



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

"Determinación de Buenas Prácticas de Producción de Ratas  
(*Rattus norvegicus*) en el Bioterio de la / Escuela de  
Bioquímica y Farmacia"

TESIS DE GRADO PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**PRESENTADO POR:**

VERÓNICA MONSERRATH BUENAÑO ZAMBRANO

RIOBAMBA – ECUADOR

2011

**Dedicatoria**

A mi hijo Daniel, razón de Ser.

## **Agradecimiento**

A Dios y la Virgen María Auxiliadora por su guía y bendición.

A mis padres por su apoyo y abnegada ayuda.

A mis hermanas, a mis sobrinas, a mi Esposo e hijo por su invaluable compañía.

A mis amigos y amigas por compartir tantos momentos.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Empresa Eléctrica Riobamba (EERSA), a la Dirección de Higiene Municipal, a Purifluidos, a CESTTA y al Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias por su gran colaboración.

Al Dr. Francisco Portero, a las Dras. Aída Fierro, Sandra Escobar, Ana María López y María Gracia por su enseñanza y el gran aporte en la realización de esta tesis.

A todos un sincero Gracias.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE  
CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: "Determinación de Buenas Prácticas de Producción de *Rattus norvegicus* en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia - ESPOCH", de responsabilidad de la señorita egresada Verónica Monserrath Buenaño Zambrano, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Yolanda Díaz.  
DECANA FACULTAD DE  
CIENCIAS

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Luis Guevara  
DIRECTOR ESCUELA DE  
BIOQUÍMICA Y FARMACIA

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Francisco Portero  
DIRECTOR DE TESIS

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dra. Aída Fierro  
MIEMBRO DE TRIBUNAL

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tec. Carlos Rodríguez  
DIRECTOR CENTRO  
DE DOCUMENTACIÓN

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

NOTA DE TESIS ESCRITA

\_\_\_\_\_

Yo, Verónica Monserrath Buenaño Zambrano, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

---

**VERÓNICA MONSERRATH BUENANO ZAMBRANO**

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>ICLAS</b>	International Council for Laboratory Animal Science
<b>CCAC</b>	Canadian Council on Animal Care
<b>FELASA</b>	Federation of European Laboratory Animal Science
<b>CICUAL</b>	Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
<b>ISO</b>	Organización Internacional de Estandarización
<b>INHMT</b>	Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical
<b>BPP</b>	Buenas Prácticas de Producción
<b>CD</b>	Crías Destetadas
<b>CNV</b>	Crías Nacidas Vivas
<b>BPM</b>	Buenas Prácticas de Manufactura
<b>BPL</b>	Buenas Prácticas de Laboratorio
<b>UNESCO</b>	Fondo de las Naciones Unidas para el Desarrollo
<b>NRC</b>	National Research Council
<b>DNA</b>	Ácido Desoxiribonucleico
<b>NOD</b>	Non Obese Diabetic mice
<b>USA</b>	United States of America
<b>WD</b>	Wistar
<b>SD</b>	Sprague - Dawley
<b>LE</b>	Long Evans

<b>EUA</b>	Estados Unidos de América
<b>F</b>	Grados Fahrenheit
<b>C</b>	Grados Centígrados
<b>SPF</b>	Specific Pathogens Free
<b>GF</b>	Germ Free
<b>PCC</b>	Puntos Críticos de Control
<b>PCA</b>	Plate Count Agar
<b>m<sup>2</sup></b>	Metro cuadrado
<b>m<sup>3</sup></b>	Metro cúbico
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro cuadrado
<b>cm</b>	Centímetro
<b>mcg</b>	Microgramo
<b>mm</b>	Milímetro
<b>pH</b>	Potencial Hidrógeno
<b>EMB</b>	Eosina Azul de Metileno
<b>CO<sub>2</sub></b>	Anhídrido Carbónico
<b>H<sub>2</sub></b>	Hidrógeno molecular
<b>Ü<sub>2</sub></b>	Oxígeno molecular
<b>SH<sub>2</sub></b>	Sulfuro de Hidrógeno/ Gas sulfhídrico
<b>NaOH</b>	Sodio Hidróxido
<b>MA</b>	Macroambiente
<b>Ma</b>	Microambiente

