemólisis tipo beta.

- Con el objeto de obtener cultivos evidentes de *Streptococcus pyogenes*, sin necesidad de hacer sub-cultivos proceder así: Con pinza flameada y fría, colocar en la zona de más fuerte inoculación en el agar sangre de carnero (primera estría), un disco de 30 mcg de neomicina. A unos 8 –10 mm de distancia, colocar un disco de 0.04 unidades de bacitracina. *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae* son resistentes al antibiótico neomicina, por lo que crecen en cultivos casi puro alrededor de éste disco.
- Introducir la caja en un frasco de vidrio de boca ancha, poner en el fondo una toalla de papel húmeda, colocar la caja con el medio y luego introducir una candela corta y encendida, cerrar el frasco. La candela se apagará sola.
- Incubar por 18 a 24 horas a 36°C (1)

COPROCULTIVO

Este análisis es de gran importancia ya que las infecciones entéricas pueden ser causadas por varios microorganismos, siendo de mayor importancia las bacterias del genero *Shigella*, *Salmonella*.

Muestra

Para efectuar un coprocultivo pueden inocularse muestras del material obtenido del contenido cecal. Cuando las heces, que se encuentran a 37°C dentro del intestino, son colocadas y permanecen a temperatura ambiente (aproximadamente a 20°C), el pH baja considerablemente (acidez) y hace que las bacterias, especialmente *Shigella* sp pierdan su viabilidad (capacidad de reproducirse en cultivo).

Procedimiento

- Colocar la muestra de heces del contenido cecal en tetracionato, dejar de 8 a 12 horas a una temperatura de 35 37 °C
- Sembrar en las cajas de agar EMB, sabouraud y una caja de SS.
- Diseminar el inóculo utilizando dos asas en anillo.

- Ya diseminadas de esta manera las muestras en la superficie de las cajas, incubar a 36°C por 18 a 24 horas. (1)

Interpretación de resultados

- Después de incubadas, observar cuidadosamente las placas. Debe contarse con una luz de lámpara que ilumine las cajas por detrás y observarlas. Marcar por detrás con un círculo de crayón graso cada tipo diferente de colonias sospechosas.
- Colocar las cajas con las colonias previamente marcadas, usando una asa en aguja bien recta, flameada y fría, toque la superficie de la colonia seleccionada, teniendo cuidado de no pincharla o pasar tocando otras colonias cercanas.
- Incube a 36°C la gradilla que contiene las bioquímicas. Deben permanecer en incubación de 18-24 horas. Los tapones de rosca deben quedar ligeramente flojos para permitir la entrada de oxígeno.
- Examine las reacciones e intérprete los resultados de acuerdo a la tabla de identificación de pruebas bioquímicas.

Coloración de Gram

- Hacer un frotis.
- Fijar el frotis con calor y dejar enfriar.
- Cubrir el frotis con cristal violeta por 1 minuto.
- Lavar con agua de chorro, eliminar el exceso de agua
- Cubrir el frotis con lugol para Gram por 1 minuto.
- Lavar con agua de chorro.
- Decolorar con alcohol acetona por 20-30 segundos.
- Lavar con agua de chorro.
- Cubrir con safranina el frotis por 30 segundos.
- Lavar con agua de chorro.
- Dejar secar al aire y observar al microscopio con objetivo 100x.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Prueba de la coagulasa

La coagulasa es una enzima que tiene la capacidad de convertir el fibrinógeno que está presente en el plasma humano o animal, en fibrina, lo cual se evidencia en el laboratorio por la formación de un coágulo visible. Esta prueba se usa para diferenciar *Staphylococcus aureus* que siempre produce esta enzima, de otras especies de *Staphylococcus* que no la producen. (1)

Medios y reactivos

- Plasma de conejo o plasma humano obtenido de sangre fresca estéril, no nitrada.
- Cloruro de calcio al 5%: Pese 5.0 gramos de Cloruro de calcio, deposite en un balón aforado de 100 mL y lleve con agua destilada hasta la marca de aforo.
- Medio de cultivo: Cualquier medio sólido, libre de sal (NaCl) debe usarse para que crezca el microorganismo a probar.

Prueba de la catalasa

La catalasa, es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas. El peróxido de hidrógeno es uno de los productos finales del metabolismo oxidativo de los carbohidratos y si se acumula es letal para el microorganismo. Esta prueba es de vital importancia en la diferenciación de *Streptococcus* (catalasa negativa) y de los *Staphylococcus* (catalasa positiva).

Prueba de oxidasa

La enzima Oxidasa, conocida también como citocromo, oxidasa o indofenol oxidasa. Se encuentra presente en una gran variedad de seres vivos entre los que incluyen bacterias hasta animales superiores. Su función es la de promover la oxidación del citocromo "c" a expensas del oxígeno molecular. En bacteriología se puede determinar su presencia al hacer reaccionar una población bacteriana con su sustrato oxidable como el dimetil o tetrametil- p-fenilendiamina y el resultado observado es la aparición de color que va del rosado al púrpura. (1)

Esta prueba es sumamente importante en la identificación de bacterias Gram negativas y en la diferenciación de cocos Gram positivos de importancia clínica: Micrococcus (prueba positiva) y Staphylococcus (prueba negativa excepto S. Sciuri).

2.2.5. PROCESAMIENTO DE RESULTADOS

REPORTE DE INFORMACIÓN

Los resultados se reportan de acuerdo a los formatos correspondientes y tomando como referencia los valores indicados en las normas vigentes.

Códigos que se utilizan para identificar las muestras

- Temperatura: (T1, T2, T3...)
- Humedad relativa: (Hr1, Hr2, Hr3...)
- Iluminación: (L1, L2, L3...)
- Ruido: (R1, R2, R3...)
- Estanterías: (Es1, Es2, Es3...)
- Ambiente: (Am1, Am2, Am3...)
- Jaulas: (J1, J2, J3,...)
- Comederos: (C1, C2, C3...)
- Agua: (Ag1, Ag2, Ag3...)
- Alimento: (Al1, Al2, Al3...)
- Animales para experimentación: (Rt1, Rt2, Rt3...)

PROCESO DE RESULTADOS

Es el proceso a través del cual se revisa los resultados generados y el parámetro con el cual se compara y difiere dependiendo de las muestras tomadas en los diferentes puntos críticos de control, en donde cada uno debe cumplir con las normas internacionales establecidas.

3. RESULTADOS

CUADRO N° 1 RESULTADOS DEL CONTROL DEL MACROAMBIENTE

MUESTRA	MES DE PROCESAMIENTO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN	RANGO PERMITIDO
Temperatura	Diciembre 2009	13,5°C	3,9	29,3%	12 a 26°C
Humedad relativa	Diciembre 2009	48,2%	6,2	12,8%	30 a 70%
Luz (10h00)	Marzo 2010	C ₁ 212,2 lux	25,3	12,0%	130 a 325 lux
		C ₂ 968,3 lux	101,9	10,5%	
Luz (18h00)	Marzo 2010	C ₁ 24,2 lux	4,2	17,2%	130 a 325 lux
		C ₂ 83,1 lux	10,4	12,5%	
Ruido (10h00)	Marzo 2010	C ₁ 62,5 dB	4,0	6,3 %	50 a 70 dB
		C ₂ 62,0 dB	3,3	5,4 %	
Ruido (18h00)	Marzo 2010	C ₁ 62,0 dB	2,4	6,1%	50 a 70 dB
		C ₂ 61,3 dB	3,0	4,8 %	

C1: Cuarto 1
C2: Cuarto 2

Se realizó un control de los factores macroambientales tales como la temperatura y las mediciones realizadas nos dieron un promedio de 13,5°C, la desviación estándar de 3,9 y un coeficiente de variación de 29,3%. La norma indica como rango permisible de 12 a 26°C, establecido por el Canadian Council on Animal Care, (CCAC). El control de humedad relativa tiene un rango permitido de 30 a 70% y los resultados obtenidos en el Bioterio indican un promedio de 48,2%, con una desviación estándar de 6,2 y un coeficiente de variación de 12,8% lo cual indica que cumple con la norma internacional y reduce significativamente los riesgos de microorganismos que se prolifera en humedades relativas altas. La luz es uno de los parámetros más variables, los datos revelan un promedio de intensidad de luz (10h00) de 212,1 lux en el cuarto 1 y 968,3 lux en cuarto 2, esta medición en particular esta fuera de los parámetros establecidos, lo que podría significar que los ratones expuestos a esta intensidad de luz presentan un daño a nivel de retina. La segunda medición (18h00) muestra un promedio de 24,15%, desviación estándar de 4,12 y coeficiente de 17,2 para el cuarto 1 y para el cuarto 2 un promedio de 83,1 lux, desviación estándar de 10,4 y un coeficiente de variación de 12,53%. La norma establece 130 a 325 lux. El nivel de ruido promedio es de 59.2 dB y se encuentra dentro de la norma establecida que es de 50 a 70 dB, no existe una variación significativa en los datos tomados en las diferentes horas del día. Ver Cuadro N° 1.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL MICROAMBIENTE Y EL AIRE

CUADRO N° 2 RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL MICROAMBIENTE Y EL AIRE

MUESTRA	MES DE PROCESAMIENTO	PROMEDIO	RANGO PERMITIDO
Aire	Noviembre 2009	+ 300 ufc/m ³ ^a	<5 ufc/m ³ ^a
Estanterías	Noviembre 2009	+ 300 ufc/m ² ^a	<5 ufc/m ² ^a
Jaulas	Noviembre 2009	+ 300 ufc/m ² ^a	<5 ufc/m ² ^a
Comederos	Noviembre 2009	+ 300 ufc/m ² ^a	<10 ufc/m ² ^a

a: Aerobios mesófilos

Las muestras que fueron tomadas del ambiente para examinar la calidad de aire contienen más de 300 ufc/m³ de aerobios mesófilos, excediendo al número permitido por la Oficina Nacional de Normalización de Cuba que tiene como límite <5 ufc/m³ para aerobios mesófilos. Las estanterías y jaulas contienen una carga microbiana mucho más alta de lo permisible por la norma, todas las muestras contienen más de 300 ufc/m² aerobios mesófilos cuando el límite máximo permitido es <5 ufc/m² para aerobios mesófilos en superficies lisas del bioterio según la Oficina Nacional de Normalización de Cuba. En los comederos encontramos de igual forma una abundancia de microorganismos, más de 300 ufc/m³, que sobrepasan evidentemente el límite permisible de <10 ufc/m² para aerobios mesófilos en superficies irregulares según la Oficina Nacional de Normalización de Cuba. Ver Cuadro N° 2.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA Y ALIMENTO

CUADRO N° 3 RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AGUA Y ALIMENTO

MUESTRA	MES DE PROCESAMIENTO	PROMEDIO	RANGO PERMITIDO
Agua	Enero 2010	72 ufc/100mL ^a	30 ufc/100mL ^a
		6.5 ufc/100mL ^b	2 ufc/100mL ^b
		Ausencia ^c	Ausencia ^c
Alimento	Enero 2010	MNPC ^a	3x10 ⁶ ufc/g mL ^a
		MNPC ^b	10 ufc/g mL ^b
		MNPC ^c	10 ufc/g mL ^c

a: Aerobios mesófilos

b: Coli totales

c: Coli fecales

MNPC: Muy numeroso para contar

El análisis del agua tomada en diferentes puntos del sistema nos revela que el 25% de las muestras cumplen con la norma en cuanto al número de bacterias aerobias mesófilas (límite máximo 30 ufc/100mL), de igual forma el 25% de las muestras cumple con la norma de coliformes totales al tener un número menor o igual a 2 ufc/100mL y el 100% de las muestras cumple con la norma en recuento de coli fecales al presentar 0 ufc/100mL, tomando como referencia la norma INEN 1105. En las muestras del alimento almacenado, el que se encuentra abierto, en uso, y en el que se encuentra distribuido en los comederos de los animales los resultados son los mismo se encontró que el 100% de las muestras presenta enterobacterias: muy numeroso para contar (MNPC), el 100% de las muestras presenta Coli total: muy numeroso para contar (MNPC) y el 100% de las muestras presenta E. coli: muy numeroso para contar (MNPC). Representando este punto un foco infeccioso para los animales al consumir este alimento. Ver Cuadro N° 3.

ANIMALES PARA EXPERIMENTACIÓN

IDENTIFICACIÓN DE ECTOPARÁSITOS Y ENDOPARÁSITOS

CUADRO N° 4 RESULTADOS DEL CONTROL PARASITARIO

MUESTRA	MES DE PROCESAMIENTO	PARÁSITOS ENCONTRADOS	PREVALENCIA
Piel del ratón	Abril 2010	Ácaros: escasos	40%
Heces fecales	Abril 2010	LSS: algunos	30%
Heces fecales	Abril 2010	QAH: escasos	30%
Heces fecales	Abril 2010	QGL: algunos	10%
Heces fecales	Abril 2010	QGL: numerosos	10%

LSS: Larvas de *Strongyloides stercoralis*.

QAH: Quistes de *Ameba histolytica*

QGL: Quistes de *Giardialamblia*

Al analizar los ectoparásitos en los animales de experimentación encontramos que el 60% no presenta ningún tipo de ectoparásitos y el 40% restante tiene ectoparásitos (ácaros) escasos. Los resultados de los análisis revelan que el 80% de los animales tiene algún tipo de parásitos de los cuales en el 30% se encuentra Larvas de *Strongyloides stercoralis*: algunos, el 30% Quistes de *Ameba histolytica*: escasos, el 10% presenta Quistes de *Giardia lamblia*: algunos y el 10% Quistes de *Giardia lamblia*: numerosos. Ver Cuadro N° 4.

ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS

CUADRO N° 5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS HEMATOLÓGICO

MUESTRA	MES DE PROCESAMIENTO	PARÁMETRO	PROMEDIO	RANGO PERMITIDO
SANGRE (corazón)	Febrero 2010	Glóbulos blancos	4,4 x 10 ³ /μL	5.0-13.7 x 10 ³ /μL
	Febrero 2010	Glóbulos rojos	10,5 x 10 ⁶ /μL	7.9-10.1 x 10 ⁶ /μL
	Febrero 2010	HGB g/dL	16,5	11.0-14.5
	Febrero 2010	Hematocrito %	50.5	38.5-45.1
	Febrero 2010	MCV fl	48	48.0-56.0
	Febrero 2010	MCH pg	15.7	18.0-25.0

Los análisis de sangre muestran un promedio de 4,4 x 10³/μL de glóbulos blancos, 10,5 x 10⁶/μL glóbulos rojos, HGB 16,5 g/dL, hematocrito 50.5%, MCV 48 fl y MCH 15,7 pg, mostrando el estado de salud de los ratones de la laboratorio. Ver Cuadro N° 5.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

CUADRO N° 6 RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO PARA LOS ANIMALES

MUESTRA	MES DE PROCESAMIENTO	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS	PREVALENCIA
Contenido cecal	Marzo 2010	<i>E. coli</i>	100%
Contenido cecal	Marzo 2010	<i>Salmonella typhi</i>	30%
Secreción faríngea	Marzo 2010	<i>Streptococcus beta hemolítico</i> no del grupo A	50%
Secreción faríngea	Marzo 2010	<i>Staphylococcus aureus</i>	40%
Secreción faríngea	Marzo 2010	<i>Candida albicans</i>	10%

Los animales de experimentación presentan diferentes microorganismos, en el análisis del contenido cecal se encuentra en el 100% de los animales *E. coli* y 30% *Salmonella typhi*. En la secreción faríngea se encuentra en el 50% de ratones presenta *Streptococcus beta hemolítico* no del grupo A, 40% *Staphylococcus aureus* y 10% *Candida albicans*. Ver Cuadro N° 6.

4. CONCLUSIONES

- Se analizó los factores microambientales (jaulas, bebederos, comederos, agua y alimento) y macroambientales (temperatura, humedad, intensidad de luz y ruido) en los que habitan los animales de experimentación (*Mus musculus*) del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo durante el periodo noviembre 2009 abril 2010.
- El análisis de los factores macroambientales, temperatura humedad relativa y sonido tiene un promedio dentro del rango permitido, sin embargo la intensidad de luz a las 10h00 es de 968,3 lux en el cuarto 2, esta medición en particular esta fuera de los parámetros establecidos, lo que podría significar que los ratones expuestos a esta intensidad de luz presenten un cambio comportamental, provoque estrés en el animal o un daño a nivel de retina. Por esta razón se debería hacer una reestructuración en la infraestructura para evitar daños en la salud animal. Según el Cuadro N° 1.
- Los resultados del análisis microbiológico del ambiente, estanterías, jaulas y comederos es de más de 300 ufc/m³ de aerobios mesófilos; el alimento tiene en todos sus parámetros (aerobio mesófilos, coli totales y coli fecales) un alto rango de bacterias que es muy numeroso para contar (MNPC) y la muestra de agua contiene 72 ufc/100mL para aerobios mesofilos cuando el rango indica hasta 30 ufc/100mL, para coli totales el resultado es 6.5 ufc/100mL, las normas permiten < 2 ufc/100mL. Estos son principalmente los factores que afecta de una forma directa a la salud del animal. Los resultados del análisis microbiológico demuestra que es necesario controlar de mejor manera la excesiva contaminación en los factores microambientales, el agua y el alimento. Según los Cuadros N° 2 y N° 3.
- Se realiza el análisis de los ectoparásitos en los animales de experimentación y se establece que el 40% tiene ectoparásitos (ácaros) escasos. Para endoparásitos los resultados de los análisis revelan que el 80% de los animales tiene algún tipo de parásitos de los cuales en el 30% se encuentra Larvas de *Strongyloides stercoralis*: algunos, el 30% Quistes de *Ameba histolytica*: escasos, el 10% presenta Quistes de *Giardia lamblia*: algunos y el 10% Quistes de *Giardia lamblia*: numerosos. En el análisis microbiológico del contenido cecal: el 100% de los ratones tienen *E. coli* y 30%

Salmonella typhi. En los análisis de secreción faríngea, el 50% presenta *Streptococcus beta hemolítico* no del grupo A, 40% *Staphylococcus aureus* y 10% *Candida albicans*. Por esta razón es necesario saneamiento de los animales y el personal, estudiantes e investigadores deberán seguir estrictamente las normas de bioseguridad. Según los Cuadros N° 4 y N°6

- El control sanitario de los animales de experimentación *Mus musculus* del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH, demuestra que el manejo que tiene el personal en las áreas de la producción de los animales debería ser mejorada para obtener resultados favorables, acordes con los estándares internacionales vigentes.
- Para mejorar las prácticas de producción de los animales de laboratorio es vital contar con una norma administrativa que regule y supervise a los estudiantes que realizan prácticas con animales y los investigadores que utilizan a los ratones como reactivo biológico.
- Se elabora la “Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón”, este documento procura ser un aporte para direccionar el proceso de mejoramiento de los medios experimentales e investigativos para los cuales son utilizados los animales de experimentación. Está basada en diferentes normas y guías internacionales que se encuentran en vigencia y han sido legalmente aprobadas.

RECOMENDACIONES

- La Escuela de Bioquímica y Farmacia es responsable de este valioso espacio para el avance del estudio y la investigación, por lo tanto debería contar con una estructura administrativa que elabore los protocolos para el uso y manejo de los animales
- El personal asignado a esta área debería ser capacitado para de esta forma transmitir estos conocimientos a los estudiantes de la Escuela y concientizarles de la importancia que tienen los experimentos con animales a nivel de nuevas investigaciones científicas.
- Además es necesario implementar un proyecto de inmunización para el personal encargado, los estudiantes e investigadores que tengan contacto continuamente con los animales, la vacunación y las normas de bioseguridad adecuadas podrían evitar cualquier problema en el futuro.
- Sería necesario una readecuación de la infraestructura para mejorar las condiciones de los animales de experimentación, así como también crear un sistema de cruzamiento adecuado para obtener una genética conocida.
- Aplicar las directrices que se presenta en la “Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón” que se anexa en el presente trabajo para mejorar las técnicas de producción de ratones de laboratorio.
- Hacer un control rutinario de todos los factores macroambientales y microambientales para conocer su estado y vigilar su mejoramiento luego de reestructurar su manejo y seguir las directrices de la “Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón”.