<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>dB</b>	Decibeles
<b>Lux</b>	Luxes
<b>MNPC</b>	Muy Numerosas para Contar
<b>g</b>	Gramo
<b>T°</b>	Temperatura
<b>NP</b>	No se encontró Parásitos en la muestra
<b>QGL</b>	Quistes de <i>Giardia lamblia</i>
<b>LSS</b>	Larvas de <i>Estrongiloides estercoralis</i>
<b>HEV</b>	Huevos de <i>Enterobius vermicularis</i>
<b>HTT</b>	Huevos de <i>Trichurís trichiura</i>
<b>esc</b>	Escasos
<b>num</b>	Numerosas
<b>alg</b>	Algunas
<b>WBC</b>	Glóbulos Blancos
<b>RBC</b>	Glóbulos Rojos
<b>HGB</b>	Hemoglobina
<b>HCT</b>	Hematocrito
<b>PLT</b>	Plaquetas
<b>ML</b>	Microlitro
<b>dL</b>	Decilitro
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milimetro cúbico

## ÍNDICE GENERAL

### ÍNDICE DE ABREVIATURAS

### ÍNDICE DE TABLAS

### ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

### ÍNDICE DE FIGURAS

### ÍNDICE DE ANEXOS

### INTRODUCCIÓN

### JUSTIFICACIÓN

### OBJETIVOS

### CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	BUENAS PRÁCTICAS DE PRODUCCIÓN.....	1
1.1.1	INDICADORES UTILIZADOS EN BPP.....	2
1.2	BIOTERIO.....	4
1.3	EL REACTIVO BIOLÓGICO.....	5
1.3.1	HISTORIA Y OBJETIVO DE LAS CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO Y LOS PROGRAMAS RELACIONADOS CON EL CUIDADO DE LOS ANIMALES.....	6
1.3.2	EXPERIMENTACIÓN BASADA EN ANIMALES.....	6
1.3.2.1	PRINCIPIOS BÁSICOS PARA EL MANEJO DE ANIMALES.....	8
1.3.2.2	PROTOCOLO PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES.....	10
1.3.2.3	NORMAS ÉTICAS EN EL MANEJO DE ANIMALES.....	11
1.3.3	GENÉTICA Y REPRODUCCIÓN.....	13
1.3.3.1	TIPOS GENÉTICOS.....	13
1.3.3.2	MÉTODOS DE APAREAMIENTO.....	17
1.3.3.3	CONTROL GENÉTICO.....	18
1.3.3.4	BANCO DE EMBRIONES.....	19

1.3.3.5 ELECCIÓN DEL MODELO GENÉTICO.....	19
1.3.3.6 NOMENCLATURA.....	20
v	
2.2.4.6 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ESTANTERÍAS, JAULAS Y COMEDEROS.....	60
2.2.4.7 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA.....	61
2.2.4.8 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL ALIMENTO.....	62
2.2.4.9 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	63
2.2.4.9.1 ANÁLISIS FÍSICO.....	63
2.2.4.9.2 ANÁLISIS ANATÓMICO.....	64
2.2.4.9.3 ANÁLISIS HEMATOLÓGICO.....	65
2.2.4.9.4 IDENTIFICACIÓN DE ECTOPARÁSITOS.....	65
2.2.4.9.5 IDENTIFICACIÓN DE ENDOPARÁSITOS.....	66
2.2.4.9.6 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	66
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>80</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>80</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>98</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>98</b>
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>102</b>
<b>CAPÍTULO VI</b>	<b>103</b>
<b>6. RESUMEN Y SUMMARY.....</b>	<b>103</b>
<b>CAPÍTULO VII</b>	<b>105</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>105</b>
<b>CAPÍTULO VIII</b>	<b>111</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>111</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1</b>	TEMPERATURAS DE BULBO SECO RECOMENDADAS PARA ANIMALES DE LABORATORIO.....	41
<b>TABLA 2</b>	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AIRE EN EL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	81
<b>TABLA 3</b>	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ESTANTERÍAS DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	82
<b>TABLA 4</b>	INTENSIDAD DEL RUIDO EMITIDO A LA ESTANTERÍA 1 DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	83
<b>TABLA 5</b>	INTENSIDAD DEL RUIDO EMITIDO A LA ESTANTERÍA 2 DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	83
<b>TABLA 6</b>	CANTIDAD DE LUZ PRESENTE EN LA ESTANTERÍA 1 DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	84
<b>TABLA 7</b>	CANTIDAD DE LUZ PRESENTE EN LA ESTANTERÍA 2 DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	84
<b>TABLA 8</b>	CONTROL DE LA TEMPERATURA DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	85
<b>TABLA 9</b>	CONTROL DE HUMEDAD RELATIVA EN EL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	86
<b>TABLA 10</b>	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE JAULAS EXISTENTES EN EL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	87
<b>TABLA 11</b>	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COMEDEROS DE LOS ANIMALES DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	88
<b>TABLA 12</b>	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL ALIMENTO DE LOS ANIMALES DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	89
<b>TABLA 13</b>	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA UTILIZADA EN EL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	90
<b>TABLA 14</b>	CONTROL DE PESO DE <i>Rattus norvegicus</i> EN EL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	91
<b>TABLA 15</b>	IDENTIFICACIÓN DE ECTOPARÁSITOS PRESENTES EN <i>Rattus norvegicus</i> EN EL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	92
<b>TABLA 16</b>	IDENTIFICACIÓN DE ENDOPARÁSITOS PRESENTES EN <i>Rattus norvegicus</i> EN EL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	93

<b>TABLA 17</b>	BIOMETRÍA HEMÁTICA POR GRUPOS ETARIOS DE <i>Rattus norvegicus</i> EN EL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	94
<b>TABLA 18</b>	FÓRMULA LEUCOCITARIA POR GRUPOS ETARIOS DE <i>Rattus norvegicus</i> EN EL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	95
<b>TABLA 19</b>	MICROORGANISMOS PRESENTES EN <i>Rattus norvegicus</i> DEL BIOTERIO DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.....	96

## INTRODUCCIÓN

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos hasta la fecha son insustituibles.(25)

El uso de los animales de laboratorio en las investigaciones biomédicas representa un elemento fundamental en el desarrollo de importantes avances en la prevención y tratamiento de las enfermedades transmisibles y no transmisibles.(25)

En los países desarrollados, fundamentalmente, existe toda una estructura en torno a los animales de laboratorio, tanto gubernamental como privada. A partir de 1940 se inició la creación de una nueva especialidad dentro de la medicina veterinaria: "La ciencia de los animales de Laboratorio".(11)

Esta ciencia se basa en investigaciones, normas, principios y legislaciones. En Países como Estados Unidos, Canadá, la Comunidad Económica Europea y Japón, existen legislaciones nacionales y/o institucionales que regulan el uso de los animales de laboratorio como son: International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS); Canadian Council of Animal Care (CCAC) y Federation of European Laboratory Animal Science (FELASA), entre otras.(4)

Universidades como la de Sevilla, la de México, la de Buenos Aires y la de Colombia disponen de completos bioterios cuyo diseño está dirigido a proporcionar la salud y el bienestar que requieren los animales que ahí se crían y mantienen.

El Bioterio de la Universidad Nacional de México, es un bioterio de primer mundo pues cuenta con instalaciones, equipos y métodos del más alto nivel para hacer de este una fábrica de producción animal con estándares internacionales garantizados con la norma ISO-9000.(32)

Esto además, garantiza la puesta en marcha de un Bioterio con los más altos estándares internacionales, cuyos animales tienen un estricto control genético y microbiológico. Esto se traduce en un mayor rigor de los resultados de diversas investigaciones científicas, pues garantiza que los experimentos en modelos vivos se realicen en poblaciones absolutamente controladas. (32)

En el Ecuador varias universidades cuentan con un bioterio destinado al estudio, pruebas y producción de animales, sin embargo ninguno se parece en algo a los bioterios de las universidades del exterior.

De igual manera el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical "Leopoldo Izquieta Pérez" en la ciudad de Guayaquil cuenta con un bien adaptado bioterio, sin embargo el mismo no cumple con las normas suficientes para la producción y utilización de animales de experimentación.

El Bioterio del INHMT se hace cargo de la producción de animales de laboratorios usados en: Elaboración de productos Biológicos (por ejemplo: vacuna antirrábica CRL), Control de productos (pruebas de potencia, esterilidad, viabilidad) previo a la obtención de registro sanitario y Control de medicamentos, cosméticos y alimentos.

Los animales que tiene a disposición el INHMT son Ratón, Cobayo, Conejo, Rata y Hámster, los mismos que no poseen una clasificación microbiológica definida por lo que los resultados que obtiene el Ministerio de Salud no están lo suficientemente sustentados, pues se conoce que la microbiota de un animal influye en mucho en los resultados de determinado tipo de estudios.

En el bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se produce y se mantiene ratas, ratones albinos sin embargo sus instalaciones no son adecuadas y las mismas no permiten un desarrollo y control óptimo de los parámetros biológicos y habitacionales de dichos animales.

Por tal razón y en vista de la situación actual del bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, el desarrollo de esta investigación tiene por objeto contribuir a difundir los principios éticos y las buenas prácticas de laboratorio que rigen el uso de los animales de experimentación en las investigaciones biomédicas y biológicas, mediante la realización de pruebas microbiológicas, físicas y sanitarias; en el ambiente y en los animales de laboratorio.