RESUMEN

El objetivo de la investigación es Determinar los parámetros de Buenas Prácticas de Producción de *Mus musculus* en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Las muestras del macroambiente y microambiente fueron seleccionadas al azar, al igual que los animales. Se analizó los factores microambientales y macroambientales, en los que habitan los animales de experimentación (*Mus musculus*) del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia durante el periodo noviembre 2009 abril 2010. El análisis de los factores macroambientales, temperatura humedad relativa y sonido tiene promedios dentro del rango permitido, sin embargo la intensidad de luz a las 10h00 es de 968,3 lux en el cuarto 2, esta medición en particular esta fuera de los parámetros establecidos. Los resultados del análisis microbiológico en el ambiente, estanterías, jaulas y comederos, tienen una concentración de más de 300 ufc/m³ de aerobios mesófilos, el alimento tiene en todos los parámetros analizados un alto rango de bacterias que es muy numeroso para contar (MNPC) y la muestra de agua contiene 72 ufc/100mL para aerobios mesofilos, el rango indica hasta 30 ufc/100mL, para coli totales el resultado es 6.5 ufc/100mL las normas permiten < 2 ufc/100mL. Al analizar los ectoparásitos en los animales de experimentación encontramos que el 40% tiene ectoparásitos escasos. El 80% de los animales tiene algún tipo de parásitos de los cuales en el 30% se encuentra Larvas de *Strongyloides stercoralis*: algunos, el 30% Quistes de *Ameba histolytica*: escasos, el 10% presenta Quistes de *Giardia lamblia*: algunos y el 10% Quistes de *Giardia lamblia*: numerosos. En los animales en el análisis del contenido cecal se encuentra que el 100% de los ratones tienen *E. coli* y 30% *Salmonella typhi*. En los análisis de secreción faríngea el 50% presenta *Streptococcus*, 40% *Staphylococcus aureus beta hemolítico* no del grupo A y 10% *Candida albicans*. El control sanitario de los animales de experimentación *Mus musculus* del Bioterio, demuestra que el manejo que tiene el personal en las áreas de la producción de los animales debería ser mejorada para obtener resultados favorables, acordes con los estándares internacionales vigentes.

Por lo que es necesaria la implementación urgente de la guía de Buenas Prácticas de Producción de *Mus musculus* en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, guía propuesta en la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ÁLVAREZ M; BOQUET y colaboradores.**; 1995.; Manual de Técnicas en Microbiología clínica.; 2^a ed.; Graficart; Quito – Ecuador. pp -166-168
2. **ÁLVAREZ, ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA.** Guía para el cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio. ILAR (Institute of Laboratory Animal Resource). National Research Council. Mexicana. Washington, D.C – Estados Unidos.; 1996. pp 254-307
3. **ÁLVAREZ DÍAZ JA, Cardozo CA.** Ética de la investigación biomédica que usa y cuida animales experimentales. Trad. del inglés; Quezada, F.% Lolas, A.% Rodríguez, A. Dimensión Ética. Santiago de Chile - Chile; 2006. pp 108-120
4. **AMERICAN ASSOCIATION FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE (AALAS).** Training Manual Series, Vol. I., Assistant Laboratory Animal Technicians. AALAS Pub. N° 89-1. Joliet, 111.: American Association for Laboratory Animal Science; 1989. pp 20-22
5. **AMERICAN INSTITUTE OF ARCHITECTS COMMITTEE** on Architecture for Health. Guidelines for Construction and Equipment of Hospitals. 2nd ed. Washington D.C.: American Institute of Architects Press; 1987. pp 45-55

6. ANIMAL WELFARE INSTITUTE. Comfortable Quarters for Laboratory Animals, rev. ed. Washington-Estados Unidos, Animal Welfare Institute; 1979 pp 254-307
7. MARSHALL, L.G. Evoluion of South American Marsupials, Mares, Genoways Londres-Inglaterra 1982. pp 188-17
8. ATLA. Alternatives to Laboratory Animals. Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments, Canada. FRAME 1995; pp 23.
9. ATLA. Alternatives to Laboratory Animals. Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments. Canada. FRAME 2004; 32 Suplemento 1A. pp 12-15.
10. BEAUCHAMP TL, Childress JE Principios de la etica biomedica. Barcelona – España, Masson; 1999. pp 278-283.
11. BENAVIDES FJ, Guenet JL. Manual de genética de roedores de laboratorio: prindpios bdsicosy aplicaciones. Madrid - España: Universidad de Alcala; 2003. pp 437-550
12. BENJAMIN MM. Outline of Veterinary Clinical Pathology. 3. ed.. Londres-Inglaterra. Ames: Iowa State University Press ; 1978. pp 73-77

- 13.** CAGLIADA P.; Importancia del Uso de los animales de Laboratorio Estandarizados. (tesis) (Dr. Vetr.) Mar del Plata - Argentina. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias. 2007, pp 45-53
- 14.** CANADIAN Council on Animal Care. Categories of Invasiveness in Animal Experiments. Guide to the Care and Use of Experimental Animals (Guia) 2. ed. Canada, Appendix, 1993, pp 73-75
- 15.** CARDOSO TAO. Programa arquitetônico de biotérios. In In: Teixeira P, org. Curso de Aperfeiçoamento em Biossegurança. Brasil, EAD/Ensp, 2000. pp . 21-42
- 16.** CARDOZO DE MARTINEZ CA, Mrad de Osorio A. Alternativas en la experimentación con animales. Madrid-España, ANILAB 1999; pp. 3.
- 17.** CARLSON WT, Schneider G, Rogers J. Laboratory Animal Welfare Bibliography. Beltsville, Washintong-EEUU. Department of Agriculture, National Agricultural Library; 1988. pp 88
- 18.** CENTERS for Disease Control and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 3. ed. Washintong-EEUU. Department of Health and Human Services; 1993. pp 33-42.

- 19.** CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Temas seleccionados sobre medicina de animales de laboratorio: El ratón. Río de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. (Monografía), Serie de Monografías Científicas y Técnicas, (# 3); Rio de Janeiro – Brasil, 1988. pp 66-69
- 20.** CIOMS International guiding principles for biomedical research involving animals. In: Smith JA, Boyd KM, New York – Estados Unidos, Oxford University Pres, 1985. pp 259
- 21.** CONSEJO Canadiense de Protección de los Animales. Manual Sobre el Cuidado y Uso de los Animales de experimentados. Canada, 2. Ed. 1998. pp 20-25
- 22.** CONSEJO de las Comunidades Europeas. Lineas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales. Barcelona – Espana, 1993. pp 90-98.
- 23.** DÁVILA AG, ZÚÑIGA JM.; Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Madrid – España, McGraw Hill, 2001. pp. 3-22.
- 24.** DAVIS H, Balfour D. The Inevitable Bond: Examining scientist-animal interactions. Department of Health, Education and Welfare

Cambridge: Cambridge University Press; 1992.pp 346-349

- 25.** DIVISION of Research Resources (DRR), National Institutes of Health (NIH).
Cost Analysis and Rate Setting Manual for Animal Resource
Facilities. Washington, Department of Health, Available from ARP;
1979. pp 300-312
- 26.** EUROPEAN Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). The
Use of Transgenic Animals in the European Union. The Report and
Recommendations of ECVAM Workshop 28. ATLA 1998; pp 21-43.
- 27.** FERNÁNDEZ, A. La bioseguridad en la industria de producción de alimentos
para los animales. Curso Internacional de Bioseguridad en las
instalaciones Veterinarias, Chile, 2008. pp 1-10
- 28.** FLECKNELL PA. The Relief of Pain in Laboratory Animals. Laboratory
Animal 1984; pp 18:147-160.
- 29.** GLUCKSTEIN FP. Pain, Anesthesia, and Analgesia in Common Laboratory
Animals Bibliography, January 1987 - May 1988. Bethesda, Md.:
National Library of Medicine (Publication #88-6); pp 28-30.
- 30.** ILAR(Institute of Laboratory Animal Resources) Committee On Education.
1979. Laboratory Animal Medicine: Guidelines for Education and

Training. pp 120-123.

- 31.** INNES JRM, Saunders LZ, (eds). Comparative Neuropathology. New York: Academic Press; 1962. pp 22-43
- 32.** INSTITUTE of Laboratory Animal Resources (ILAR) Committee on Laboratory Animal Diets. Control of Diets in Laboratory Animal Experimentation. ILARNews 1978; 21(2): A1-A12. pp 43-56.
- 33.** INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES (ILAR). The Future of Animals, Cells, Models, and Systems in Research, Development, Education and Testing. Proceedings of a symposium organized by an ILAR committee. Washington, D.C.: National Academy of Sciences; 1977: pp 343.
- 34.** INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES, National Research Council. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Edición Mexicana. Washington: Nacional Academy Press; 1999. Pp 198.
- 35.** KITCHELL RL, Erickson HH, Carstens E, Davis LE. Animal Pain. Perception and Alleviation. MD.: American Physiological Society; 1983. pp 120-123.

- 36.** LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATION. Surgical Procedures.
En: Guidelines on the Care of Laboratory Animals and Their Use for .
London: Universities Federation for Animal Welfare; 1990. pp 57-58.
- 37.** LACADENA JR. Los Derechos de los Animales. Madrid: Universidad Pontificia Comillas; 2002. pp 5.
- 38.** LUGO, S and Riera, L. Programa de Monitoreo de Control de la Calidad. CENPALAB. 07/09. 2009. pp 1-39
- 39.** MÁRQUEZ, Rosa de Jesús. Determinación de la cultura sobre el uso de los animales de laboratorio existentes en los investigadores de la Universidad de los Andes. Tesis de Doctorado. Universidad de los Andes. 1997. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Mérida. Venezuela. Pp 23-25.
- 40.** MENDEZ, G, Romero S. Characterization of Housing and Production Laboratory Animal Facility of Chile: Comparison between Metropolitan Region and Provinces. Santiago de Chile: Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile; 2004. pp 367-389.
- 41.** MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. Código de bioética y seguridad. 2ª ed. Caracas: FONACYT/ Ministerio de Ciencia y Tecnología;

2002. Disponible en: <http://www.fonacit.gov.ve/bioetica.asp>. pp 120-123.

42. MORTON DB, Griffiths PHM. Guidelines on the recognition of pain, distress and hypothesis for assessment. Vet. Rec. 1985; pp 116: 431-436.

43. MIRANDA, Rosenkranz A. Guia para el uso de animales de laboratorio. Universidad National de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia; 1990: pp 4-12.

44. MIRANDA DE OSORIO A y ROSENKRANZ A.; 1990.; Guía para el Uso de Animales de Laboratorio. Parte I.; Departamento de Farmacia.; Facultad de Ciencias.; Universidad Nacional de Colombia.; Bogotá – Colombia.; pp. 4 – 65.

45. NAMURA, T. (1990) Progresos y Perspectiva en la experimentación animal. Rev. Experimentación Animal pp 17

46. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules. Federation Regist 1984; pp 49.

47. NATIONAL Research Council (NRC). Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals. A report of the Institute of Laboratory Animal. Washington, D.C.; 1992. pp 345-357.

- 48.** NATIONAL Research Council: Prudent Practices for Handling and Disposal of Infectious Materials. Committee on Hazardous Biological Substances in the Laboratory. Washington, D.C.; 1989. pp 211-222.
- 49.** OSORIO,M. and Rosenkranz,A. (1990) Animales de laboratorio: Estado actual de la ciencia y la tecnología a nivel internacional y en Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Química Farmacéuticas. pp 7-12
- 50.** QUEZADA A. Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán; 1997. pp 15-17
- 51.** RAO, GN. New nonpurified diet (NTP-200) for rodents in the national toxicology Program's toxicology and carcinogenesis studies. J. Nutr 1997; pp 127-139
- 52.** RIERA L. Animales libres de patógenos específicos. La Habana: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio; 2006. pp 153-160
- 53.** RIERA, O. Layna. Control microbiológico a roedores de laboratorio SPF. Tesis de Maestría. 2001. Facultad de Biología. Universidad de la

Habana. Cuba. pp 73-76.

- 54.** RODRÍGUEZ, J. C. Ciencia de los Animales de Laboratorio en Cuba. Retos y perspectivas en el siglo XXI. Ciencia de los Animales de Laboratorio en Cuba. Retos y perspectivas en el siglo XXI. 2001. Memorias del II Congreso AMCAL. 5-7 diciembre, 2001. México. pp 120-123.
- 55.** RUSSELL WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Techniques. London: Methuen & Co.; 1959. pp 45-56.
- 56.** Servicio Nacional de Salud Agraria (SENASA), Servicio Nacional de salud. La calidad de los animales de laboratorio y su influencia en las pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad. Lima: Senasa; 2004. pp 22-24.
- 57.** SIMMONS ML, (ed). Biohazards and Zoonotic Problems of Primate Procurement, Quarantine and Research., Vol. 2. Pub. N° 76-890. Washington, D.C.: U.S. Department of Health, Education.: 1975. pp 76-78.
- 58.** THE MOUSE IN BIOMEDICAL RESEARCH (Volumes I–IV), edited by H. L. Foster, J. D. Small, and J. G. Fox, 1981 (Vol. I), 1982 (Vol. II), 1983 (Vol. III), 1984 (Vol. IV). Academic Press, Inc., pp 33-34.

59. ZUÑIGA J, TUR M, MILOCCO S, PIÑEIRO R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. México: McGraw-Hill Interamericana, 2001; pp. 682.

60. ZÚÑIGA M., Jesús. Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal. Ed. McGraw-Hill- Interamericana. Madrid (España). 2001. pp 109-153.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

61. ANIMALES DE LABORATORIO.

<http://www.hulp.es/secal/secal.html>

(2009 – 05 – 23)

62. ANIMALES LIBRE DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS

<http://www.monografias.com/trabajos42/animales-de-laboratorio/animales-de-laboratorio.shtml>

(2010 – 06 – 25)

63. ASPECTOS ÉTICOS DE EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

<http://cbioetica.org/revista/72/722527.pdf>

(2010 – 06 – 24)

64. BIOLOGÍA DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

<http://www.upo.es/laboratoriodeciencias/Contenidos/descargas>

(2010 – 03 – 01)

65. BIOTERIO

<http://avindustrias.com/files/BIOTERIO.ppt>

(2010 – 02 – 10)

66. BIOTERIOS: DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN

<http://www.fcv.unlp.edu.ar.html>

(2010 – 03 – 22)

67. CENTRO DE EXPERIMENTACIONES BIOLÓGICAS Y BIOTERIO

<http://www.fcv.unl.edu.ar/bioterio/Folleto%20CEBB.pdf>

(2010 – 04 – 12)

68. CLASIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE ANIMALES DE LABORATORIO

<http://www.fcv.unlp.edu.ar.html>

(2010 – 03 – 01)

69. COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES

<http://www.cicuae.edu.ar/bioterio/Folleto%20CEBB.pdf>

(2010 – 04 – 12)

70. DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DE LOS ANIMALES.

<http://www.me.gov.ar/efeme/diaanimal/derecho.html>

(2010 – 06 – 04)

71. EL RATÓN

www.sociemuna.com/wp-content/uploads/.../mus-musculus.pdf

(2010 – 02 – 10)

72. ÉTICA CON ANIMALES EN LA EXPERIMENTACIÓN

<http://issuu.com/fcastro/docs/fernandcastro.org>

(2010 – 06 – 23)

73. ÉTICA DEL MANEJO E ANIMALES DE LABORATORIO

<http://www.aalas.org.html>

(2010 – 06 – 20)

74. ÉTICA Y LEGISLACIÓN COMPARADA EN EL USO DE ANIMALES

<http://biografias.bcn.cl/alegislativo/pdf/cat/docs/1721-12/313.pdf>

(2010 – 06 – 24)

75. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL ÉTICA Y PRINCIPIOS

www.petaenespanol.com

(2010 – 02 – 21)

76. GUÍA PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO.

<http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/careuse.htm>

(2010 – 04 – 03)

77. GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS

<http://www.nap.edu/catalog/5140.html>

(2010 – 01 – 23)

78. HISTORIA NATURAL DEL RATÓN DE LABORATORIO

<http://www.ratlife.org/Home/Generalsections/Languages/Spanish.htm>

(2009 – 01 – 11)

79. INTERNATIONAL COUNCIL FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE.

<http://www.iclas.org>

(2009 – 12 – 13)

80. LA ALERGIA EN LOS BIOTERIOS: UN RIESGO SIEMPRE PRESENTE.

<http://www.bioterios.com/index.php/Articulos/Alergia.htm>

(2009 – 03 – 12)

81. LIBERACIÓN ANIMAL

www.animalsvoice.com

(2010 – 06 – 25)

82. MAMMALIAN BIOLOGY OF SOUTH AMERICAN.

www.ciens.ula.ve/~cires/recol-v3n1a07.pdf

(2010 – 06 – 23)

83. MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO GINEBRA

2005. Organización Mundial de la Salud (OMS)

http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9243546503_spa.pdf

(2010 – 02 – 15)

84. MANUAL DE CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

<http://www.ccac.ca.html>

(2010 – 02 – 15)

85. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DEL ECUADOR.

Proceso de ciencia y tecnología en salud

http://www.pcyt.gov.ec/index.php?option=com_jombib&task=showbib&id=3

(2010 – 03 – 11)

86. MINISTERIO DE SALUD. Reglamento para la gestión y manejo de los desechos sólidos procedentes de los Establecimientos de Salud.

<http://www.cepis.ops-oms.org/cursoreas/e/fulltext/manejoreshos.pdf>

(2009 – 12 – 13)

87. MIRADA CRITICA A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

http://www.mrmcmed.Org/Critical_Look.pdf

(2010 – 03 – 01)

88. *Mus musculus*

<http://alauairum.foros.ws/t120/rata-noruega-rattus-norvegicus/>

(2010 – 07 – 01)

89. *Mus musculus*.

<http://64.233.169.104/search?q=cache:EIX1D2uO0ScJ:www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/.pdf+mus-smusculus&hl=&cd=2&gl=ec>
(2010 – 06 – 22)

90. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999,

Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

<http://www.senasica.gob.mx/?doc=743>
(2010 – 03 – 11)

91. NORMAS ÉTICAS PARA EL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO

<http://www.eurca.org/>
(2010 – 04 – 12)

92. NUTRICIÓN DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

<http://www.fcv.unlp.edu.ar>
(2010 – 03 – 22)

93. PERCEPCIÓN HUMANA

<http://geocities.com/CapeCanaveral/Hangar/4434/apendic7.html>
(2010 – 06 – 25)

94. PRÁCTICAS ESPECIALES.

http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/Spanish/V1_93/CHAP/CHVII.HTM

(2010 – 03 – 24)

95. PRINCIPIOS BÁSICOS DEL MANEJO DE ANIMALES DE LABORATORIO

<http://64.233.169.104/search?q=cache:31M13V6SwsAJ:www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/grupo/rbioterio.PDF+animales+de+laboratorio+estandarizados&hl=es&ct=clnk&cd=gl=ec>

(2009 – 06 – 22)

96. PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS USO VETERINARIO

<http://www.inh.gov.ec/?pageIndex=88>

(2009 – 02 – 09)

97. PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES PARA LA EXPERIMENTACIÓN.

<http://europa.eu/scadplus/leg/es/lvb/l28104.htm>

(2010 – 02 – 21)

98. QUÉ ES UN BIOTERIO

<http://es.wikipedia.org/wiki/Bioterio>

(2010 – 02 – 10)

99. REGLAMENTO DE CREACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL CICUAL

<http://www.consejouniversitario.bua/legisla/ReglamentoBioterio.pdf>

(2010 – 03 – 11)

100. TRABAJO CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/NTP/Ficheros/ntp468.pdf>

(2010 – 03 – 01)

101. USO DE ANIMALES DE LABORATORIO DE EXPERIMENTACIÓN

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107/010711.ppt>

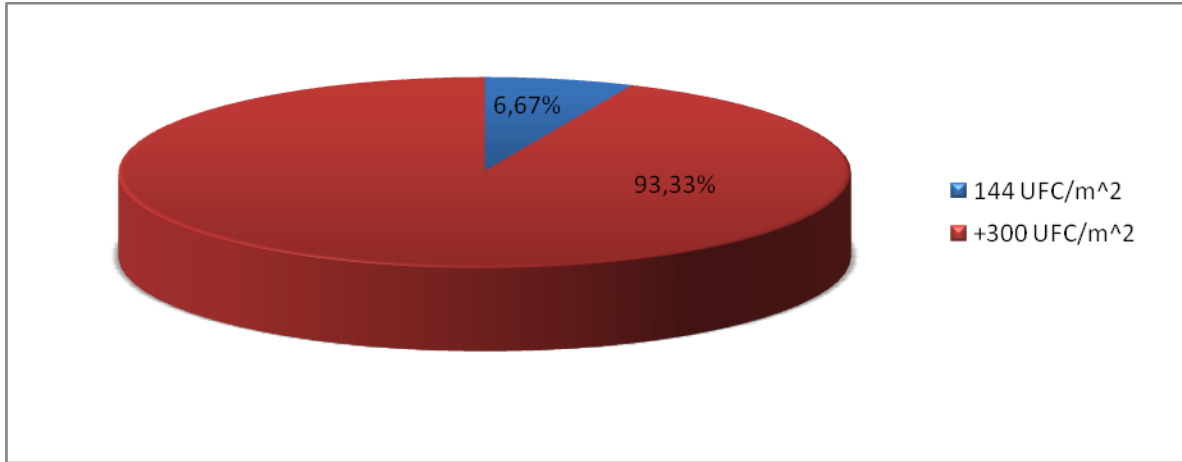
(2010 – 03 – 22)