Esto significará poseer animales de experimentación con una composición genético-sanitaria definida, que sean criados y mantenidos en ambientes controlados y, que cumplan con los requerimientos específicos para cada especie, de esta manera se garantiza el bienestar animal, además de futuras investigaciones con resultados confiables y veraces.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. BUENAS PRÁCTICAS DE PRODUCCIÓN (BPP)

Son el conjunto de procedimientos, condiciones y controles que se aplican en las unidades de producción, los cuales incluyen limpieza de instalaciones físicas, equipo y utensilios e higiene y salud del personal para minimizar el riesgo de contaminación física, química y biológica durante la cría, manejo y salud del animal.(49)

Las Buenas Prácticas de Producción están basadas en Normas, Regulaciones, Guías y Procedimientos establecidos a nivel internacional sobre un tema específico y se adoptan de forma íntegra o se adaptan a cada Organización.(49)

La disponibilidad de animales con una alta calidad genética y microbiológica para la investigación es un importante problema, ya que el uso de los mismos con una baja calidad crea una dificultad para la confiabilidad de los resultados.

Por tanto para que una investigación se considere de alta calidad se hace necesario que los biomodelos experimentales usados sean seleccionados de fuentes genéticamente definidas y posean características fundamentales: una microbiota que sea mínima, estable y conocida, una genética definida y que esté bien caracterizado para el uso que va a tener en la investigación o producción. Solo así, utilizando animales definidos y estandarizados se obtienen resultados confiables y reproducibles.

Para mejorar el nivel de experimentación animal, es esencial el establecimiento de sistemas de producción, la estandarización de parámetros de calidad genéticos e higiénico sanitarios para los animales y la creación de un sistema de vigilancia que garantice que estos cumplan con las exigencias necesarias y mantengan su *status* microbiológico para garantizar las investigaciones.(49)

La implantación de las buenas prácticas de producción de animales de experimentación, comprende un sistema de normas y lineamientos a seguir que garantizan la calidad de los sistemas productivos y es de gran ayuda para la disminución del riesgo de infecciones zoonóticas, lo cual permite una calidad confiable de los experimentos y una reproducibilidad de los datos de investigación donde se empleen biomodelos experimentales.(49)

Una descripción del diseño e implementación de BPP en la producción de animales experimentales se puede realizar empleando para ello los siguientes indicadores:

### 1.1.1. INDICADORES UTILIZADOS EN BPP

- Indicadores zootécnicos.
- Eficiencia en la monta o Fertilidad.
- CNV /Reproductora.
- CD/ Reproductora.
- Producto por Reproductora.

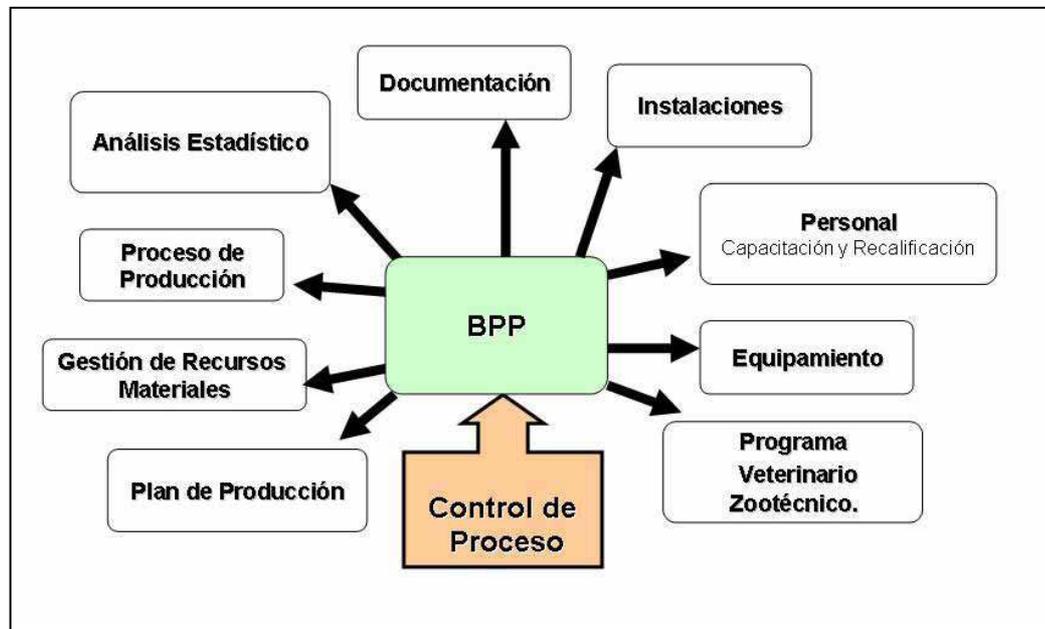
Para la realización de los cálculos de los indicadores productivos y reproductivos se utilizarán procedimientos ya establecidos, los mismos que se basan en las fórmulas siguientes:

$$\text{CNV/Parto} = \frac{\text{Total de Crías Nacidas Vivas}}{\text{Total de Partos}}$$

$$\text{CD/Parto} = \frac{\text{Total de Crías Destetadas}}{\text{Total de partos}}$$

$$\text{Producto por Reproductora} = \frac{\text{Total de Animales Expedidos + Incorporados}}{\text{Reproductoras Instaladas}}$$

A continuación se describe el programa de Buenas Prácticas de Producción implementado en la Producción de animales experimentales.(49)

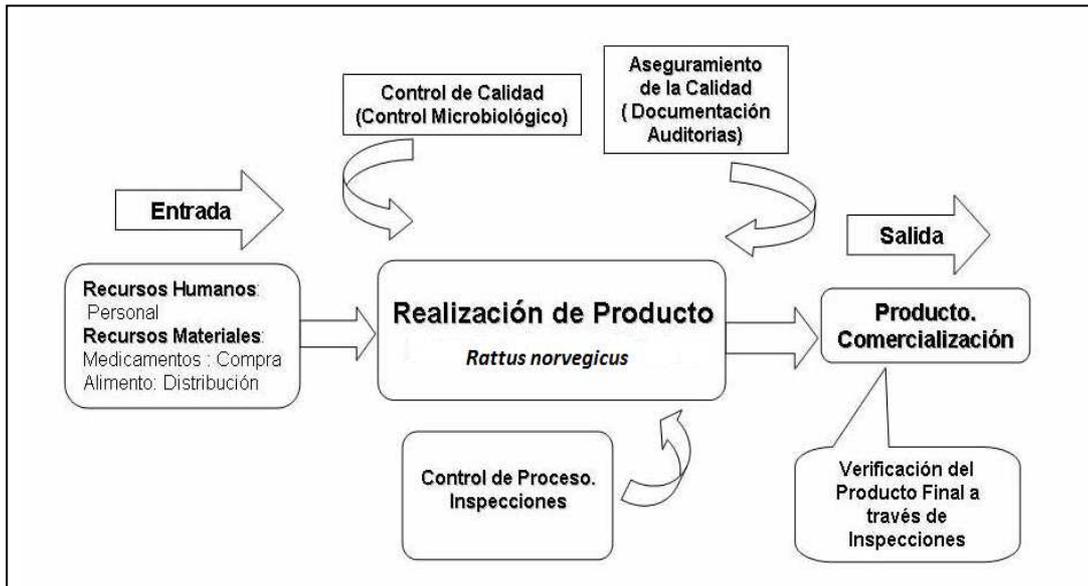


**FIGURA 1.** Sistema de Gestión de BPP implantado en la producción de animales experimentales.

La implementación de Buenas Prácticas de Producción (BPP) (FIGURA 1) ha sido perfeccionada pero siempre basada en garantizar los aspectos básicos establecidos por las regulaciones Nacionales e Internacionales establecidas para la cría de animales de experimentación. (49)

Los requisitos de la calidad se relacionan por lo general con la forma en que se va a realizar una actividad, mientras que los objetivos de la calidad son medidas de los resultados o logros del proceso. Esto permite el reconocimiento de toda organización como un conjunto de procesos y actividades. (49)

El proceso consiste en elementos de entrada, actividades o trabajo y elementos de salida o resultados. Para garantizar que todos los procesos funcionen como un sistema eficaz, la organización debe llevar a cabo un análisis de cómo se interrelacionan los procesos y a la vez reconocer que, por lo general, el elemento de salida de un proceso es el elemento de entrada para otro. (49)



**FIGURA 2.** Red de Procesos de Producción de Animales de Experimentación (*Rattus norvegicus*)

El sistema de Buenas Prácticas de Producción (FIGURA 2) nos encamina a la eficiencia y eficacia del sistema propuesto y además garantiza la seguridad y calidad del animal de experimentación.(49)

## 1.2. BIOTERIO



**FOTOGRAFÍA 1.** Animal de laboratorio

Un bioterio es un lugar compuesto generalmente de múltiples jaulas, donde se ingresa o se alojan animales que cuentan con una calidad genética y microbiológica definida para su estudio, previo etiquetado, fichado, etc.(39)

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.(39)