ANEXO 1

GRÁFICOS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS

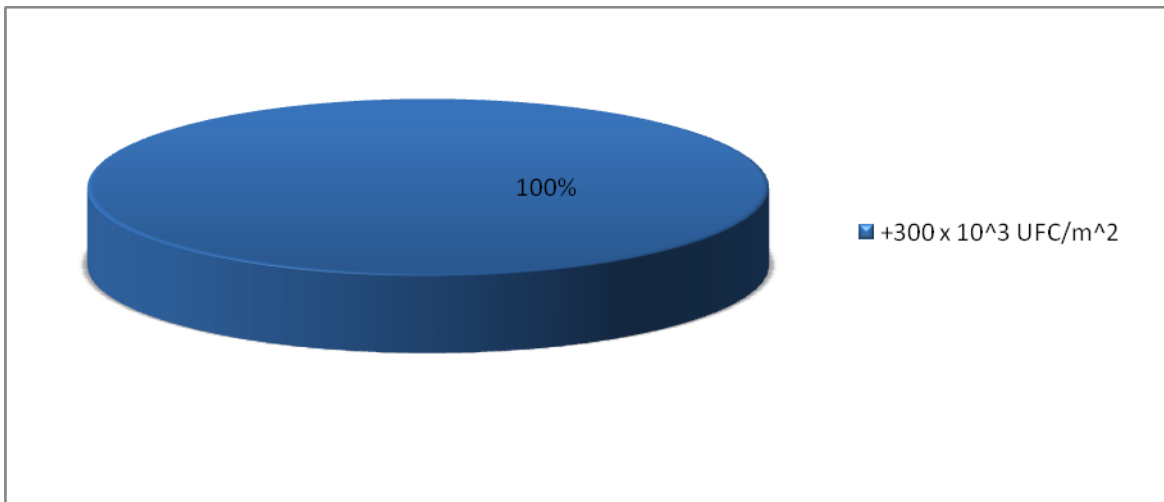
RESULTADOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

MUESTRA: AMBIENTE



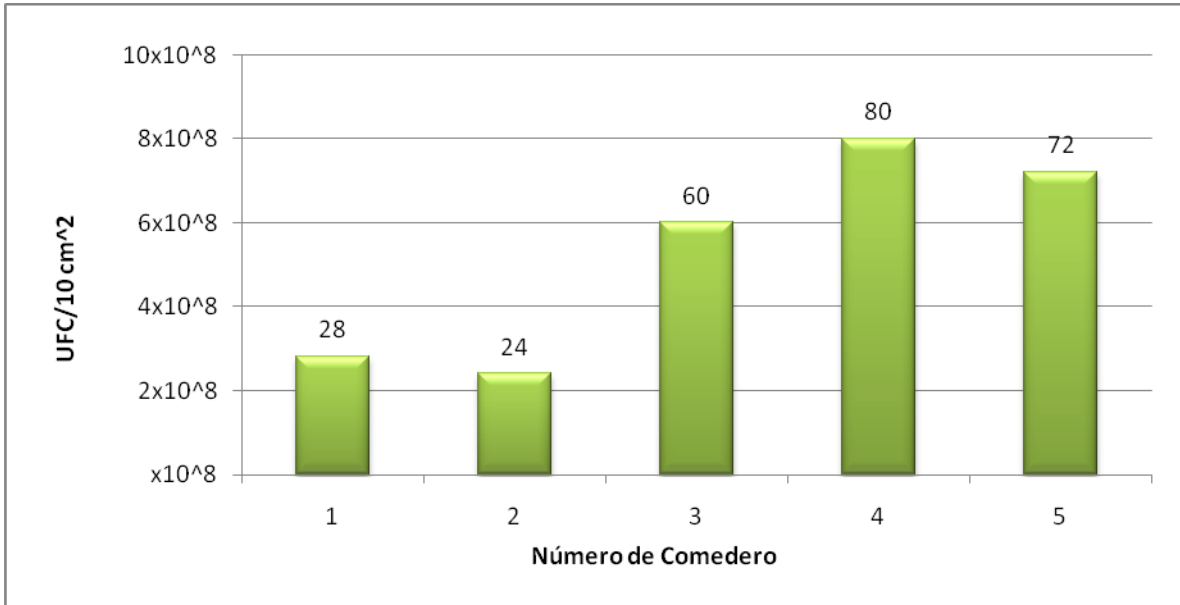
RESULTADOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

MUESTRA: ESTANTERÍAS



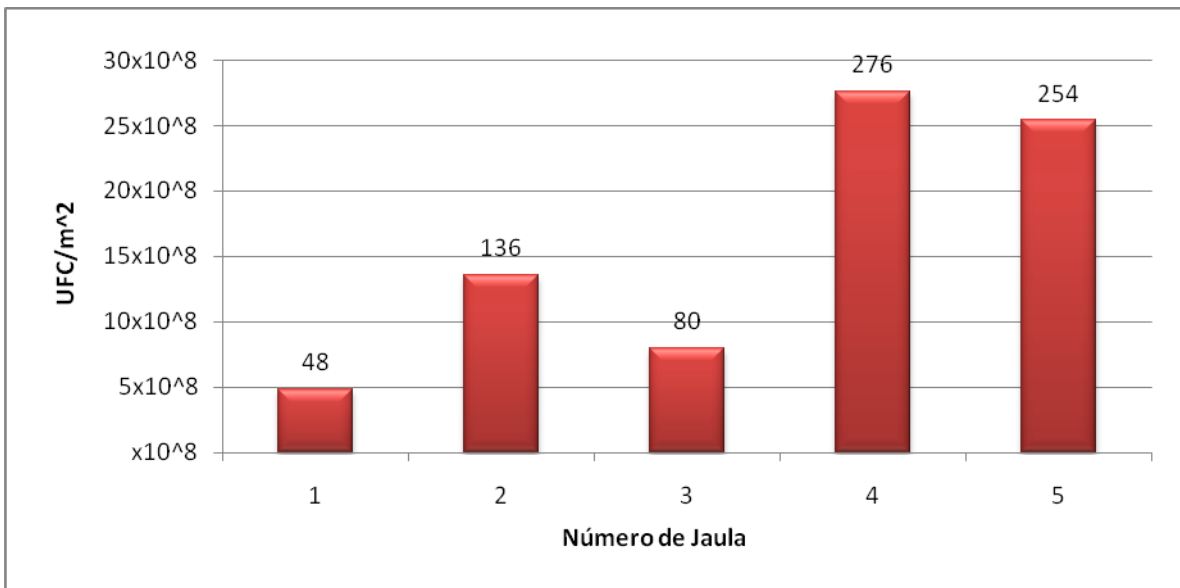
RESULTADOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

MUESTRA: COMEDEROS



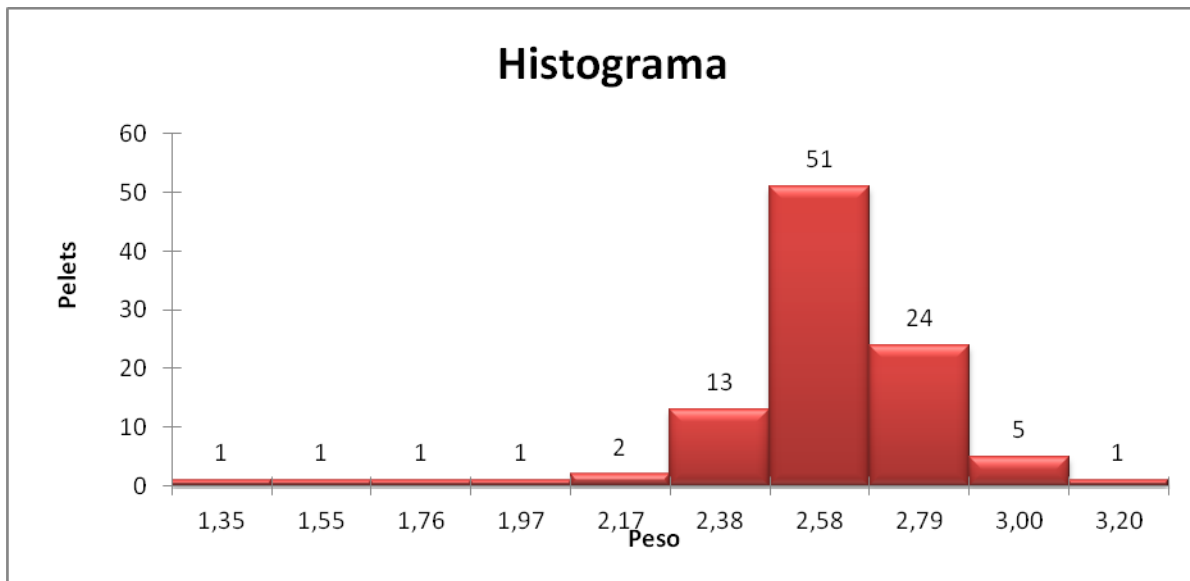
RESULTADOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

MUESTRA: JAULAS



RESULTADOS EXAMEN FÍSICO

MUESTRA: PELLETS



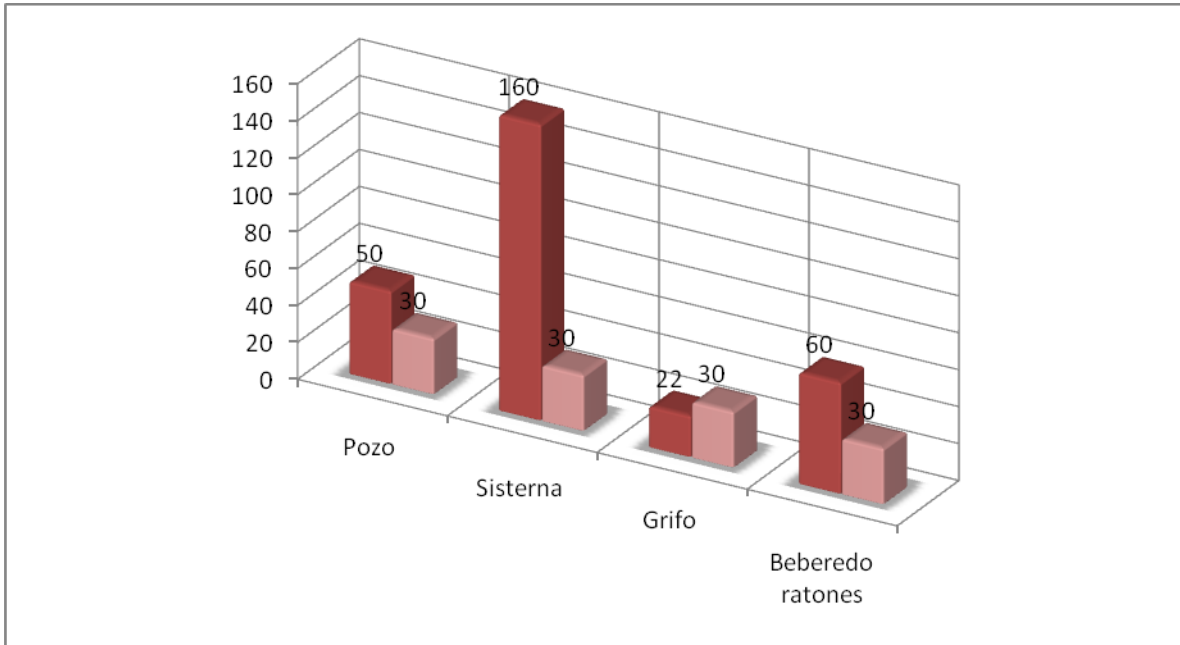
RESULTADOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

MUESTRA: PELLETS

MUESTRA NÚMERO	TEMPERATURA	pH	ENTEROBACTERIAS	COLI TOTAL	E.COLI	MOHOS Y LEVADURAS
1 (EN USO)	20 °C	7	MNPC	MNPC	MNPC	40%
2 (SELLADOS)	19°C	6.8	MNPC	MNPC	MNPC	30%
3 (COMEDEROS)	21°C	6.9	MNPC	MNPC	MNPC	70%

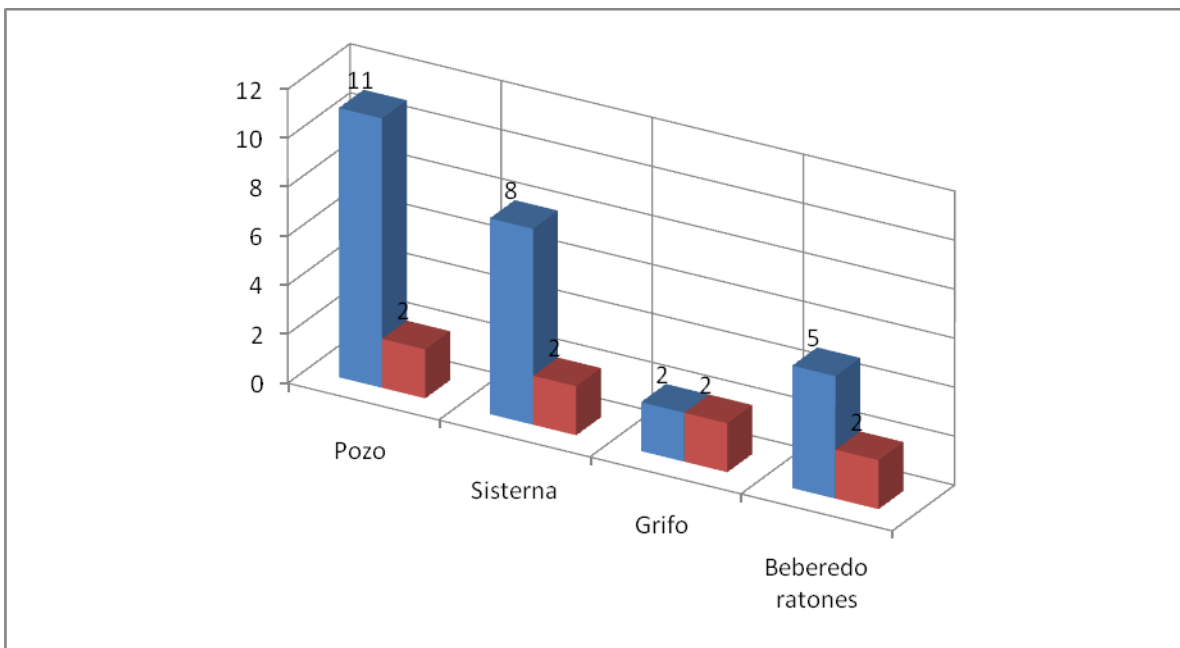
RESULTADOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO AEROBIOS

MUESTRA: AGUA



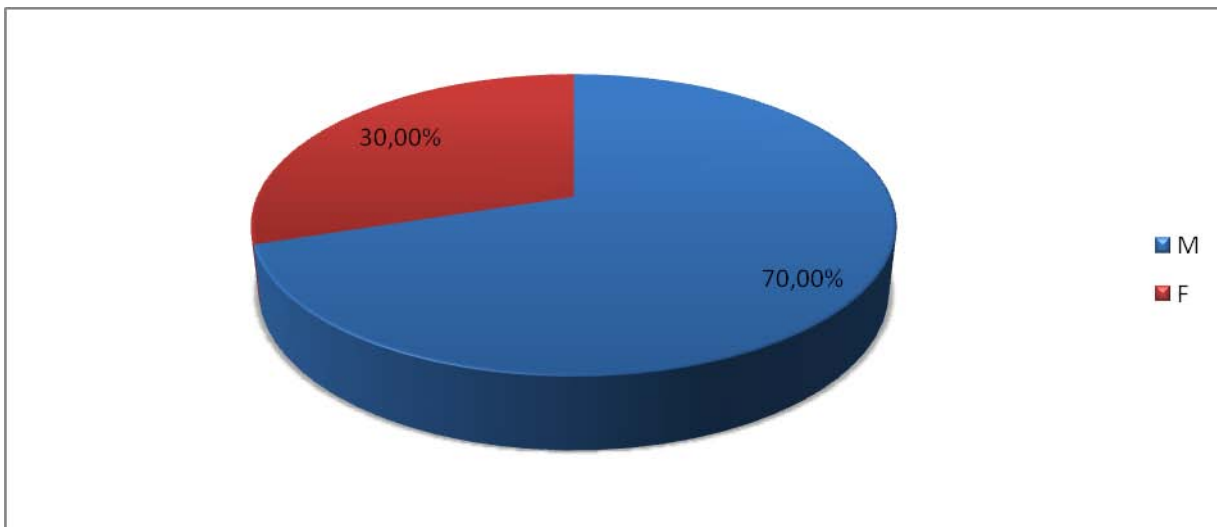
RESULTADOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO COLI TOTALES

MUESTRA: AGUA



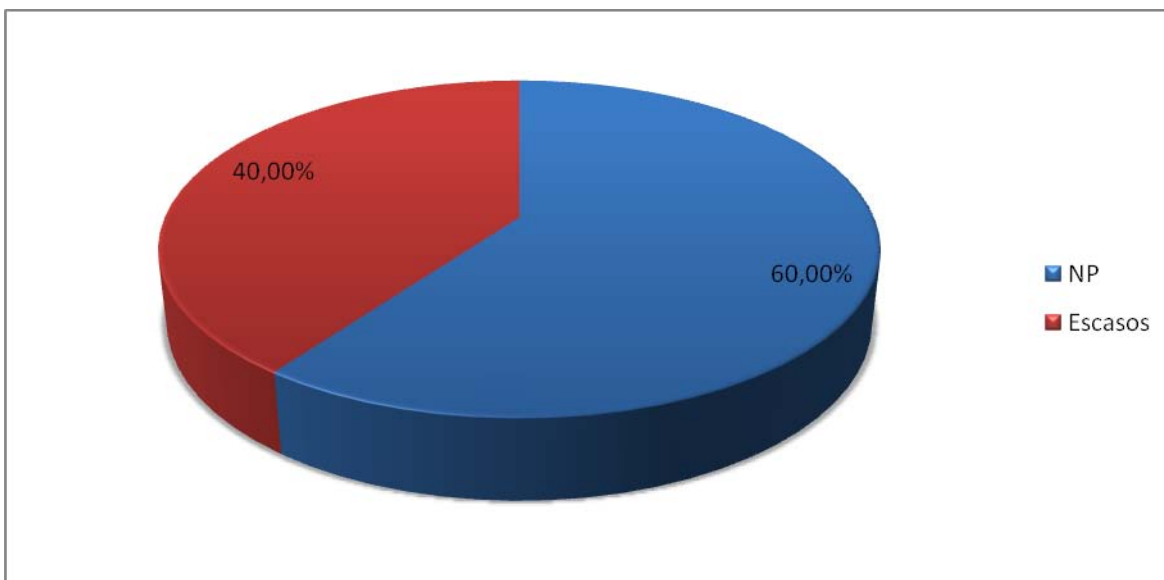
RESULTADOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

MUESTRA: RATÓN



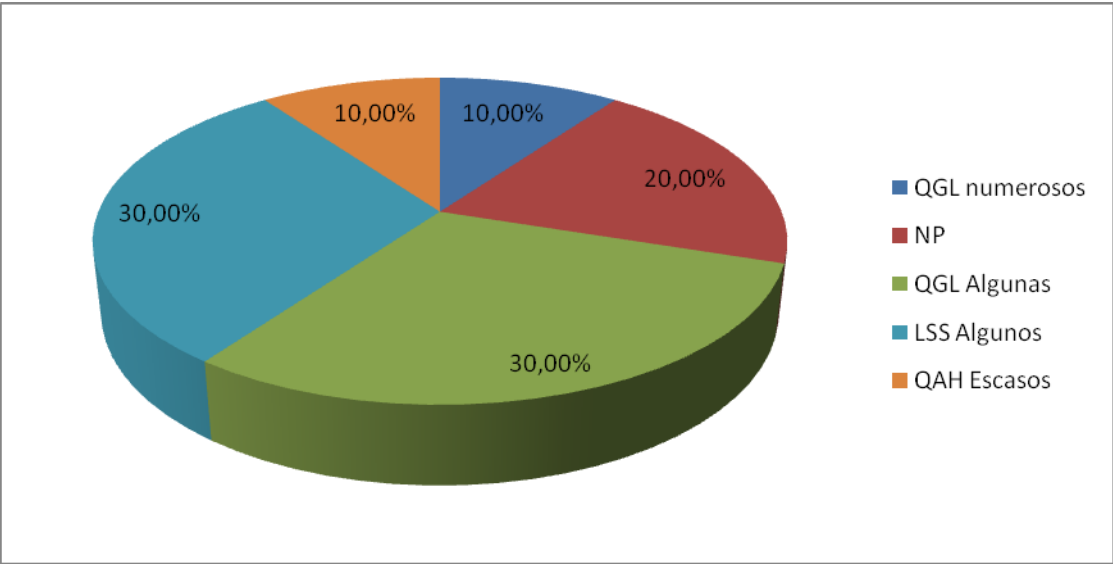
RESULTADOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN ECTOPARÁSITOS

MUESTRA: RATÓN



RESULTADOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN PARÁSITOS

MUESTRA: HECES RATÓN



ANEXO 2



BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO

RATÓN



Angela Mazón

CAPITULO 1

1. MARCO TEÓRICO

El animal de laboratorio tiene que ser respetado como ser vivo, entender que padece necesidades y sufre dolor, por ley es obligación del personal que lo cuida, mantiene y utiliza (investigador), asegurar su bienestar y confort mientras viva.

1.1. EL ANIMAL DE LABORATORIO

El animal de laboratorio es aquel que:

- Es engendrado y producido en condiciones controladas.
- Mantenido en un entorno controlado.
- Posee claros antecedentes genéticos y microbiológicos.
- Existe una comprobación sistemática de estos antecedentes.

También es definido como cualquier especie animal que, mantenido bajo determinadas condiciones controladas es utilizado como instrumento de medida en experimentación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y docencia, para la generación de datos, los cuales son utilizados como información. Ejemplo de estas especies son: el ratón, la rata, el hámster, el conejo, el perro, el mono etc.

1.2. EL RATÓN, SU TAXONOMÍA Y USO COMO ANIMAL DE LABORATORIO

TAXONOMÍA

Clase: Mammalia

Familia: Muridae

Género: Mus

Especie: *Mus musculus*.

Ventajas de su uso como animal de laboratorio:

- De fácil cuidado y mantenimiento, por su pequeño tamaño.
- Bajos costo de manutención.
- Cepa definida.
- Diversidad de características específicas que sirven como modelo

- Por su vida relativamente corta es excelente para su uso en ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, farmacología, etc.
- Eficiencia reproductiva
- Corto tiempo de generación.

Desventajas:

- Dificultad en la recolección de material biológico.
- Dificultad la administración de drogas.
- Dificultad en las técnicas quirúrgicas.



Fuente: Bioterio Central – CNPB del INS. 2007

Ratón albino

1.3. CEPA

Población de una misma especie, descendiente de un mismo origen; conservada por medio de una serie de pasos o cultivos.

Ejemplos:

RATON BALB/c (*Mus musculus*)

RATON AKR (*Mus usculus*)

RATON NIH (*Mus musculus*)

Todas estas cepas se usan ampliamente en estudios de toxicología, farmacología y en pruebas de seguridad.

1.4. CLASIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA

Los animales de laboratorio se clasifican de acuerdo a la presencia o ausencia de microorganismos patógenos. Los patógenos por controlar son parásitos, virus, bacterias y hongos.

CATEGORÍA I: Animal Haloxénico (tradicionalmente Convencional)

Animales mantenidos sin ningún proceso especial (instalaciones abiertas) tradicionalmente llamados Convencionales. Deben estar libres de toda evidencia de enfermedades infecciosas especialmente transmisibles al hombre, tanto en el examen clínico como post – mortem.

Se refiere a las siguientes entidades biológicas:

- Toda *Salmonella* y *Shigella*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Yersinia pseudotuberculosis*
- *Leptospira spp*
- Dermatofitos
- *Sarcoptes scabiei*.

CATEGORÍA II: Animal Miroxénico.

Son comparables a los animales convencionales mantenidos bajo condiciones sanitarias estrictas y estándares. Los mismos albergan una fracción inoculada de microorganismos no patógenos tomadas de la microbiota de un haloxénico; deben mantener o ser del mismo *status* de la Categoría I y además estar libres de:

- *Listeria monocytogenes*
- *Bacillus piliformis*
- Estadios intermedios de Céstodos y de Artrópodos parásitos obligados.
- Especies determinadas demandan la ausencia de los Virus: *Ectromelia* (Ratón)

CATEGORÍA III: "Animal Gnotobiótico con microbiología definida"

Son comparables a los animales derivados de cesárea (Axénicos) a los que se les introducen voluntariamente especies microbianas conocidas. Deben ser del mismo *status* de la Categoría II y además estar libres de:

- *Bordetella bronchiseptica*
- Toda *Pasteurella*

- Todas las Coccidias (*Eimerias spp*) y Helmintos patógenos

Además especies determinadas demandan la ausencia de:

- *Streptobacillus moniliformis* (Ratones y Ratas)
- *Corynebacterium kutscheri* (Ratones)
- *Streptococcus pneumoniae*
- Todas las especies de *Mycoplasma* (Ratones y Ratas)

CATEGORÍA IV: Animal Heteroxénico (Libre de gérmenes patógenos, SPF)

Son comparables a los animales descritos como libres de gérmenes patógenos específicos (*Specific Pathogens Free, SPF*). Estos son derivados de un Axénico o Gnotobiótico que adquiere una microbiota proveniente de su medio, son mantenidos en Zonas Protegidas (sistemas cerrados). Deben ser del mismo *status* de la Categoría III y además estar libres de:

- Estreptococos (excepto Grupo D)
- Neumococos
- Helmintos
- Protozoos patógenos
- Virus que afectan estas especies

CATEGORÍA V: Animal Axénico (Libre de gérmenes, GF)

Son animales que no albergan ninguna especie microbiana viviente detectable. Los mismos son el resultado del uso de sistemas cerrados estériles y son libres de todo organismo demostrable (virus, bacterias, hongos, parásitos y organismos saprófitos). Son conocidos como animales "Germ Free" o "Axénicos", los cuales son derivados por histerotomía (cesárea) o histerectomía aséptica, criados y mantenidos en un aislador mediante técnicas "Gnotobióticas". Estos animales no siempre se obtienen en la práctica, debido a los agentes transmitidos verticalmente.

Este esquema de clasificación por categorías ha sido sujeto a revisiones regulares y a pesar de algunos cambios menores en cuanto al establecimiento y definición de las

entidades microbianas (bacterias, hongos, parásitos y virus) que deben o no estar presentes según la categoría específica, el mismo ha resistido la prueba del tiempo.

1.5. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL RATÓN

El ratón doméstico es una especie cosmopolita, se adapta a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas muy frías hasta regiones tropicales. En general, las especies prefieren ambientes más secos que húmedos.

El ratón es un mamífero de sangre caliente, de hábitos nocturnos y su comportamiento está influenciado por feromonas. Posee un agudo sentido de la audición, por lo que se alteran rápidamente con los ruidos, es por ello que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan. Su sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar comida y depredadores, sino también para percibir un orden social.

Su visión es muy pobre y no pueden percibir los colores. En la órbita del ojo posee unas glándulas con forma de herradura llamadas glándulas Harderianas, cuando el ratón está en estrés, excreta en la zona periocular una sustancia de color marrón llamada porfirina. El sistema social depende de la densidad de población, viven en grandes colonias y el rango social está bien desarrollado. Generalmente, son muy dóciles a excepción de algunas cepas exocriadas que mantienen su agresividad, al igual que sus antecesores salvajes.

Por su pequeño tamaño son muy susceptibles a cambios ambientales, puesto que una variación de la temperatura entre 2 a 3°C, puede afectar su temperatura corporal y modificar su fisiología. El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola; el largo de la cola es igual al largo del cuerpo y con un peso aproximado de 30 gr. Las crías al nacer tienen un peso aproximado de 1 a 2 g y gana rápidamente peso durante la lactancia. Tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se obtiene de ocho a diez camadas.

DENTICIÓN

- La fórmula dental del ratón es 2 (1 / 1 incisivos, 0/0 caninos, 0/0 premolares, y 3/3 molares).

- Los incisivos están continuamente creciendo y si crecen en exceso produce oclusión.

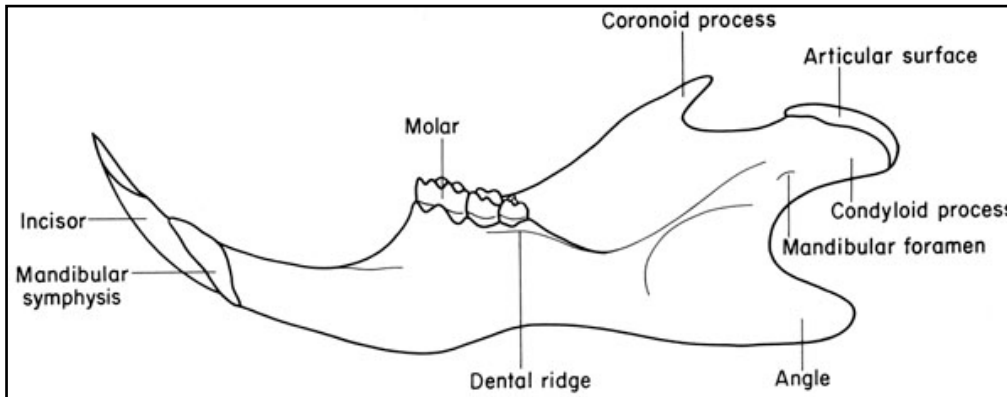


FIGURA 1: DENTICIÓN DEL RATÓN.

Fuente: <http://www.upo.es/laboratoriodeurociencias/Contenidos/>

ESQUELETO

- La fórmula vertebral normal es C28 C7 T13 L6 S4.
- El ratón tiene normalmente 13 pares de costillas. Los 7 pares craneales son "verdaderas" y las costillas se articulan con el esternón. Además, hay 6 pares de costillas "falsas", las 3 últimas son "libres" o "flotantes" sin ningún vínculo con otras estructuras óseas.

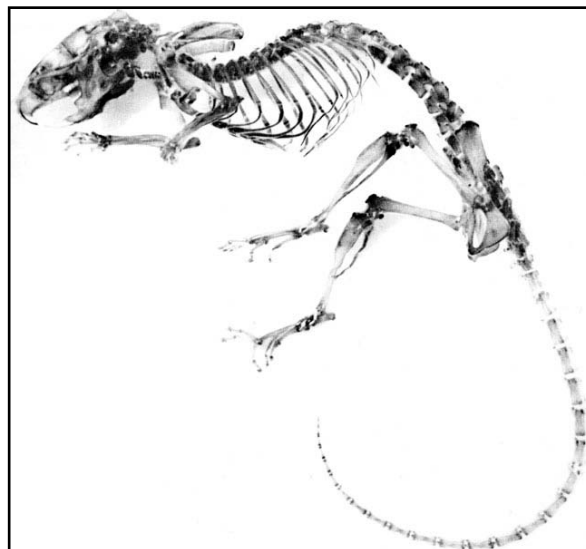


FIGURA 2: ESQUELETO DEL RATÓN

Fuente: <http://www.upo.es/laboratoriodeurociencias/Contenidos/>

CARACTERÍSTICAS EXTERNAS

- Las patas delanteras y traseras tienen cinco dígitos cada una.

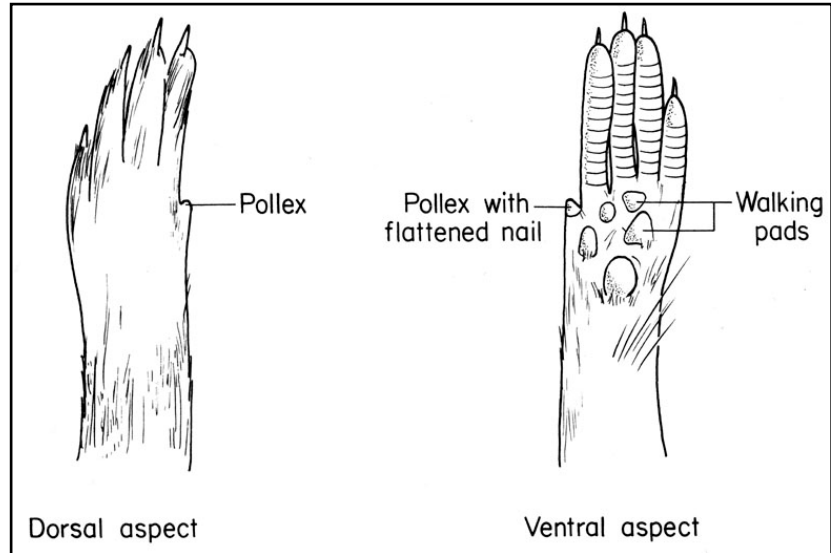


FIGURA 3: PATAS DELANTERAS

Fuente: <http://www.upo.es/laboratoriodeciencias/Contenidos/>

- El ratón hembra tiene cinco pares de pezones en el tórax ventral (tres pares) y abdomen (dos pares).

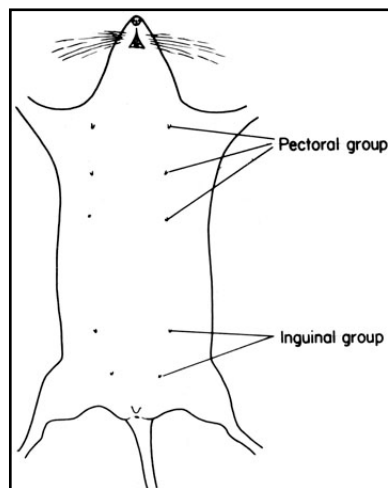


FIGURA 4: CARA VENTRAL DE LA POSICIÓN DE LOS PEZONES DE LAS HEMBRAS

Fuente: <http://www.upo.es/laboratoriodeciencias/Contenidos/>

SISTEMA GASTROINTESTINAL

- El tubo digestivo es similar al de otros mamíferos y consiste en el esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon y recto.
- El estómago se divide en secciones: cardíaca (no glandular) y pilórica (glandular). La porción no glandular está revestida por epitelio.
- El ratón no tiene un apéndice.

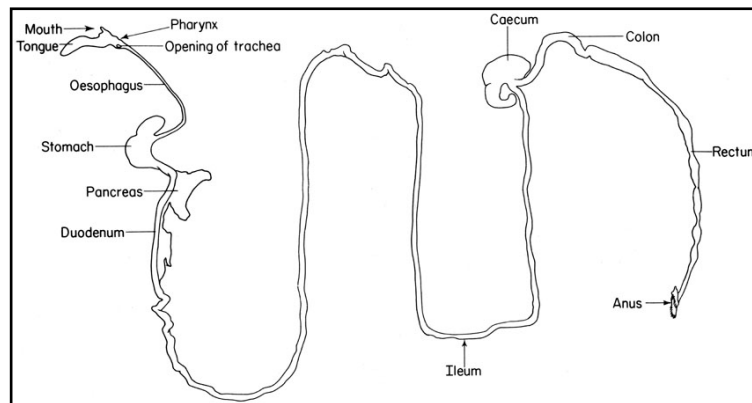


FIGURA 5: TUBO DIGESTIVO

Fuente: <http://www.upo.es/laboratoriodeurociencias/Contenidos>

SISTEMA UROGENITAL

- El riñón derecho está normalmente por delante del riñón izquierdo.
- En los machos el conducto inguinal permanece abierto y los testículos pueden introducirse en la cavidad abdominal. Los machos suelen tener un pequeño hueso en la uretra cerca de la punta del pene. Las glándulas prepuciales son dos estructuras similares que se encuentran por vía subcutánea, cerca de la punta del prepucio.
- En las hembras el tracto reproductor incluye dos cuernos uterinos que se combinan para formar el corpus mediana. Las glándulas del clítoris se encuentran por vía subcutánea justo lateral a la abertura de la uretra. Al igual que con las glándulas del prepucio, en ocasiones se encuentran abscesos.
- La placenta es hemocorial.
- La orina normalmente es transparente, amarilla y muy concentrada (hasta 4,3 osmoles / kg).

- Grandes cantidades de proteínas son normalmente excretadas en la orina de ratones, incluyendo uromucoide, alfa y beta globulinas, y las principales proteínas urinarias.
- El pH de la orina del ratón normal es de aproximadamente 5,0.
- La inmunoglobulina materna se transfiere a las crías a través de la placenta y en el epitelio intestinal de calostro durante 16 días después del parto.
- Los machos se distinguen de las hembras por el saco escrotal que contienen los testículos y por una mayor distancia anogenital.

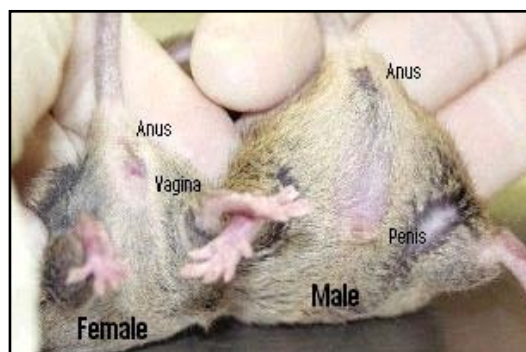


FIGURA 6: SEXADO RATÓN

Fuente: <http://www.upo.es/laboratoriodeciencias/Contenidos>

La figura. 6 Diferencia de distancia anogenital entre hembras (izquierda) y macho (derecha) ratones. La distancia entre el ano y los genitales externos es más corta en las mujeres que en hombres.

BAZO

- La pigmentación oscura del bazo ha sido descrita como una condición no patógena en el ratón. A menudo, la pigmentación es focal. El pigmento específico involucrado ha sido identificado como la melanina, lipofuscina 3,4, 5 o hemosiderin.

SISTEMA RESPIRATORIO

- El ratón tiene un lóbulo pulmonar en el lado izquierdo y cuatro lóbulos (superior, medio, postcaval, e inferior) a la derecha.

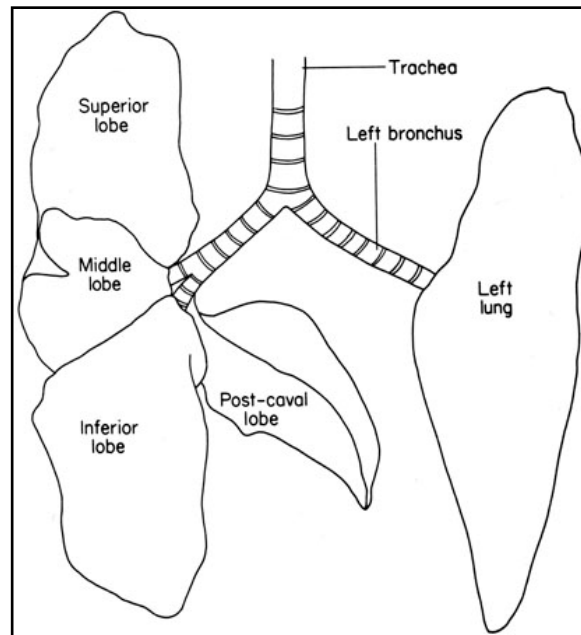


FIGURA 7: ESTRUCTURA PULMONAR

Fuente: <http://www.upo.es/laboratoriodeciencias/Contenidos>

LAS GLÁNDULAS ASOCIADAS CON EL OJO

- La glándula de Harder es en forma de herradura y situada dentro de la órbita. Produce una secreción que lubrica los párpados.
- La glándula se encuentra extraorbitaria por vía subcutánea inmediatamente ventral y anterior a la oreja. Se produce una secreción que lubrica todo el rededor.
- La glándula intraorbitaria se encuentra cerca del canto externo del ojo y produce una secreción que lubrica el rededor.

VALORES NORMATIVOS

PARÁMETROS BIOLÓGICOS BÁSICOS

Los valores típicos de diversos parámetros biológicos, la química sanguínea, orina y hematología se presentan a continuación. Una variación significativa de los valores se pueden producir entre los ratones individuales, las cepas y las existencias, los laboratorios y los métodos de muestreo. Es imprescindible que los laboratorios establezcan los valores normales para su instalación específica.