El bioterio es el lugar donde dichos animales (FOTOGRAFÍA 1) son reactivos biológicos generalmente utilizados en investigación o para producción.(39)

### **1.3. EL REACTIVO BIOLÓGICO**

El Animal de laboratorio es “cualquier especie animal que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos”.(30)

El reactivo biológico es un animal estandarizado, lo que significa que tiene una composición genético-sanitaria definida, son criados y mantenidos en ambientes controlados que cumplen con los requerimientos específicos para cada especie, los cuales garantizan, además el bienestar animal.(30)

El estado sanitario de los animales de laboratorio está determinado por un complejo multifactorial en el que interactúan: además de la biología del animal, y el perfil genético, las condiciones ambientales del alojamiento, así como las prácticas y manejo al que son sometidos estos animales y sus insumos.(30)

Es bien conocido que el estado sanitario de los animales interfiere en el resultado de las investigaciones y está ligado a la capacidad de respuesta. El uso de animales con un estado de salud deficiente conduce irreversiblemente a la obtención de resultados erróneos. En estos casos es necesario repetir las pruebas siendo esto, motivo de

aumento del costo de las mismas y además una irresponsabilidad desde el punto de vista ético y moral porque estamos trabajando con seres vivos.(20)

### **1.3.1. HISTORIA Y OBJETIVO DE LAS CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO Y LOS PROGRAMAS RELACIONADOS CON EL CUIDADO DE LOS ANIMALES**

Las ciencias del animal de laboratorio se relacionan con la información y los procedimientos científicos y técnicos aplicables al cuidado de los animales de laboratorio.(20)

Esto incluye la cría, la nutrición, la conducta, la salud, la producción y el manejo de animales de laboratorio. La medicina del animal de laboratorio, una especialidad veterinaria reconocida, versa sobre el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de las enfermedades de los animales de laboratorio.

El campo de las ciencias del animal de laboratorio ha existido como una especialidad reconocida desde los años cincuenta. En grupo de individuos dedicados, involucrados en el cuidado de animales de laboratorio durante esa época, promovió el desarrollo e intercambio de información sobre la cría y medicina del animal de laboratorio.(20)

### **1.3.2. EXPERIMENTACIÓN BASADA EN ANIMALES**

Por un lado, se define como una actividad que tiene como misión evidenciar o aclarar fenómenos biológicos sobre especies animales determinadas, pero también como todo acto experimental o científico que entrañe el estado de bienestar del animal que pueda causarle dolor, sufrimiento, angustia o agravio.

En el término “experimento” se incluye toda actuación que, de manera intencionada o casual, pueda dar lugar al nacimiento de un animal a su vez destinado a experimentación. Se entiende que un experimento comienza en el momento en que se inicia la preparación de un animal para su utilización y termina cuando ya no se va a hacer ninguna observación ulterior. Asimismo, se considera, experimento la utilización

de animales, aún cuando se eliminen el dolor, sufrimiento, la lesión o el estrés prolongados, mediante el empleo de anestesia, analgesia u otros métodos.(20)

El uso de animales en estudios científicos condujo al desarrollo de las ciencias del animal de laboratorio. Las observaciones de los animales del científico griego Aristóteles establecieron la base de la anatomía comparada y embriología. En el siglo II, el científico romano Galeno estableció los principios de la investigación experimental, convencido de que solo las afirmaciones basadas en la experimentación podían conducir al progreso científico. Durante el siguiente período, la Edad Media, ocurrieron pocos avances científicos. Sin embargo, durante el Renacimiento se desarrolló un renovado interés en los descubrimientos científicos. En el siglo XIX, particularmente la segunda mitad, se logró un número significativo de avances médicos.(20)

Estos incluyeron el primer uso de vacunas para prevenir la infección y el uso del éter como anestésico. Otros avances incluyen la aceptación por parte de los cirujanos de ciertas técnicas para prevenir la infección y una mayor comprensión de la biología y las causas de las enfermedades infecciosas.(20)

A comienzos del siglo XX, la investigación científica alcanzó niveles tecnológicos y de organización más altos. Los avances en la química, la radiología, la farmacología, la genética, la inmunología y otras ciencias básicas proporcionaron nuevas herramientas para el estudio de la ciencia.(20)

Estos avances aportaron nuevas aplicaciones para la evaluación de animales de laboratorio. La salud humana se benefició de la investigación basada en animales, lo que influyó sobre la opinión pública a favor del científico.

Los años 50 se caracterizaron por un resurgimiento de la conciencia humanitaria y anunciaron el comienzo de las ciencias del animal de laboratorio como un campo organizado. Esto ocurrió principalmente debido a un aumento del financiamiento gubernamental de la investigación médica, así como también una mayor preocupación pública por el tratamiento humanitario de los animales usados en la investigación.(20)

La significación de la utilización de animales de laboratorio como reactivos biológicos, en el ámbito de la investigación científica, viene dada por los beneficios derivados de su uso y por su importancia cuantitativa (número de animales utilizados).

El National Research Council (Estados Unidos, 1988) ha resumido la importancia que ha tenido para la humanidad el uso de animales destinados a experimentación.

Las tareas realizadas y los servicios prestados por los técnicos de animales de laboratorio son una parte extremadamente importante del esfuerzo de investigación. El trabajo del técnico ejerce un efecto directo sobre los datos experimentales.

Los técnicos deben estar conscientes de que los cambios en el ambiente o la manipulación de los animales de laboratorio pueden introducir variables en los proyectos de investigación. Estas variables pueden proveer información falsa al investigador y producir resultados experimentales incorrectos.(20)

La dotación de una instalación de investigación con técnicos bien entrenados ayuda a la misma a satisfacer estas normas reglamentarias. Muchas instalaciones donde se alojan animales ofrecen programas de educación continua. La instalación de investigación puede desarrollar su propio programa o estructurar un curso que gire alrededor de las pautas proporcionadas por organizaciones científicas tales como la Asociación Americana de las ciencias del Animal de Laboratorio. Los cursos estandarizados hacen énfasis en el cuidado, la producción, el mantenimiento, el saneamiento y el alojamiento humanitarios apropiados de los animales de laboratorio.(20)

#### **1.3.2.1. PRINCIPIOS BÁSICOS PARA EL MANEJO DE ANIMALES DE LABORATORIO**

La docencia e investigación biológica y 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 (Mrad y Cardozo, 1999).(11)(10)

El diseño de los experimentos que utilizan animales de laboratorio exige la definición detallada de las características genéticas y ambientales. Solo así, utilizando animales definidos y estandarizados se obtendrán resultados reproducibles.(20)(11)(36)

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.(20)(36)

Todo lo que suceda desde el nacimiento hasta la muerte del animal debe ser preocupación del investigador, pues a lo largo de este intervalo pueden introducirse variables que afecten adversamente los resultados experimentales.

En nuestro medio la Ciencia y la Tecnología de animales de laboratorio aún está en estado embrionario. 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. (20)(36)

Las investigaciones básicas y aplicadas y los trabajos de manufactura y control de medicamentos y vacunas que utilizan animales deberían ajustarse a las normas internacionales de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y de Laboratorio (BPL).(36)

Además, las revistas científicas internacionales exigen que los investigadores firmen un documento donde se garantice que las experiencias han sido efectuadas respetando las normas internacionales existentes, por ejemplo la Declaración Universal de los Derechos de los Animales (UNESCO, 1989) y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NRC, 1996). La firma de este documento significa aseverar que los trabajos han sido previamente autorizados por Comités de Ética Institucionales y que todo el personal que interviene en el trabajo en relación con los

animales de laboratorio, ha aprobado previamente un curso de capacitación en el tema.(36)(9)

### **1.3.2.2. PROTOCOLO PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES**

Se deben considerar los siguientes puntos para la elaboración y revisión de los protocolos para el cuidado y uso de los animales.

- Razón y objetivos propuestos para el uso de los animales.
- Justificación de la especie y número de animales requeridos. Siempre que sea posible, el número de animales que se requieren deberá justificarse estadísticamente.
- La disponibilidad o adecuación de la aplicación de procedimientos que causen el menor daño, otras especies, preparación de órganos aislados, cultivo de células o tejidos, o simulación computarizada (Alternativas).
- La calidad del entrenamiento y experiencia del personal involucrado en los procedimientos usados
- Requisitos de crianza, alojamiento y manejo no usuales.
- Anestesia, analgesia y sedación apropiados, (las escalas de dolor y daño pueden ayudar en el diseño y revisión de los protocolos).
- La duplicación innecesaria de experimentos.
- La realización de varias intervenciones quirúrgicas mayores, en el mismo animal.
- Criterios y mecanismos para la intervención oportuna, retiro de los animales del experimento o eutanasia, en caso de prever la ocurrencia de dolor o estrés grave.
- Cuidados después del procedimiento.
- Métodos de eutanasia y eliminación de los cadáveres.
- Ambiente laboral seguro para el personal.(36)