TABLA N°1: PARÁMETROS BIOLÓGICOS DE LOS RATONES

PARÁMETRO	VALOR TÍPICO
Número cromosomas (2n)	40
Promedio de vida	2-3 años
Peso al nacer	1 a 2 g
Edad destete	19 a 21 días
Peso destete	10 a 12 g
Edad pubertad	35 días
Peso corporal de adultos	20 a 40 g
Edad reproductiva	42 días
Duración del ciclo sexual	4 a 5 días
Reproductividad sexual	10 a 20 horas
Tamaño de la camada	6 a 12 crías
Periodo reproductivo óptimo	7 a 8 meses
Productividad crías al año	50 a 100 crías
Temperatura corporal	36.5-38.0 ° C (97,5-100,4 ° F)
Temperatura rectal	37.5 +/- 0.5 ° C
Ritmo del metabolismo	180 a 505 kcal / kg / día
Ingesta de alimentos	12 a 18 g/100 g peso corporal / día
Ingesta de agua	15 mL/100 g peso corporal / día
Frecuencia respiratoria	138 (94-163) respiraciones / min
Ritmo cardiaco	470 (325-780) latidos / min

Fuente: Consejo Canadiense de Protección de los Animales CCAC 2001

QUÍMICA SANGUÍNEA

Los valores aproximados para los parámetros de química clínica se muestran en la Tabla 2 Los valores representan los rangos de los valores promedios reportados para los ratones de entre 1 y 12 meses de edad. Representa los datos de los ratones de cepas distintas, sexos y condiciones de laboratorio y la vivienda.

TABLA N°2: VALORES REFERENCIALES DE QUÍMICA SANGUÍNEA

PARÁMETRO	VALOR
Glucosa mmol/L	9.71-18.60
Urea mmol/L	12.14-20.59
Colesterol Total mmol/L	1.27-2.48
Proteína total g/L	42-60
Albumina g/L	21-34
Globulina g/L	18-82
Amino- transferasa Aspartato (AST, SGOT) U/L	55-251
Amino- transferasa Alanina (ALT, SGPT) U/L	28-184
Fosfatasa Alcalina U/L	28-94

Fuente: Consejo Canadiense de Protección de los Animales CCAC 2001

ANÁLISIS DE ORINA

La evaluación de la orina del ratón se ve complicado por los volúmenes pequeños que suelen estar disponibles. Para los estudios que requieren múltiples o análisis de orina cuantitativo. El tratamiento de agua potable con cloro, ácido, o antibióticos óticos pueden afectar la palatabilidad del agua, y puede reducir la ingesta de agua.

TABLA N°3: PARÁMETROS NORMALES EN ORINA

PARÁMETRO	VALOR
Color	Claro o ligeramente amarillo
Volumen específico	0.5-2.5 mL/24 h
Gravedad específica	1,030
pH	5.0
Glucosa	0.5-3.0 mg/24 h
Proteínas	0.6-2.6 mg/24 h

Fuente: Consejo Canadiense de Protección de los Animales CCAC 2001

HEMATOLOGÍA

La hematología es el estudio de la sangre y por lo general se refiere al estudio de sus componentes celulares, como eritrocitos o glóbulos rojos (GR), los leucocitos o

glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas. La sangre puede ser analizada con equipos automatizados (recuento sanguíneo completo automatizado) y por el examen microscópico de frotis de sangre. El frotis de sangre se realiza mediante la colocación de un punto (más pequeño que una gota) de sangre cerca de un extremo del portaobjetos de vidrio, generalmente cerca de la etiqueta. Es importante que la etiqueta quede hacia arriba para que el frotis y la etiqueta estén en el mismo lado, evitando así la posibilidad de que quede inadvertida.

TABLA N°4: PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

PARÁMETRO	VALOR
Glóbulos rojos X $10^{12}/L$	7.9-10.1
Hemoglobina g/L	110-145
Hematocrito %	38.5-45.1
MCV fl	48.0–56.0
MCHC g/dL	25.9–35.1
Plaquetas sanguíneas X $10^9/L$	600-1200
Glóbulos blancos X $10^9/L$	5.0-13.7
Neutrófilos $10^9/L$	0.4-2.7
Linfocitos $10^9/L$	7.1-9.5
Volumen sanguíneo (mL/kg)	70-80

Fuente: Consejo Canadiense de Protección de los Animales CCAC 2001

1.8. ADQUISICIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

La importación de animales de laboratorio deberá cumplir los requisitos zoo-sanitarios del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) del Perú. La elección del animal del laboratorio debe cumplir las exigencias de la investigación biomédica y reunir los requisitos genéticos y microbiológicos.

1.9. CERTIFICADO DE SANIDAD

Documento que acredita la calidad sanitaria de los animales, producidos o adquiridos, mediante estudios adecuados que certifiquen la ausencia de enfermedades que puedan interferir con los resultados experimentales.

Todos los animales adquiridos por compra o donación y que serán utilizados como animal de laboratorio, deben ir acompañados de este documento que certifica las condiciones de salud y calidad en que se produjeron, criaron y mantuvieron hasta antes de su salida del lugar de origen.

1.10. BIOTERIO DE PRODUCCIÓN

Estructura física y organizacional especialmente diseñada para la cría y mantenimiento de animales de laboratorio. De ubicación exclusiva, fuera del alcance de peligros sanitarios. El objetivo principal de tener un bioterio es asegurar la procedencia de animales sanos para que no interfieran en los trabajos científicos de las diferentes áreas de investigación, fabricación de vacunas, antígenos y su control.

Los determinantes de un bioterio para un buen desempeño son:

- › Aspecto de infraestructura.
- › Animales definidos.
- › Personal capacitado.



Distribución de ratones en sala de producción

1.11. BIOTERIO DE EXPERIMENTACIÓN

Destinado solamente para alojar animales durante el tiempo que dure un estudio o una investigación. Se debe tener en cuenta que existan instalaciones con barreras sanitarias establecidas para la protección de las personas así como de los animales, con el

equipamiento necesario y los procedimientos normativos operacionales correspondientes para dichos fines.

1.12. DISEÑO DE UN BIOTERIO

Un elemento importante para el cuidado y uso de animales, son las instalaciones diseñadas y construidas apropiadamente que faciliten una operación segura, eficiente y económica. Para el diseño de un bioterio se tendrá presente:

- Actividades por realizarse.
- Relación de estas actividades con el espacio y con las necesidades ambientales.

Los bioterios deben estar contruidos con paredes y pisos recubiertos por material de fácil lavado, resistente a la aplicación de desinfectantes; techos lisos, uniformes, fáciles de limpiar y con bordes sanitarios; cierres herméticos en las puertas y con factores controlados, entre ellos, los ambientales (temperatura, humedad, ventilación, presurización) y físico-químicos (iluminación, ruido, sanitizantes, etc.).

Las instalaciones deberán contar con condiciones físicas y de diseño, que aseguren la eficacia de su funcionamiento ya que los animales de laboratorio requieren satisfacer los fines de la investigación, y es por ello que deberán estar ubicados en áreas apropiadamente adecuadas, para alojarlos y cuidarlos. Existe dos tipos de distribución interna de las áreas, según la American Association for Laboratory Animal Science (AALAS) y la diferencia entre ellas radica en la disposición del acceso y salida de las salas. Bioterio convencional o de corredor único: el tránsito es mediante una única puerta, la cual comunica hacia un corredor común de acceso y salida. Bioterio con dos corredores de acceso: en donde se separan el acceso y retorno de la sala, los cuales se efectúan por corredores independientes, diseñado para albergar animales de mayor calidad. Se separan dos áreas básicas, una destinada a la preparación del material y el otro es el corredor de retorno destinada a la limpieza de materiales.

ADMINISTRACIÓN

La estructura administrativa es una parte fundamental del Bioterio ya que de esta instancia depende la regulación, control y normalización de la legislación interna que lleva las directrices del funcionamiento. El personal involucrado en el mantenimiento y

manejo de los animales deberá ser personal entrenado y calificado, para poder conocer las necesidades específicas de la especie con la que se va a trabajar. (79)

Para una administración efectiva es necesaria la creación de un Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. (CICUAL)

Cuando una institución se encuentre en la categoría b (uso en investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza) o bien en la clasificación c (mixtos), debe conformar un Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de carácter institucional.

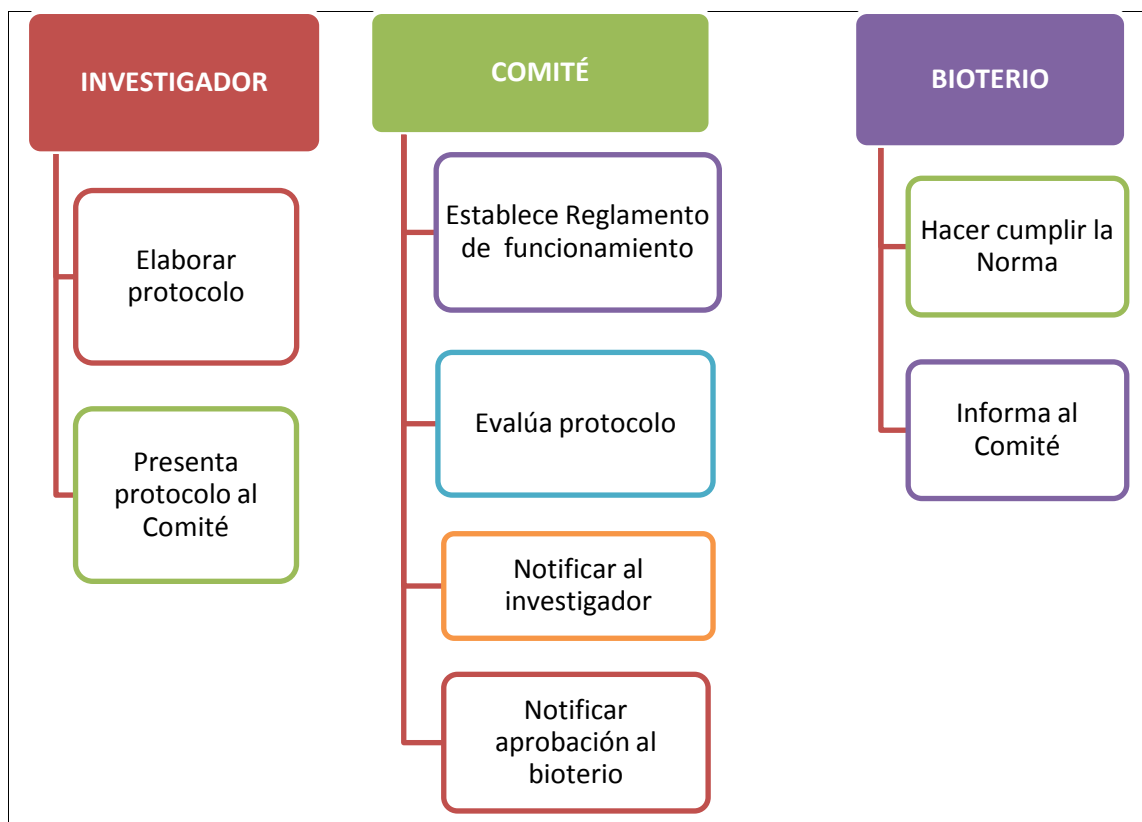
La responsabilidad de la creación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio recae sobre el director o titular respectivo de la institución involucrada. (99)

Los miembros del Comité deben incluir:

- Un Médico Veterinario titulado con experiencia comprobable en la medicina y ciencia de los animales de laboratorio.
- Un investigador de alta jerarquía de la propia institución con experiencia comprobable en el manejo de animales de laboratorio.
- Otras personas de acuerdo con las necesidades propias de la institución.

La función principal del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio es la de asegurar la existencia de un mecanismo institucional encargado de revisar que el cuidado y uso de los animales de laboratorio con propósitos de investigación, pruebas y/o enseñanza, sea de manera apropiada y humanitaria. (99)

FUNCIONAMIENTO DEL CICUAL



FUENTE: Ciencia y Tecnología en experimentación animal México 2001

Serán atribuciones del Comité las siguientes:

- Debe reunirse regularmente y realizar un informe anual acerca del estado que guarda el cuidado y uso de los animales de laboratorio en su institución mismo que entregará tanto a las autoridades de la Secretaría como a las propias de la institución.
- Verificar las normas y guías establecidas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio según sus propias necesidades institucionales.
- Evaluar y aprobar los protocolos de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas y enseñanza, que impliquen el uso de animales.
- Tener autoridad para detener procedimientos relacionados con el uso de los animales, si no cumple con el procedimiento aprobado por el Comité y someter a eutanasia a aquellos animales en los que el dolor/sufrimiento no puede ser aliviado.

1.13. BARRERAS SANITARIAS

Sistema que combina instalaciones físicas, equipamiento y procedimientos operacionales, que separan una zona limpia de una zona sucia o de un lugar menos limpio de otra más limpia, minimizando la probabilidad de que organismos patógenos se pongan en contacto con la población animal del bioterio.

Ejemplo de barreras sanitarias:

- Instalaciones físicas: esclusas, vestidores, con presión diferencial de aire, renovación de aire/hora, filtración y tratamiento de agua.
- Equipamiento: implementos de protección personal, como vestimenta, mascarilla, gorro y guantes. Uso de pediluvios con desinfectante de una sala a otra sala, barreras antiroedores y antiinsectos.
- Procedimientos operacionales; de ingreso de personal, de materiales, de limpieza y desinfección de ambientes y de materiales.

1.14. PERSONAL

El personal que trabaja en un bioterio de producción o de experimentación debe ser lo suficientemente capacitado, de acuerdo con las características de las instalaciones, número de animales mantenidos y la naturaleza de la investigación que se va a realizar. Es responsable de la atención y mantenimiento correcto de los animales asignados.

1.14.1. NORMAS DE SEGURIDAD Y PROTECCIÓN DEL PERSONAL

El personal debe adoptar normas y formas de protección, para brindar buenas condiciones de mantenimiento y salud a los ratones. Para ello deberá contar con procedimientos e instrucciones normalizados como:

- Procedimiento de higiene de personal.
- Uso de la vestimenta completa.
- Procedimiento de ingreso al bioterio de producción o bioterio de experimentación.
- Procedimientos de limpieza de ambientes, con programas de limpieza y rotación de desinfectantes, efectivo.

- Procedimientos de limpieza y desinfección de materiales.
- Procedimiento de eliminación de desechos.
- Programa de control de plagas.
- Programa de capacitación al personal.

Entre las normas de higiene y de seguridad más importantes tenemos:

- Uso de una vestimenta completa y de uso exclusivo en el bioterio.
- Todo animal encontrado en la sala, libre, debe ser eliminado y no devuelto a la colonia.
- Se debe trabajar con el menor ruido posible y en forma de reducir el estrés ocasionado a los animales.
- Uso de gafas de seguridad cuando el procedimiento de investigación lo requiera.
- Tener conocimiento de la localización del botiquín de primeros auxilios y rutas de evacuación ante una emergencia
- Utilizar guantes quirúrgicos para el manejo de los animales. › No llevar nada a la boca mientras se esté en el bioterio. › Mantener el área limpia.
- Uso de equipos en buenas condiciones.
- Eliminación de desechos en la forma correcta. Uso de bolsas rojas para material biológico contaminado y bolsas de color negro para material sucio o desechos no contaminados.
- Rotular correctamente las jaulas, especialmente en las salas de reproductores monogámicos.
- Restringir el acceso a personal extraño, permitir sólo el acceso a personas autorizadas.
- Informar inmediatamente al jefe o coordinador, cualquier accidente.
- Si tiene problemas respiratorios (asma), neurológicos o alergias infórmelo por escrito a su jefe inmediato.
- No debe permitirse al personal comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en las salas de animales.

El uso de los elementos de protección del personal (mascarilla, guantes, gorros, etc.), los procedimientos normalizados de limpieza y desinfección de materiales e

instalaciones conjuntamente con los flujos adecuados de materiales y personas es una barrera sanitaria que se recomienda entre las normas de higiene y de seguridad más importantes tenemos:

- Uso de una vestimenta completa y de uso exclusivo en el bioterio.
- Todo animal encontrado en la sala, libre, debe ser eliminado y no devuelto a la colonia.
- Se debe trabajar con el menor ruido posible y en forma de reducir el estrés ocasionado a los animales.
- Uso de gafas de seguridad cuando el procedimiento de investigación lo requiera.
- Tener conocimiento de la localización del botiquín de primeros auxilios y rutas de evacuación ante una emergencia
- Utilizar guantes quirúrgicos para el manejo de los animales.
- No llevar nada a la boca mientras se esté en el bioterio.
- Mantener el área limpia.
- Uso de equipos en buenas condiciones.
- Eliminación de desechos en la forma correcta. Uso de bolsas rojas para material biológico contaminado y bolsas de color negro para material sucio o desechos no contaminados.
- Rotular correctamente las jaulas, especialmente en las salas de reproductores monogámicos.
- Restringir el acceso a personal extraño, permitir sólo el acceso a personas autorizadas.
- Informar inmediatamente al jefe o coordinador, cualquier accidente.
- Si tiene problemas respiratorios (asma), neurológicos o alergias infórmelo por escrito a su jefe inmediato.
- No debe permitirse al personal comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en las salas de animales.

El uso de los elementos de protección del personal (mascarilla, guantes, gorros, etc.), los procedimientos normalizados de limpieza y desinfección de materiales e instalaciones conjuntamente con los flujos adecuados

1.14.2. CAPACITACIÓN DEL PERSONAL

El personal debe estar capacitado en:

- Identificar las principales enfermedades zoonóticas que afectan a los animales de laboratorio.
- Manejo de animales de laboratorio, según las buenas prácticas de crianza.
- Peligros microbiológicos y físicos (incluyendo aquellos relacionados con la radiación y las alergias).
- Limpieza y sanitización de ambientes y materiales.
- Higiene personal.
- Salud y seguridad ocupacional.
- Manejo de materiales de desecho.
- Seguridad química e industrial.
- Manejo de equipos utilizados en la producción: autoclaves, hornos, caldero, ablandador de agua, cabinas de seguridad biológica y otros.
- Deberán implementarse programas de capacitación continua.

1.14.4. HIGIENE PERSONAL

El personal debe mantenerse limpio, utilizando ropa apropiada dentro de los ambientes del bioterio de producción o de experimentación, deberá lavarse las manos y cambiarse de ropa con la frecuencia necesaria para mantener la higiene personal. Esta ropa no debe utilizarse fuera de las instalaciones.

En los bioterios el personal no debe beber, fumar o aplicarse cosméticos.

1.15 ÉTICA DE LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

El tema ético compete a todos los individuos pero, con mayor razón, a los involucrados en la investigación biológica, desde el auxiliar a cargo de los animales hasta el directivo de la institución productora o usuaria. La primera condición de la persona que trabaja con animales de experimentación es primario el respeto por la vida, el dolor o el sufrimiento a que éstos pueden ser sometidos en los trabajos de experimentación bajo su responsabilidad.

Siempre que se usen animales en investigación, se debe considerar que un objetivo tan importante como el de obtener resultados experimentales, será el de minimizar cualquier dolor o angustia que dichos animales puedan sufrir. El refinamiento de los procedimientos para conseguir que estos no causen sufrimiento debe ser parte integrante de toda investigación científica. Esto es importante tanto desde el punto de vista de la preocupación humanitaria como para cumplir con los requisitos de la

legislación sobre animales de investigación. Los investigadores que trabajen y experimenten con animales están moralmente obligados a manifestarles tres tipos de actitudes: respeto, afecto y gratitud.

- Respeto: por tratarse de seres vivos y sensibles, que están experimentando sufrimiento y podrían terminar perdiendo la vida, tratárseles con todas las consideraciones que el caso merece.
- Afecto: considerándolos partícipes con nosotros, del misterio de la vida.
- Gratitud: reconocimiento por la importante ayuda al constituirse nuestros más íntimos colaboradores.

Así mismo, se puede decir que la investigación biomédica en animales es éticamente aceptable, si se sigue el principio de las tres R de la experimentación humanizada para con los animales, propuesta por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en 1959: Reducir, Reemplazar y Refinar.

- Reducir, al máximo el número de ellos y, por ende, el total de animales utilizados en investigación.
- Reemplazar, siempre que sea posible el animal de experimentación por otro modelo experimental, cuando no resulte imprescindible el uso de animales.
- Refinar, los métodos y técnicas utilizados de modo que produzcan al animal el menor sufrimiento posible.

Muchos laboratorios experimentales han adoptado estos principios éticos. Igualmente, se cuenta con abundante bibliografía sobre el tema.

CAPITULO 2

EL RATÓN SU MACROAMBIENTE Y MICROAMBIENTE

El investigador podrá decidir, de acuerdo con sus necesidades, dónde ubicar a los animales empleados, teniendo en cuenta que el lugar brinde las condiciones ambientales y de manejo óptimos que aseguren la salud y la comodidad de especímenes, de modo que sus patrones metabólicos y de comportamiento se mantengan normales y estables, dando respuestas confiables.

2.1. MACROAMBIENTE

TEMPERATURA Y HUMEDAD

El mantenimiento de la temperatura corporal dentro de los límites de la variación normal es esencial para el bienestar de los ratones. Generalmente la exposición de los animales no adaptados a temperaturas superiores a los 29.4°C o por debajo de 4.4° C, sin que tengan acceso a protección en un refugio u otro mecanismo, pueden producir efectos clínicos que pueden poner en peligro la vida. Los animales se pueden adaptar a condiciones extremas mediante mecanismos morfológicos, fisiológicos y de conducta, pero tales adaptaciones llevan tiempo y pueden alterar los resultados experimentales o afectar los rendimientos.

Algunas situaciones pueden requerir temperaturas ambientales más altas, tales como la recuperación post-operatoria, el hospedaje de roedores sin pelo y de neonatos que han sido separados de sus madres. La magnitud del incremento de temperatura depende de las circunstancias del alojamiento, algunas veces es suficiente elevar la temperatura en el encierro primario en vez de elevarla en el encierro secundario.

Debido a la carencia de estudios bien controlados, las temperaturas de bulbo seco recomendadas para varias especies animales están basadas en el criterio profesional y la experiencia. En el caso de animales en espacios confinados, se debe mantener al mínimo el rango de flujo diario de la temperatura, para evitar grandes demandas repetidas de los procesos metabólicos y de conducta, necesarias para compensar los cambios térmicos en el medio ambiente. La humedad relativa también se debe controlar, pero no tan estrechamente como la temperatura; el rango aceptable de humedad relativa es de 30 a 70%.

VENTILACIÓN

Los propósitos de la ventilación son: suministrar oxígeno adecuadamente, eliminar la carga térmica producto de la respiración animal, la iluminación y los aparatos; diluir los gases y partículas contaminantes, ajustar el contenido de humedad del aire del cuarto, y en donde sea apropiado crear diferencia de presión de aire entre espacios adyacentes. Sin embargo, el establecer un índice de ventilación en el cuarto no asegura la adecuación de la ventilación en el encierro primario del animal y por lo tanto no garantiza la calidad del microambiente.

El grado de movimiento del aire o corriente de aire (chiflón) causa incomodidad y consecuencias biológicas, que en la mayoría de las especies, aun no han sido establecidas. El tipo y la localización de los difusores del suministro de aire, las ventanillas de salida del mismo y su interrelación con el número, localización, disposición y tipo de encierro primario en el cuarto u otro encierro secundario, afecta la eficiencia de la ventilación del encierro primario y por lo tanto deben tomarse en consideración.

Durante muchos años se ha usado la recomendación de 10 a 15 cambios por hora del volumen total de aire del encierro secundario y aún se considera un estándar general aceptable.

La ventilación de los cuartos con aire reciclado ahorra cantidades considerables de energía pero conlleva algún riesgo. Muchos patógenos de los animales están contenidos en el aire o viajan en fómites, tales como el polvo, por lo tanto reciclar el aire de salida en los sistemas de Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado (HVAC por sus siglas en inglés) que dan servicio a muchos cuartos, presenta el riesgo de contaminación cruzada. Antes de reciclar el aire de salida, debe someterse a filtros de partículas de alta eficacia (HEPA por sus siglas en inglés), para eliminar las partículas contenidas en el aire; el grado y la eficacia de la filtración deben ser proporcionales al riesgo estimado. Los filtros HEPA están disponibles con varias eficacias de filtración, que pueden seleccionarse de acuerdo a la magnitud del riesgo.

En caso de que existan gases tóxicos o los que causan olores como el amoníaco puede ser eficaz el tratamiento del aire reciclado para eliminar estas sustancias mediante la absorción química o la extracción; sin embargo, es preferible el uso de aire no reciclado para ventilar las áreas de ocupación y de utilización animal. Se puede usar aire reciclado y filtrado con filtros HEPA, sin filtración de los gases (ej. con filtros de carbón activado) pero sus aplicaciones son limitadas y solamente en caso de:

- El aire del cuarto se mezcla con por lo menos 50% de aire nuevo (esto significa que el suministro total de aire no exceda el 50% con aire reciclado)
- Las prácticas de atención a los animales tales como el cambio de material de lecho, la frecuencia del lavado de jaula y la preparación del aire reciclado sean suficientes para disminuir al mínimo los gases tóxicos y los olores

- El aire reciclado sea acondicionado apropiadamente y mezclado con suficiente aire nuevo para cumplir con los requerimientos de temperatura y humedad de los animales en ese espacio.

El tratamiento del aire reciclado tanto para eliminar partículas así como contaminantes gaseosos es caro y puede resultar ineficiente si no se le da un mantenimiento suficiente y apropiado a los sistemas de filtración. Estos sistemas deben ser mantenidos debidamente y verificados para mantener al máximo su efectividad. Para que la operación de cualquier sistema de Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado (HVAC) sea exitosa se requiere mantenimiento y evaluación regulares, incluyendo la evaluación de su funcionamiento a nivel del encierro secundario; estas evaluaciones deben incluir el volumen de entrada y salida de aire y cuando sea aplicable los diferenciales de presión estática.

ILUMINACIÓN

La luz puede afectar la morfología, fisiología y conducta de los animales. Los fotoestresores potenciales son: fotoperiodo, fotointensidad y calidad espectral de la luz inapropiados, al establecer los niveles de iluminación apropiados para los cuartos de ocupación animal, se deben considerar numerosos factores que puedan afectar las necesidades que tienen los animales; entre estos se incluyen la intensidad de la luz; la duración de la exposición, la longitud de onda, la exposición previa, la pigmentación del animal, las horas de exposición en relación al ciclo circadiano, la temperatura corporal, el status hormonal, la edad, especie, sexo, variedad o linaje del animal.

En general, la luz debe difundirse a través de las áreas de alojamiento animal y brindar suficiente iluminación para el bienestar de los animales y para permitir las buenas prácticas de su atención, inspección adecuada, incluyendo las jaulas colocadas en el entrepaño más inferior del estante; y de las condiciones de trabajo seguras para el personal. La luz en los cuartos de los animales debe ser suficiente para una visión adecuada y para la regulación neuroendócrina de los ciclos circadianos y diurnos.

Los ratones son nocturnos. Debido a que la rata albina es más susceptible a la retinopatía fototóxica que otras especies se le ha utilizado como referencia para establecer los niveles de iluminación de los cuartos. Parece ser que niveles de luz de aproximadamente 325 luxes (30 bujías pie) a 1 m. aproximadamente (3.3 pies) del piso son suficientes para el cuidado de los animales, sin causar signos clínicos de

retinopatía fototóxica en ratas albinas y se ha encontrado que niveles superiores a 400 luxes (37 bujías pie) medidas en un cuarto vacío a 1 metro del piso son satisfactorios para los roedores siempre y cuando se sigan prácticas de manejo que eviten daño retinal en animales albinos. Sin embargo, la experiencia previa del individuo puede afectar su sensibilidad a la fototoxicidad; se ha reportado que de acuerdo a evidencias histológicas, morfométricas y electrofisiológicas, la luz de 130-270 luxes por encima de la intensidad en que ha sido criado es cercana al umbral de daño retinal en algunas ratas albinas.

Algunas guías recomiendan una intensidad de luz tan baja como 40 luxes medidos a nivel de una caja intermedia del estante. Los ratones jóvenes albinos y pigmentados, prefieren iluminaciones mucho más bajas que los adultos, aún cuando la mayoría de las veces el potencial daño retinal asociado con el alojamiento de estos roedores en niveles de luz más altos es reversible.

Por lo tanto, la intensidad de luz a nivel de la jaula, para animales que han mostrado ser susceptibles a la retinopatía fototóxica, debe ser entre 130 y 325 luxes.

RUIDO

El ruido que producen los animales y las actividades de cuidado son inherentes a la operación de un bioterio. Por lo tanto, el control del ruido se debe considerar en el diseño y operación de las instalaciones. La evaluación de los efectos potenciales del ruido sobre los animales justifica la consideración de la intensidad, frecuencia, rapidez de inicio, duración y vibración potencial del sonido y el rango de audición, historia de la exposición al ruido y susceptibilidad a su efecto de la especie, tipo o subtipo.

La separación de las áreas de ocupación humana y animal reduce al mínimo las molestias a ambos ocupantes de las instalaciones. La exposición a sonidos más altos de 85 dB puede tener tanto efectos auditivos como no auditivos, que incluyen eosinopenia y aumento del peso de las adrenales y disminución de la fertilidad en roedores. Los ratones pueden oír frecuencias de sonidos que son inaudibles para los seres humanos, por eso se deben considerar cuidadosamente los efectos potenciales de equipo y materiales que producen ruido en el rango de audición de los animales cercanos.

Las actividades que puedan ser ruidosas deben realizarse, en la medida de lo posible, en cuartos o áreas separadas de las de alojamiento y uso de los animales. No se deben usar radares, alarmas y otros generadores de sonidos en los cuartos de los animales, a menos que sean parte de un protocolo aprobado o de un programa de enriquecimiento del medio ambiente.

TABLA N° 7 FACTORES MACROAMBIENTALES RECOMENDADOS PARA RATÓN
Mus musculus

PARÁMETRO	RANGO RECOMENDADO
Humedad Relativa	30 a 70%
Temperatura de bulbo Seco °C	18-26
Cambios/h del Volumen Total	10 a 15
Intensidad de luz(lux)	130 a 270 joven 130 a 325 adulto
Intensidad de ruido (dB)	50 a 70

Fuente: Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación (CCAC)

2.2. MICROAMBIENTE

RECOMENDACIONES DE ESPACIO

La necesidad de espacio para los animales es un asunto complejo y considerar únicamente su peso o superficie corporal es insuficiente. Por esta razón, las recomendaciones de espacio que se presentan aquí están basadas en el juicio profesional y la experiencia. Estos espacios deben considerarse como recomendaciones de los tamaños apropiados de jaula para los animales alojados bajo las condiciones encontradas comúnmente en las instalaciones para hospedar animales de laboratorio.

La asignación de espacios se debe revisar y en caso necesario modificar para resolver las situaciones individuales de alojamiento y satisfacer las necesidades de los animales. Para valorar la adecuación del hospedaje se pueden usar índices del rendimiento animal, tales como: salud, reproducción, crecimiento, conducta, actividad y utilización

del espacio. El requerimiento mínimo es que el animal disponga de espacio suficiente para voltearse y para expresar los acomodos posturales normales.

La necesidad de espacio que ofrezcan los encierros primarios, deben ser aprobados a nivel institucional por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. La evaluación de las necesidades de espacio de los animales debe ser un proceso continuo.

TABLA N°8 ESPACIO RECOMENDADO PARA RATONES

Animales	Peso Corporal (g)	Área de Piso/Animal (cm²)	Altura^a cm
Ratones	<10	38.71	12.7
	Hasta 15	51.61	12.7
	Hasta 25	77.42	12.7
	>25 ^b	96.77	12.7

Fuente: Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación (CCAC)

a. De piso a techo de la jaula.

b. Los animales más grandes pueden requerir más espacio para satisfacer los estándares de rendimiento.

JAULAS

El encierro primario en una jaula, constituye los límites del ambiente inmediato del animal. Los encierros primarios aceptables permiten:

- Satisfacer las necesidades fisiológicas y de conducta de los animales incluyendo la micción y la defecación, el mantenimiento de la temperatura corporal, los movimientos normales y postura, y cuando esté indicado la reproducción.
- Las interacciones sociales entre individuos de la misma especie y el establecimiento de jerarquía dentro del encierro o entre encierros.
- Que los animales permanezcan limpios y secos.
- Una ventilación adecuada.
- El acceso de los animales al agua y alimento, y también brindar facilidades para el lleno, relleno, cambio, servicio y limpieza de los utensilios con los cuales se proporcione el agua y el alimento.

- Tener un medio ambiente seguro, que impida el escape de los animales o el entrapamiento de sus apéndices entre superficies opuestas o en aberturas estructurales.
- La ausencia de bordes cortantes o proyecciones que puedan causar lesiones a los animales.
- Permitir la observación de los animales con la mínima molestia para ellos.

Los encierros primarios deben construirse con materiales que equilibren las necesidades del animal con la facilidad para llevar a cabo la sanidad. Deben tener superficies lisas, impermeables, con el mínimo de rebordes o sobresalientes, ángulos, esquinas y superficies que se traslapen, de tal manera que la acumulación de suciedad, desechos y humedad se reduzcan y sea posible una limpieza y desinfección satisfactoria. Deben estar contruidos con materiales durables que resistan la corrosión y que soporten la manipulación ruda sin desportillarse, cuartearse u oxidarse.

Todos los encierros primarios deben mantenerse en buenas condiciones de uso para evitar los escapes o las lesiones en los animales, promover la comodidad física y facilitar la sanidad y el servicio. El equipo oxidado o enmohecido que amenace la sanidad o seguridad de los animales debe ser reparado o reemplazado.

Algunos sistemas de alojamiento tienen equipos de ventilación y jaulas especiales, incluyendo filtros encima de las jaulas, jaulas ventiladas, aisladores y cubículos. Por lo general, el propósito de estos sistemas es minimizar la diseminación de los agentes causales de enfermedades, transmitidos por el aire entre jaulas o grupos de jaulas. Estos a menudo requieren prácticas de manejo diferentes, tales como, alteración de la frecuencia del cambio de lecho, el uso de técnicas asépticas de manipulación y regimenes de limpieza, desinfección o esterilización especializada, para evitar la transmisión microbiana por otras rutas diferentes a la aérea. Se recomiendan las jaulas de piso sólido con lecho para los roedores.

LECHO

El material de cama de los animales es un factor controlable del medio ambiente, que puede influir en su bienestar y en los resultados experimentales. Ningún lecho es ideal para ninguna especie en particular bajo todas las condiciones de manejo y experimentales y ninguna es ideal para todas la especies. Varios autores han descrito las características deseables del lecho y los medios para evaluarlo. Se han utilizado

camas de maderas blandas, aunque el uso de madera blanda picada o de sus virutas, sin tratamiento, está contraindicado en algunos protocolos, debido a que puede afectar el metabolismo animal. No se recomiendan las virutas de cedro porque emiten hidrocarburos aromáticos inductores de las enzimas microsomales hepáticas y citotoxicidad y se ha reportado que aumentan la incidencia de cáncer. Para reducir la concentración de hidrocarburos aromáticos y poder prevenir este problema se ha usado el tratamiento con calor, aplicado a este material previo a su utilización. Al comprar los materiales de lecho se deben examinar los métodos de manufactura, control de calidad y almacenamiento seguido por los fabricantes.

El lecho no se debe colocar sobre el piso durante el transporte y almacenamiento sino en tarimas, estantes o carros, de tal manera que se preserve su calidad y se reduzca al mínimo la contaminación. Durante la esterilización en autoclave la cama puede absorber humedad, resultando en una menor capacidad de absorción y favoreciendo el crecimiento de microorganismos; por lo tanto, se deben dar los tiempos de secado y las condiciones de almacenaje apropiadas. Entre las características principales de un lecho se considera:

- Absorbe la humedad
- Exenta de polvo
- No permite el crecimiento bacteriano
- No comestible
- No mancha
- No ocasiona traumatismos
- Fija el amoníaco
- Se puede esterilizar
- No forma productos indeseables después de la esterilización
- Fácil de almacenar. No es desecante para los animales
- No contaminada. No tóxica. Químicamente estable a lo largo del uso
- No nutritiva
- Desagradable al gusto, difícil de masticar o de guardar en la boca
- No maloliente
- Apropiada para la nidación
- Apropiada a la incineración
- Fácil de obtener. Relativamente barata
- Resistente al fuego

- Uniformidad entre los lotes
- Optimiza el comportamiento normal
- No es perjudicial para los lavajaulas
- No presenta peligro o riesgos para el personal

AGUA

Diariamente, los animales deben tener acceso a agua potable no contaminada y de acuerdo a sus necesidades particulares. La calidad y definición de agua potable puede variar según la localidad. Puede ser necesaria la determinación periódica del pH, dureza y contaminación química y microbiológica para asegurar que la calidad del agua es aceptable, especialmente si los componentes normales del agua de una localidad dada pueden influir en los resultados del estudio en que se use esa agua.

Cuando los protocolos experimentales requieren agua altamente pura, se le puede tratar o purificar para eliminar o reducir al mínimo la contaminación. Se debe considerar cuidadosamente la selección del tratamiento del agua porque muchas de ellas tienen el potencial de causar alteraciones fisiológicas, cambiar la microflora o alterar los resultados experimentales.

Los utensilios para dar de beber, tales como las pipetas de los bebederos y las válvulas automáticas, se deben revisar diariamente para verificar un adecuado mantenimiento, limpieza y operación. En ocasiones, los animales tienen que ser entrenados a utilizar los componentes de los sistemas de provisión automática. Es mejor cambiar bebederos que rellenarlos, debido a la potencial contaminación microbiológica cruzada; pero en caso de rellenar bebederos se debe tener cuidado de regresarlos a la misma jaula de donde fueron tomados.

TABLA N° 9 PARÁMETROS BACTERIOLÓGICOS PARA AGUA POTABLE

MICROORGANISMO	LÍMITE PERMISIBLE
Bacterias Aerobias mesófilas	Máximo 30 UFC / mL de muestra
Coliformes totales	2 NMP en 100mL de muestra
Escherichia Coli	0 NMP en 100mL de muestra

Fuente: Guías OMS 2005

TABLA N° 10 PARÁMETROS FÍSICOS PARA AGUA POTABLE

PARÁMETROS FÍSICOS	CONCENTRACIONES MÁXIMAS PERMITIDAS	CARACTERÍSTICAS
Color	15 UCV ^a	Apariencia
Sabor y Olor	-	Deben ser aceptables
Temperatura	-	Debe ser aceptable
Turbiedad	5 UNT ^b	Apariencia; para que la desinfección final sea eficaz, mediana de la turbiedad ≤ 1UNT, muestra única ≤ 5 UNT
COMPONENTES INORGÁNICOS		
pH	6.5 - 9.5	pH bajo: corrosión pH alto: sabor, sensación jabonosa preferiblemente < 8.0 para que la desinfección con cloro sea eficaz

Fuente: Guías OMS 2005

a Unidad de color verdadero.

b Unidad nefelometría de turbiedad.

ALIMENTO

Los animales deben ser alimentados con dietas apetitosas, no-contaminadas y nutricionalmente adecuados, diariamente o de acuerdo a sus requerimientos particulares, a menos que el protocolo en el que están siendo empleados lo demande de otra manera. Los subcomités de nutrición del *National Research Council Committee* han preparado documentos completos acerca de los requerimientos nutricionales de los animales de laboratorio.

Los gerentes de las colonias de animales deben emplear su buen juicio al comprar, transportar, almacenar y manipular los alimentos para reducir al mínimo la introducción de enfermedades, parásitos y vectores potenciales de enfermedades y contaminantes

químicos a las colonias animales. Se aconseja a los encargados de compras examinar a los fabricantes, sus prácticas y procedimientos de provisión para proteger y asegurar la calidad del alimento (Ej. almacenaje, control de plagas y procedimiento de manipulación). Las instituciones deben exigir a los fabricantes de alimentos que presenten periódicamente los resultados de los análisis del contenido de nutrientes críticos de las dietas. El usuario debe conocer la fecha de fabricación y otros factores que afecten la vida media de almacenamiento del alimento.

Las áreas en las cuales se almacenan o procesan los ingredientes de las dietas deben mantenerse limpias y cerradas para evitar la entrada de plagas. El alimento no debe almacenarse en el piso sino en tarimas, estantes o carros. Los sacos abiertos, en tanto no se usen, deben guardarse en envases a prueba de plagas para reducir al mínimo la contaminación y para evitar la diseminación de enfermedades potenciales. La exposición a temperaturas superiores a los 21° C (70° F), humedades relativas extremas, condiciones malsanas, luz, oxígeno, insectos y otras plagas, acelera el deterioro del alimento.

TABLA N° 11 PARÁMETROS NUTRICIONALES^a

ESPECIE	CONSUMO DIARIO DE AGUA	EXCRECIÓN DIARIA DE ORINA	ALIMENTACIÓN/ DÍA	PROTEÍNAS DIGESTIBLES^b %
RATÓN	3-7 mL	1-3 MI	3-6 g	12

Fuente: Consejo Nacional de Investigación NRC Canadá 1995

- a. Los valores promedios y rangos tomados de la literatura corresponden a valores medios para animales adultos jóvenes.
- b. Refiere a proteínas ideales o digestibles requeridas; los niveles de proteínas brutas (PB) pueden ser considerablemente más altos.

La mayoría de las dietas secas para animales hechas a base de ingredientes naturales y que contienen conservadores se pueden usar hasta seis meses después de su fabricación, siempre y cuando las condiciones de almacenaje hayan sido apropiadas.

Sin embargo, la vitamina C en los alimentos industrializados por lo general solo tienen una vida de almacenamiento de tres meses, el uso de formas estabilizadas de vitamina C puede extenderla. En caso de que se tenga que alimentar a los animales con una dieta que contiene vitamina C caduca, será necesario suplementar adecuadamente con esa vitamina. Con frecuencia las dietas purificadas y las químicamente definidas son menos estables que las dietas a base de ingredientes naturales y su vida de almacenamiento generalmente son menores a seis meses; estas dietas deben almacenarse a temperatura de 4° C o más baja.

TABLA N° 12 RACIONES DE NUTRIENTES RECOMENDADAS

PARÁMETRO	REQUERIMIENTO
Proteína Cruda %	17-24
Grasa cruda %	4-11
Fibra Cruda %	3-6
Ceniza %	5-7

Fuente: Consejo Nacional de Investigación NRC Canadá 1995

CAPITULO 3

MANEJO Y CUIDADO DE RATONES

El mantenimiento de los animales en buen estado de salud, depende en mayor parte de que el personal adopte ciertas normas y formas de trabajo para mantener las barreras sanitarias con continuidad en el tiempo. Un buen programa de cuidado y manejo ofrece el ambiente y alimentación que permite a los animales crecer, reproducirse y mantener una buena salud.

Para elaborar estos programas se debe considerar los siguientes factores:

- Las especies y cepas.
- La habilidad del animal para integrar grupos.
- Disponibilidad de la instalación y equipamiento.
- Periodo de permanencia de los animales.

Este capítulo incluye desde el ingreso del ratón al bioterio hasta su muerte.

Características de manejo:

- Bueno, cuando los ratones se acercan a la persona
- Regular, cuando manifiestan timidez
- Malo, cuando el ratón se asusta y trata de esconderse

3.1. CUARENTENA

El ratón tiene que pasar por un tiempo de adaptación (cuarentena), desde su adquisición hasta su uso, con el objetivo de tener ratones menos estresados y más sanos, que proporcionen un mejor resultado experimental. Este periodo no es menor de 15 días. Todos los días se observarán a los ratones, para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte.

3.2. ALIMENTACIÓN Y MANEJO DEL ALIMENTO

Los animales deben recibir alimento en cantidad y calidad suficiente para sus necesidades y para conservar la salud. El acceso al alimento debe ser libre y dosificado para que así los animales se albergan en grupos, debe haber suficientes puntos de alimentación para minimizar la competencia por el alimento y asegurar que todos los ratones tengan acceso al alimento.

El alimento se suministra diariamente; se incrementará los días que se considere necesario por razones de fuerza mayor. Cada ingreso de alimento debe ser registrado, de tal manera que el alimento de ingreso más antiguo se use primero, nunca utilizar alimento vencido. Los sacos de alimento abiertos deben almacenarse en contenedores totalmente cerrados.

Cada lote de ingreso se debe controlar la calidad: análisis bromatológico y su carga microbiana. El alimento debe almacenarse en cuartos o almacenes desinfectados, secos y ventilados, aislado del piso, sobre parihuelas de preferencia de plástico.

El alimento no debe ser expuesto a temperaturas por encima de 25° C, humedades relativas mayores a 60%, condiciones insalubres, luz, oxígeno, insectos y roedores, porque ello aumenta el deterioro y la contaminación.

Los contenedores de alimento no deberán moverse a diferentes salas y deberán lavarse y sanearse regularmente. Si el alimento es autoclavado este requiere de una reformulación en la concentración de nutrientes, tipos de ingredientes y métodos de preparación para compensar la degradación sufrida durante la esterilización. Debe considerarse el irradiar el alimento como una opción frente al autoclavado.

3.3. PROVISIÓN DE AGUA

Debe ser renovada en forma total, diariamente o cada dos días, eliminando todo contenido residual del frasco de bebida. Los frascos de bebida deberán ser lavados y desinfectados por lo menos una vez por semana, los picos serán observados y lavados con cepillo periódicamente para evitar el taponamiento. Se recomienda la vigilancia microbiológica de manera periódica, para asegurar que la calidad del agua sea aceptable y no influya en los resultados experimentales.

3.4. MANEJO DE LECHO O CAMA

El material del lecho o cama seleccionado, deberá transportarse y almacenarse en sacos o envases de plástico, cerrados aislados del piso, sobre parihuelas, de modo que permita mantener la calidad y evitar la contaminación.

Tener cuidado durante la esterilización que se realiza por autoclavado, la viruta puede absorber humedad, perdiendo su absorbancia y ser susceptible al crecimiento de microorganismos, por ello debe usarse tiempos apropiados de secado y buenas condiciones de almacenamiento. Debe usarse en cantidades suficientes para mantener a los animales secos entre cada cambio.

Se debe tener procedimientos para la eliminación de las camas potencialmente contaminadas. Se deberá establecer procedimientos para controlar la calidad del lecho, como la determinación de contaminantes.

3.5 LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN

3.5.1 ELIMINACIÓN DE DESECHOS

El área de eliminación de desechos debe proveer espacio para el almacenaje apropiado de material relacionado con los animales, excrementos, camas sucias, cadáveres, materiales peligrosos, etc. Los desechos colocados fuera de las instalaciones se deben mantener en recipientes cerrados herméticamente.

Se debe tener normado el manejo, almacenamiento, método y frecuencia de eliminación de desechos.

3.5.2. LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN DE ÁREAS (ALOJAMIENTOS SECUNDARIOS).

Los materiales y utensilios de limpieza deberán ser exclusivos de cada una de las salas y mantenerse en buenas condiciones de uso, para evitar que actúen como vectores de microorganismos. Estos materiales son: el balde, los trapeadores, los jaladores de agua, la esponja de metal, la espátula ancha, las bolsas de residuo y el detergente.

No se debe usar desinfectantes con olores fuertes y mucho menos desodorantes de ambiente. El bioterio deberá implementar un programa de limpieza en la que se determinará la frecuencia de limpieza de las salas y los pasillos además del tipo de desinfectante por usar, señalando la metodología (manual o automático).

Se recomienda realizar la limpieza total (radical), empleando detergente para la superficie del piso, ya que este remueve y desprende toda grasa que impida la acción del desinfectante.



Fuente: Bioterio Central – CNPB del INS. 2007

Limpieza y sanitización de sala

3.5.3.1. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE JAULAS

Cambiar el material del lecho dos a tres veces por semana, para evitar concentraciones altas de amoníaco que son perjudiciales para los animales, esta frecuencia también depende del tamaño, cantidad de ratones albergados y de la ventilación del ambiente. Se recomienda tener un orden como empezar por la primera jaula de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Usar ese orden para cambiar el lecho, dar la comida y el agua. De esa forma se evita que por distracción, alguna jaula quede sin cambiar o sin alimento o agua.

En cada cambio de lecho, lavar las jaulas utilizando detergente, esponja o escobilla, luego desinfectar con soluciones como:

Tego 2000	1 mL	Benzalconio.....	5mL
Agua c.s.p.....	100 mL	Agua c.s.p.....	100 mL
Hipoclorito al 0,5% fijarse en la concentración comercial si es 5 ó 5,25%:			

Hipoclorito de sodio 5%	10mL
Agua c.s.p.....	100 mL
Hipoclorito de sodio 5,25%	9,5 mL
Agua c.s.p.....	100 mL

Si el material de la jaula es resistente a altas temperaturas, se puede esterilizar en auto clave.

3.5.3.2. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE FRASCOS BEBEDEROS

Los frascos bebederos serán lavados y desinfectados cada vez que se suministre agua de bebida. Se lavarán con agua, escobilla y detergente toda la superficie interna del frasco, igual proceder con los goteros para lo cual se usa un cepillo especial. Luego, desinfectar con agua caliente o con algún desinfectante como hipoclorito de sodio sumergiendo el bebedero durante una hora.

MANEJO DE POBLACIONES

Toda operación en un bioterio debe tener registros para el control de las poblaciones, programas de producción, y su fácil identificación, ya sean colonias de producción o animales en experimentación.

Estos registros incluyen:

Tarjetas de jaula y fichas clínicas, se colocan en las jaulas o cajas y los datos que contienen corresponden a la identificación de los ratones que se encuentran en su

interior, esos datos son:

- Procedencia.
- Fecha de ingreso de los animales.
- Fecha de traslado de sala.
- Controles realizados.
- Método de reproducción.
- Inoculaciones
- Operario y responsable del proyecto de investigación

Así mismo, se debe llevar un registro de todos los experimentos efectuados con animales de modo que facilite la inspección, en dicho registro se incluirá información sobre los diversos procedimientos realizados y los resultados de los exámenes post mórtem que se practiquen. Se llevará también, registros de control de temperatura y humedad relativa de los ambientes, así como registros limpieza y desinfección ordinaria y radical.

SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN DE JAULAS EN SALA DE PRODUCCIÓN (TARJETAS)



Fuente: Bioterio Central – CNPB del INS. 2007

SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN POR NIVELES EN RACKS



Fuente: Bioterio Central – CNPB del INS. 2007

3.7. TÉCNICAS DE MANEJO PARA RATONES JÓVENES Y ADULTOS

Ofrecen dificultad para su manejo ya que al sentirse capturados con frecuencia muerden. Debe usarse guantes exactos a la mano del operario para que no tenga dificultad en el manipuleo de los animales.

3.7.1. CAPTURA Y TRASLADO DE JAULA: SE REALIZA SUJETANDO EL ESPÉCIMEN POR LA COLA.

Para el traslado de ratones generalmente se sujetan de la región media de la cola con los dedos índice y pulgar. Otra forma es abrazándolo del cuello con el dedo índice y el pulgar.

CAPTURA Y TRASLADO DE RATONES (CAMBIO DE JAULA)



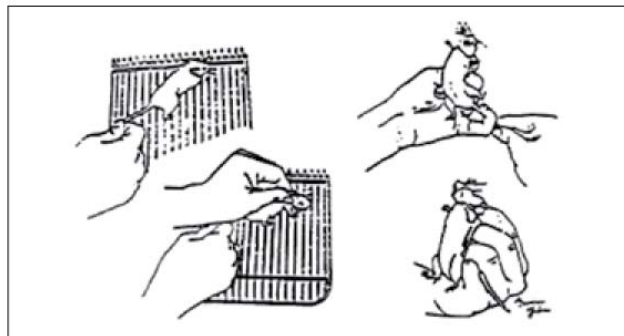
Fuente: Bioterio Central – CNPB del INS. 2007

3.7.2. SUJECIÓN CON UNA MANO (MANO IZQUIERDA)



Fuente: Bioterio Central – CNPB del INS. 2007

Sujeción con ayuda de rejilla



Fuente: <http://www.cinvestav.mx/upeal/PI-11-02.html>

- Saque el ratón de la jaula tomándolo de la zona media de la cola, y apóyelo (sin soltarlo) sobre una superficie rugosa o rejilla contra la que pueda ejercer resistencia.
- Coloque la base de la cola del ratón entre sus dedos anular y meñique, dejando libre sus dedos pulgar e índice
- Con rapidez pellizque con el dedo pulgar e índice, suave pero firmemente, la piel de la parte superior de cuello y hombros, teniendo especial cuidado con los ratones agresivos ya que pueden darse vuelta y morder.
- Levante al animal

3.8 TECNICA PARA RATONES LA

La manipulación de los recién nacidos debe hacerse rigurosamente con guantes y de manera suave y tranquila, cogerlos uno a uno o en pequeños grupos y posarlos cuidadosamente entre la palma y los dedos de la mano extendidos y juntos; devolver la camada lo más pronto posible, evitando que la madre se dé cuenta.

3.9. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

3.9.1. INYECCIONES E INOCULACIONES

Se considera apropiada la sujeción con una mano.

3.9.2. VÍA ORAL

Se puede usar el alimento o el agua, en volumen máximo de 1mL de solución por cada 100 g de peso del animal, cuando es vehículo oleoso y 2mL de solución cuando es solución acuosa; lo ideal es mediante sonda orogástrica y teniendo un buen conocimiento de la anatomía de la zona orofaríngea, los pasos a seguir son los siguientes:

Inmovilizar al animal en forma correcta e introducir la sonda hacia la izquierda en forma lenta y suave a lo largo de la rama mandibular derecha, aquí el ratón comienza a tragar y la sonda se inserta dentro del esófago.

3.9.3. VÍA SUBCUTÁNEA

Esta vía es utilizada como alternativa a la intramuscular, en los ratones. Se prefieren los sitios en que abunde tejido conjuntivo, en el dorso a nivel del cuello o los flancos. La aguja se inserta en la piel paralela a la columna vertebral. Se utiliza agujas de 25 a 27 G, ½ a ¾ pulgada con jeringas de tuberculina. Y el volumen para un ratón adulto será de 2 a 3 mL.

3.9.4 VIA INTRAPERITONIAL

Se usa jeringas y aguja calibre 25 –27 G . ½ a 1 pulgada, de bisel pequeño. Aplicando la sujeción con una mano e inmovilizando la pata izquierda del ratón, con una inclinación hacia craneal para producir un desplazamiento de las vísceras con el fin de no lesionarlas. Se inserta la aguja en la piel en el cuadrante izquierdo inferior del abdomen, luego se lleva hacia craneal y se introduce en la cavidad peritoneal, levantando la aguja en contra de la pared abdominal para evitar la punción en el interior del intestino; la jeringa con aguja debe estar paralela a la columna vertebral. Se puede administrar hasta 3 mL. Una rápida administración del fluido puede causar daños en el tejido y hemorragia debido a la presión interna.

3.9.5. VÍA INTRAVENOSA

Se utiliza agujas de 27 - 30 G y jeringas tuberculina de 1 mL. Teniendo el ratón inmovilizado dentro de un cepo (sujetador para ratón), se utilizan las venas laterales de la cola, estas se dilatan con alcohol o con calor. El volumen máximo a inocular es de 0.2 a 0.5 como máximo. Mejores resultados se logran si la cola se introduce en agua caliente o el ratón es calentado en la jaula con una lámpara. Las venas se observan cuando la cola es levantada y girada lentamente en cualquier dirección. No utilizar medicamentos con vehículo oleoso o sustancias irritantes.

3.9.6. VÍA INTRAMUSCULAR

Se realiza en la región antero-lateral del muslo con agujas de 26 a 30 G, ½ pulgada con jeringa de tuberculina. El volumen máximo es de 0,05mL. Esta vía no es muy usada debido a la poca masa muscular del ratón y al posible daño que se le puede causar a las estructuras vitales.

3.10. TÉCNICA DE EUTANASIA

Deberá elegirse un método que no cause sufrimiento al ratón. Métodos químicos:

- a) *Agentes inhalatorios*: gases anestésicos, gases no anestésicos.
- b) *Agentes no inhalatorios*: tranquilizantes (curare y estrocnina).

Para efectos de los agentes inhalatorios, los ratones son conducidos a cámaras que deben estar diseñadas adecuadamente, donde se distribuye el agente, asegurando la distribución uniforme del gas y la rápida exposición de los ratones a una concentración alta del agente.

Los ratones recién nacidos son más resistentes a la hipoxia y tardan más tiempo en morir; por ello hay que utilizar otros métodos. Es importante seleccionar agentes que no sean desagradables al ser inhalados, porque algunos pueden ser irritantes y por ello estresantes. Cuando se administren agentes inhalatorios hay que tomar precauciones de seguridad, utilizando un equipo adecuado de recogida de gases y se debe confirmar la muerte.

El más utilizado es el dióxido de carbono en concentraciones superiores a 60%, el dióxido de carbono (anhídrido carbónico) actúa como un agente anestésico y produce rápidamente la pérdida de conciencia (Green 1987). Es muy eficaz y humanitario para la eutanasia de la mayoría de los animales pequeños utilizándolo por encima del 70% de concentración.

3.11 ATENCIÓN MÉDICO VETERINARIA

La atención médico-veterinaria es un aspecto de gran importancia dentro del programa de cuidado y uso de los animales. Una adecuada atención médico-veterinaria debe contener programas eficaces de:

- Medicina preventiva.
- Vigilancia, diagnóstico, tratamiento y control de enfermedades. › Manejo de enfermedades.
- Evaluación de salud y bienestar animal.
- Método de eutanasia.

El programa de atención veterinaria es responsabilidad del médico veterinario encargado, con experiencia en ciencia y medicina de los animales de

laboratorio. Es su función el asesorar a investigadores y personal involucrado en el cuidado y uso de animales para asegurar una apropiada manipulación e inmovilización, sedación, anestesia, analgesia y eutanasia.

Por tanto, todo sistema de control, de vigilancia y de regulaciones que se establezca para la prevención de infecciones y para el control y mantenimiento del nivel higiénico-sanitario de los animales, es un aspecto fundamental y debe ser llevado a cabo con gran rigor técnico y de manera documentada.

3.12 BIOSEGURIDAD

RIESGOS DEBIDOS A LA MANIPULACIÓN DE ANIMALES

Los riesgos derivados de los animales que se utilizan en experimentación pueden clasificarse en:

- Riesgos inherentes a los animales: Los animales pueden ser portadores de enfermedades infecciosas, que pueden transmitir al personal de la unidad animal.
- Riesgos resultantes de la investigación realizada con estos animales (aplicación de vacunas, investigación de fármacos, etc.).
- Riesgos generados por los animales transgénicos. Estos animales son susceptibles de presentar patologías infecciosas muy particulares y estados inmunológicos modificados. Existe poca información al respecto, aunque por lo general los laboratorios o empresas que manipulan estos animales suelen partir de niveles de seguridad biológica elevados.

En la práctica, los riesgos derivados del trabajo con animales de experimentación deberían estar limitados por el hecho de respetar las medidas reglamentarias de aprovisionamiento y la supervisión veterinaria indispensable. Cuando se trata de evaluar el riesgo biológico es fundamental conocer la especie animal con la que se está investigando, las infecciones que puede transmitir, la naturaleza de los agentes infecciosos, etc. Es sabido, por otro lado, que cuanto más alejada filogenéticamente sea la especie de los seres humanos, menor suele ser el riesgo de transmisión de infecciones, como ocurre por ejemplo con los peces y anfibios.

RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA PROTECCIÓN DE TRABAJADORES

El personal que trabaja con animales debe estar informado de los riesgos inherentes al trabajo que realiza y recibir formación sistemática en materia de técnicas, instrumentación, métodos de trabajo y equipos de protección individual con el fin de evitar la posibilidad de con traer una enfermedad, y de impedir la dispersión del agente biológico dentro y fuera del laboratorio de experimentación animal, con el consiguiente peligro para los trabajadores y la comunidad. Desde el punto de vista estructural, los servicios relacionados con las instalaciones de los animales (almacenes de camas, de alimentos para los animales o de jaulas), así como los vestuarios y lavabos del personal, excepto cuando el nivel de seguridad requerido indica lo contrario, deben hallarse fuera de la unidad animal, pero cerca de ella.

En el trabajo de experimentación con animales, se pueden adoptar los criterios generales aplicables a los laboratorios y centros de trabajo donde se manipulan agentes biológicos, teniendo en cuenta el tipo de microorganismo con el que se trabaja, o puede ser portador el animal y, en consecuencia, aplicando el nivel de seguridad biológica correspondiente.

INSTRUCCIONES PARA EL TRABAJO EN LAS UNIDADES ANIMALES EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE SEGURIDAD REQUERIDO

NIVEL DE SEGURIDAD 1 (Medidas básicas)

Infraestructura

Los locales deben ser cerrados y protegidos procurando que las salidas hacia el exterior sean las menos posibles. Las puertas de la unidad animal deben tener un dispositivo de cerradura automática y permanecer cerradas.

Los techos, paredes y suelos deben ser de materiales resistentes y con un recubrimiento no poroso fácil de lavar y de desinfectar. El suelo debe ser uniforme, impermeable y antideslizante, capaz de soportar sin peligro el peso y el desplazamiento de las jaulas o de cualquier otro equipo móvil. Los sifones de los desagües deben ser descontaminados regularmente.

Todas las aberturas (puertas, ventanas, bocas de aireación, orificios de evacuación de líquidos, etc.) deben estar provistas de dispositivos que impidan la entrada de insectos,

roedores salvajes u otros animales que pueden ser portadores de agentes patógenos para el hombre. Deberá informarse al responsable de la unidad animal de cualquier intrusión de este tipo que se produzca.

En cada local destinado a la instalación de animales debe haber un lavabo para el lavado de manos y se ha de prever una instalación para el lavado de jaulas. La superficie que recubre el suelo de las jaulas no sólo debe mantenerse limpia sino que es imprescindible que sea renovada periódicamente a fin de evitar que se convierta en una fuente de infección e infestación de parásitos. Las jaulas limpias se guardarán en un local separado.

Debe disponerse de locales separados para el almacenaje de los alimentos y para las camas de los animales. El almacén de alimentos debe situarse en una zona fresca, seca y libre de parásitos e insectos, mientras que el de camas deberá situarse en un lugar seco y libre de parásitos e insectos.

Según el origen de los animales, los locales deben estar preparados para una cuarentena, cuya duración será variable según las especies y tanto más larga cuanto mayor sea el riesgo de zoonosis. Para llevar a cabo la cuarentena, los locales deberán estar adecuados al nivel de riesgo estimado, y la conducta que se debe seguir por el personal será la correspondiente a dicho nivel. Deben tomarse medidas de seguridad para evitar fugas de animales al exterior (barreras sucesivas, neutralización). Si se escapan de las jaulas pequeños roedores u otros animales de laboratorio, se sacrificarán una vez capturados y se eliminarán como residuo sanitario no específico, grupo II

Habrá que notificar inmediatamente cualquier enfermedad o muerte inesperada que se produzca entre los animales. A los que presenten una enfermedad imprevista no se les tocará mientras no se reciban instrucciones al respecto del responsable de la unidad animal o de otra persona competente.

El sistema de ventilación debe ser apropiado a las exigencias termohigrométricas de las especies albergadas y garantizar alrededor de 15 renovaciones/hora para la reducción de los malos olores y las concentraciones de gases y vapores en aire, circulando siempre del lugar menos contaminado al más contaminado. En algunas circunstancias puede requerirse un factor de renovación mayor (hasta 20 o más renovaciones/hora), o bien, cuando la densidad de ocupación sea baja, podrían ser suficientes de 8 a 10 renovaciones/hora o incluso no ser imprescindible la renovación mecánica.

Conducta del personal

Todo el personal (cuidadores o investigadores) entrará en la sala de manipulación con bata o guardapolvo específicos para este cometido, permitiéndose la entrada únicamente a las personas que vayan a participar en un experimento o a las que haya sido expresamente autorizada su entrada por el responsable de la instalación.

Es necesario lavarse las manos cuidadosamente después de manipular animales muertos o vivos y siempre al abandonar el local. Las heridas que se produzcan al manipular animales, por triviales que parezcan, deben ser objeto de tratamiento inmediato. Conviene estimular la hemorragia y lavar después la herida con abundante agua y jabón; se aplicará luego un apósito protector y se procurará iniciar el tratamiento lo antes posible. Estos requisitos se aplicarán especialmente a las heridas causadas por los animales.

Estará prohibido comer, beber, fumar y almacenar alimentos de consumo humano dentro de los locales destinados a los animales. Se adoptarán procedimientos de trabajo, que impidan o minimicen la generación de aerosoles. Debe tenerse en cuenta que la excreción de agentes por la saliva, heces y la orina contaminan las jaulas y las camas de los animales y cuando éstas se remueven pueden generarse aerosoles.

Todo el personal que trabaje en la sección destinada a los animales estará inmunizado contra el tétanos, así como también contra todas aquellas enfermedades que se crea conveniente y para las que, evidentemente, se disponga de vacuna. Debe tenerse en cuenta también que todos los animales de experimentación pueden ser portadores asintomáticos de microorganismos peligrosos para el hombre.

Hay que tomar precauciones especiales con los medicamentos administrados a los animales de laboratorio con fines de sedación o eutanasia, debiéndose llevar un estricto control de los mismos. Como norma general, al menos uno de los trabajadores de la unidad animal debe estar informado de las medidas de emergencia aplicables en casos de autoinyección accidental del operador. Debe tenerse especial precaución en la utilización de los anestésicos volátiles, ya que en los recintos cerrados pueden afectar al personal y también pueden generar atmósferas explosivas.

Alojamiento de los animales

Las jaulas, cajas, estanterías e instalaciones en general, deben construirse con materiales apropiados y estar concebidos de manera que no presenten ningún riesgo para el animal y puedan desinfectarse fácilmente.

Debe estar garantizado un control periódico de los animales. A su llegada, deben ser cuidadosamente examinados por una persona competente, que defina las medidas de cuarentena eventuales. No pueden introducirse animales provenientes del exterior sin la autorización del responsable de la unidad.

Los cadáveres y desechos de los animales deben eliminarse rápidamente en las condiciones que se expresen en la reglamentación existente. En la espera, se guardarán en un frigorífico dentro de un embalaje estanco, descuartizado si se trata de un animal grande. En caso de marcaje radiactivo, las condiciones de eliminación son las definidas en la reglamentación sobre residuos radiactivos y deben respetarse rigurosamente.

NIVEL DE SEGURIDAD 2

Infraestructura

La unidad animal estará situada en una zona del edificio especialmente reservada para ello, alejada de las zonas de paso. El acceso a la misma estará concebido de forma que permita al personal cambiarse de ropa para acceder a dicha unidad y deberá disponerse de un autoclave cerca de la misma.

Las jaulas de los animales deben ser desinfectadas preferentemente por autoclavaje. Si esto no es posible, la desinfección se llevará a cabo mediante una solución descontaminante eficaz (hipoclorito sódico, por ejemplo). También las superficies de trabajo se descontaminarán inmediatamente al finalizar un experimento.

La señalización internacional de peligro biológico se colocará en las puertas de la unidad animal, todas las aberturas de la cual se podrán cerrar herméticamente.



Señal de peligro biológico

Conducta del personal

Será obligatorio llevar guantes, resistentes a las mordeduras y arañazos cuando se manipulen animales infectados, o impermeables cuando la exposición cutánea al material infeccioso sea inevitable.

El personal se cambiará de ropa de trabajo y zapatos al entrar y salir de la unidad animal. Son aconsejables los zapatos cerrados y, llegado el caso, se usarán con fundas protectoras. También es recomendable el uso de mascarillas quirúrgicas.

El acceso a la unidad animal se limitará al personal que esté específicamente informado del riesgo biológico y cuya presencia sea necesaria para la investigación que se lleve a cabo. El médico de empresa será quien determine las personas, que por ser de alto riesgo, no estarán autorizadas a entrar en el animalario.

Alojamiento de los animales

Deben tomarse precauciones para evitar toda agresión por parte de los animales durante las diferentes fases de la experimentación. Por ello, deberán utilizarse jaulas de contención y se deberá anestesiar al animal antes de cogerlo.

Toda manipulación susceptible de generar un aerosol infeccioso deberá efectuarse dentro de una cabina de seguridad biológica (clase I o II) o con una protección personal facial (máscara, gafas), sobre todo en autopsias de animales infectados, en la recogida de tejidos infectados, líquidos orgánicos o huevos infectados y en la inoculación intranasal de material infeccioso.

Los residuos de la unidad animal se descontaminarán (en el autoclave o en una cabina de fumigación) antes de ser eliminados por las vías convencionales. Los animales muertos se evacuarán del animalario en bolsas de plástico dobles, soldadas y estancas o en contenedores herméticos y se eliminarán como residuo sanitario específico o de riesgo, grupo III.

NIVEL DE SEGURIDAD 3

Infraestructura

Los dispositivos de lavado de manos serán con accionamiento mediante el codo, el pie o bien de manera automática, y se colocarán próximos a la puerta de salida. El autoclave estará situado en el interior de la unidad animal. Cuando se trate de animales

grandes, se dispondrá de un dispositivo de fumigación o de un baño con desinfectante, con la posibilidad de acceso por el interior y el exterior de la unidad.

El acceso a la zona (nivel 3) deberá estar señalizado y provisto de un compartimento con doble puerta. Las ventanas no serán practicables. Debe disponerse de un vestuario con ducha, próximo a la puerta de entrada.

El sistema de ventilación debe evacuar el aire al exterior del edificio en una zona donde no haya ningún riesgo de reciclado. Si ello no es posible, el aire extraído deberá ser filtrado a través de filtro de alta eficacia HEPA. La entrada de aire debe ser de tal forma que en la unidad la corriente circule del exterior de la zona hacia el interior, estando el vestíbulo en depresión intermedia.

Si se utiliza un circuito de vacío, debe estar protegido por filtros HEPA y las trampas de agua han de contener un desinfectante apropiado. Se ha de desechar la conexión a un circuito de vacío general.

Conducta del personal

El vestuario de trabajo tiene que ser completo, con protectores de zapatos o botas y máscara filtrante y se debe descontaminar antes de llevar a lavar. Mediante consignas estrictas, se definirá el método de descontaminación de la zona. Será obligatorio llevar guantes resistentes para la manipulación de los animales que se han de descontaminar en el autoclave después de usarlos.

Alojamiento de los animales

En cada local dedicado a una especie diferente de microorganismo, las jaulas ocupadas por los animales infectados deben estar situadas en recintos de seguridad adaptados.

El aire filtrado proveniente de estos recintos deberá expulsarse dentro del circuito de extracción principal del laboratorio o directamente al exterior, siempre con la garantía de que no haya riesgo de reciclado.

Los animales muertos deben ser colocados en una doble bolsa estanca dentro de la unidad; el exterior de la bolsa se descontaminará por fumigación o sumergiéndolo en un baño descontaminante. Después, debe eliminarse como residuo sanitario específico o de riesgo, grupo III.

Si es posible, las jaulas serán descontaminadas en el autoclave antes del cambio de la cama y antes de la limpieza. Para las jaulas de grandes dimensiones, se han de tomar precauciones particulares para la manipulación de las camas: se cubrirán las cubetas que contienen las camas con plástico sobresaliendo por los bordes de forma que se

pueda coger por los extremos y pueda depositarse dentro de las bolsas de plástico fácilmente; la descontaminación de la jaula puede hacerse en un baño descontaminante, dentro de la unidad animal.

NIVEL DE SEGURIDAD 4

Infraestructura

La unidad animal estará situada en un edificio separado o dentro de una zona claramente aislada en el interior del edificio. Si hay aberturas, deberán estar selladas. Será obligatorio un vestuario de doble zona con ducha en cada entrada.

Las conducciones eléctricas, luminarias, bocas y conductos de aspiración, deberán concebirse de manera que la deposición de polvo sea la mínima posible. Los circuitos de ventilación deben ser totalmente estancos y las puertas de la unidad deberán poder cerrarse con llave. Una señal debe indicar cuando los animales infectados estén presentes en el interior de la misma.

El sistema de ventilación ha de ser autónomo, ha de mantener una depresión controlada, siempre circulando de la zona menos contaminada hacia las zonas de mayor contaminación. El aire extraído se filtrará a través de filtros HEPA y deberá expulsarse al exterior lejos de todas las bocas de aspiración de aire. Un sistema de alarma advertirá de cualquier fallo en el funcionamiento.

El aire expulsado de las cabinas de seguridad, si se filtra a través de filtros HEPA, se podrá expulsar al exterior por el conducto de evacuación general. Si no es así, debe hacerse pasar a través de los filtros principales de tratamiento de aire antes de expulsarse al exterior. Deben tomarse precauciones durante el cambio de los filtros, llevando a cabo su descontaminación previa y empleando ropa de protección.

La descontaminación por el calor o con una solución descontaminante de eficacia comprobada es obligatoria para todos los efluentes líquidos: lavabo, aseo, ducha, sifón del WC y condensaciones del autoclave, que debe ser de doble puerta.

Conducta del personal

El acceso a los locales estará restringido únicamente al personal autorizado por el director, oída la opinión del servicio médico, informando de los riesgos, así como la manera como debe protegerse.

El personal entrará y saldrá por el compartimento estanco del vestuario. La ropa de calle se quitará en la zona limpia y se colocará ropa de trabajo completa (guarda polvo,

pantalón, camisa, calzado y guantes) al entrar al animalario. A la salida, esta ropa se quitará y se dejará en la zona de espera del animalario. Será obligatorio ducharse antes de ponerse la ropa de calle de nuevo.

Será obligatoria una vigilancia médica especial para las personas que trabajan o que tienen acceso a la unidad animal, creándose una seroteca de dicho personal.

Deberán dictarse normas muy detalladas de la conducta que se debe seguir ante situaciones de emergencia (evasión de un animal, conato de incendio, fugas, vertidos, etc.). El personal de la unidad animal deberá ser informado sobre el cumplimiento de estas normas.

Alojamiento de los animales

Los animales infectados deben ser mantenidos en las cabinas de confinamiento de clase III, dentro de salas en depresión o dentro de los dispositivos de confinamiento parcial, ventilados por una corriente de aire ascendente filtrada a través de filtros HEPA. Los cadáveres, partes del cuerpo y otros residuos anatómicos, camas de estabulación o cualquier material contaminado, procedente de animales que hayan estado inoculados con agentes biológicos grupo 4, se eliminarán como residuo sanitario específico o de riesgo, grupo III.

GLOSARIO

- AAALAC Internacional: organización privada no gubernamental, que promueve el trato humanitario hacia los animales en las actividades científicas, mediante programas voluntarios de evaluación y acreditación. AAALAC International significa “Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio” (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International).
- AALAS: American Association for Laboratory Animal Science.
- Agentes biológicos: cualquiera de los microorganismos de ciertas clasificaciones o cualquier sustancia toxica derivada de organismos vivos que pueden producir muerte o enfermedad en el hombre, animales o plantas en desarrollo
- Agentes físicos: objetos o infraestructuras inanimadas o estados de la materia capaces de producir cambios fisiológicos.
- Agentes químicos: sustancias que producen efectos letales, lesivos o irritantes.
- Alojamiento primario o recinto primario: generalmente una jaula, constituye los límites del ambiente inmediato del animal. Este debe permitir satisfacer las necesidades fisiológicas y de conducta del animal, permitiendo el acceso al agua y alimento y también brindar facilidades para el cambio, limpieza, etc.
- Alojamiento secundario o recinto secundario: todos los componentes de las instalaciones para animales, incluyendo salas de animales y espacios de apoyo (sala de almacenamiento, instalaciones, sala de lavado de jaulas, corredores y salas para cuarentena y procedimientos)
- Área limpia: áreas cerradas, con características especiales de limpieza y uso de sustancias desinfectantes. Tienen sistemas de suministros de aire, con diferencias de presión. Área que cuenta con un control definido del medio ambiente con respecto a la contaminación con partículas o microorganismos, con instalaciones construidas y usadas de tal manera que se reduzca la introducción, generación y retención de contaminantes dentro del área. También denominada área gris.
- Asepsia: métodos o procedimientos que impiden o evitan el acceso de gérmenes patógenos o infecciosos.

- Bioseguridad: conjunto de medidas preventivas que reconocidas internacionalmente orientadas a proteger la salud y la seguridad del personal y su entorno. Complementariamente se incluye normas contra riesgos producidas por agentes físicos, químicos y mecánicos.
- Capacitación: acción de enseñar o habilitar a las personas para el cuidado y la utilización correcta de los animales de laboratorio.
- Cepa: grupo de animales comprendido dentro de una especie o variedad, de ascendencia conocida, mantenidos en un sistema de acoplamiento consanguíneo planificado, que se caracteriza por alguna propiedad en particular.
- Colonia: grupo de animales que representa una fuente genética única, producida bajo condiciones idénticas de gestión con fines de reproducción.
- Contaminación: presencia de un agente infeccioso en la superficie del organismo; también en vestimenta, instrumentos quirúrgicos u otros objetos o sustancias, incluyendo el agua y los alimentos.
- Control de calidad: conjunto de procedimientos, técnicos y actividades operativas, destinados a medir, confrontar y verificar que un producto cumpla con las características y especificaciones planificadas.
- Control de plagas: la aplicación de métodos, procedimientos, y registros con relación a todos los animales, (incluyendo aves, roedores e insectos) que deben excluirse de las instalaciones donde se crían los animales de experimentación.
- Cuarentena: periodo de aislamiento al que se someten los animales de laboratorio, en un lugar específico, con el fin de conocer su estado de salud.
- Desinfección: procedimiento destinado a destruir los agentes patógenos para los animales y el ser humano, que se aplica a los locales, vehículos, así como a los implementos que sean usados en los establecimientos. Se debe efectuar posteriormente a la limpieza.
- Desinfectante: agente químico empleado para la inactivación o destrucción de bacterias vegetativas, hongos, virus pero no necesariamente esporas bacterianas, generalmente se usa productos de limpieza eficaces, de composición conocida, no tóxico y fácil de aplicar

- Detergente: agente de limpieza que se emplea para eliminar residuos insolubles en el agua mediante tres mecanismos: humectación, emulsificación y dispersión.
- Esterilización: proceso para la destrucción de toda forma de vida. Se realiza por medio de vapor húmedo saturado a presión (autoclave), por calor seco (horno), incineración, combustión (mechero de Bunsen) y mediante agentes químicos.
- Estrés: reacción de los organismos vivos a diversos estímulos adversos, internos o externos, que tienden a alterar el equilibrio psicológico y fisiológico de un animal, a través de su exposición a condiciones extremas, señalándose a ésta última como “diestrés”.
- Eutanasia: procedimiento humanitario empleado para terminar con la vida de los animales de laboratorio, sin producirles sufrimiento.
- Incineración: método de tratamiento de residuos que consiste en la oxidación química para la combustión completa de los residuos en instalaciones apropiadas, a fin de reducir y controlar riesgos a la salud y el ambiente.
- Modelo biológico: que posee una estructura que reproduce un efecto, proveniente del sujeto original. Se usa para extrapolar resultados desde una especie animal hacia el ser humano.
- Palatable: agradable al gusto.
- Procedimiento: es el documento de calidad que detalla la manera en que se debe ejecutar una actividad.
- Protocolo de investigación: documento que describe las hipótesis por investigar, los objetivos del trabajo, fundamentos, diseño, metodología, consideraciones estadísticas, participantes, calendario de evolución, organización y supervisión.
- Riesgo: probabilidad de que ante un determinado peligro se produzca un cierto daño, pudiendo por ello, cuantificarse.
- Salud ocupacional: estado de salud, relacionado con la ocupación laboral del individuo.
- Sistema reproductivo monogámico: apareamiento de un espécimen macho con su respectiva hembra.
- Sistema reproductivo poligámico: apareamiento de un espécimen macho y más de

una hembra, por lo general de tres a cuatro especímenes hembras.

- Tratamiento de material solido: procedimiento que permita modificar la característica física, química o biológica del residuo sólido, a fin de reducir o eliminar su potencial peligro de causar daños a la salud y al ambiente.
- Zoonosis: denominación genérica de las enfermedades infecciosas de los animales que pueden ser transmitidas al hombre.

BIBLIOGRAFÍA

1. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Temas seleccionados sobre medicina de animales de laboratorio: El ratón. Río de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa; 1988. Serie de Monografías Científicas y Técnicas N.º 3. Disponible en: <http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/SerMonCienTec3.pdf>.
2. Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Edición Mexicana. Washington: National Academy Press; 1999. Disponible en: <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/careuse.htm>
3. Kreger MD. Training materials for animal facility personnel. Beltsville: National Agricultural Library; 1995.
4. Nomura T. Defined laboratory animals. *Adv Pharmacol Therap* 1987; 5: 325-33.
5. Office of the Federal Register National and Records Administration. Code of Federal Regulations. Title 9, Animals and Animal Products. Washington DC: US Government Printing Office; 1992.
6. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993. Disponible en: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/ExperimentalAnimals_GDL.pdf
7. Quezada A. Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán; 1997.
8. Riera L. Animales libres de patógenos específicos. La Habana: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio; 2006.
9. Servicio Nacional de Salud Agraria (SENASA), Servicio Nacional de salud. La calidad de los animales de laboratorio y su influencia en las pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad. Lima: Senasa; 2004.
10. Tur-Mari JA, Orellana-Muriana JM (editors). Animal research and welfare: a partnership. FELASA-ICLAS Joint Meeting, 7th symposium, Palma de Mallorca 26-28 May 1999. London: Laboratory Animal Ltd; 2000.

11. Venezuela, Ministerio de Ciencia y Tecnología. Código de bioética y seguridad. 2ª ed. Caracas: FONACYT/ Ministerio de Ciencia y Tecnología; 2002. Disponible en: <http://www.fonacit.gov.ve/bioetica.asp>
12. WHO Expert Comité on Biological Standardization. Good manufacturing practices for biological products. 42nd Report. Geneva: WHO; 1992. WHO Technical Report Series N.º 822. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_822 .pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_822.pdf)