Ocasionalmente, los protocolos incluyen procedimientos que no han sido analizados previamente o que potencialmente pueden causar dolor o diestrés que no pueden ser controlados. Tales procedimientos pueden incluir inmovilización física, varias cirugías mayores con supervivencia, restricción de comida o líquidos, uso de adyuvantes, la muerte como punto final del experimento, uso de estímulos nocivos, pruebas de irritación corneal o cutánea, permisibilidad de carga tumoral excesiva, muestreo de

sangre por vía orbital o intracardiaca o el uso de condiciones medio ambientales anormales.(36)

Veterinarios, investigadores y otros expertos deben buscar en la literatura información relevante y objetiva acerca de los procedimientos, de los propósitos del estudio y del efecto sobre los animales. Si se sabe poco acerca del procedimiento en particular, puede ser apropiado un estudio piloto diseñado para constatar los efectos del procedimiento sobre los animales.(5)(36)

### **1.3.2.3. NORMAS ÉTICAS EN EL MANEJO DE ANIMALES**

Debemos hacer hincapié en las obligaciones que se tienen con los animales de experimentación dentro del laboratorio, mismas que han sido postuladas por las sociedades protectoras de animales como Normas Éticas para su manejo adecuado.(2)(11)(28)

- Tratarlos humanamente.
- Reducir al mínimo el dolor y la incomodidad.
- Evitar el sufrimiento innecesario.
- Manipularlos adecuadamente, firme pero con suavidad, para evitar desencadenar reacciones agresivas hacia el experimentador.
- Evitar su uso innecesario.(2)(11)(28)

#### **a. EL PRINCIPIO DE LAS 3 R'S COMO IMPERATIVO ÉTICO Y DE CALIDAD**

En 1959 William Russell y Rex Burch, en Inglaterra, en su famoso libro "The principles of humane animal experimental techniques", exponen por primera vez que la excelencia científica está fuertemente ligada al uso humanitario de los animales de laboratorio. Definen claramente las normas en las que se basan los principios éticos en la investigación con animales: las tres "Rs".(35)

## **b. REDUCIR, REEMPLAZAR Y REFINAR.**

Estos son los fundamentos para una racional e inteligente estrategia para **Reducir** el uso de animales y las causas de dolor y de diestrés, los proyectos de investigación que requieren el uso de animales de laboratorio deben ser realizados con el número mínimo necesario de animales que permitan obtener resultados científicamente válidos.(35)

El perfeccionamiento del diseño de los experimentos y la selección del modelo más adecuado, contribuyen al cumplimiento de este principio.

Los procedimientos in vivo deben ser **Reemplazados** siempre que sea posible por métodos alternativos que no usen animales vivos, como modelos matemáticos, simulación por computador, test serológicos, cultivos celulares y sistemas biológicos in vitro.(35)

El **Refinamiento** involucra fundamentalmente la estandarización según parámetros internacionales: definición genético-sanitaria y la calidad del ambiente donde son criados y mantenidos los animales antes y durante la experimentación.(35)

Incluye todos los procedimientos para minimizar y eliminar el dolor, así como todos los métodos de enriquecimiento para asegurar el bienestar animal.

Estos principios han sido adoptados para su aplicación a través de normas bioéticas, tales como la Declaración de la Asociación Médica Mundial sobre el Uso de Animales en la investigación Biomédica, adoptada por la 41ª Asamblea Médica Mundial celebrada en Hong Kong, en 1989; la Guía del Consejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Médicas para la investigación biomédica que involucre animales; las Guías para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos. (35)

### 1.3.3. GENÉTICA Y REPRODUCCIÓN

Es esencial una investigación de las características genéticas para seleccionar los animales, a fin de elegir los portadores de caracteres consistentes con los objetivos experimentales. Deben considerarse las diferencias conocidas entre especies, colonias o cepas que incluyen: expectativa de vida, anatomía, tamaño corporal, sistemas fisiológicos y metabólicos, requerimientos nutricionales, susceptibilidad a enfermedades, características comportamentales, susceptibilidad a xenobióticos, etc. Es muy importante conocer la historia genética completa de los animales antes de comenzar a trabajar.(11)(13)

#### 1.3.3.1. TIPOS GENÉTICOS

Con relación a tipos genéticos los animales se clasifican en Colonias Exocriadas (*outbred stocks*), Cepas Endocriadas (*inbred strains*); los Híbridos, las Colonias Parcialmente Endocriadas, las Cepas Endocriadas Apareadas al Azar, las Cepas Endocriadas Recombinantes, las Cepas Congénicas y las Cepas Coisogénicas.(11)(13)

##### a. COLONIAS EXOCRIADAS

Son colonias mantenidas de tal 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 forma de dar menos del 1% de endocría por generación. El logro de este objetivo dependerá del tamaño de la colonia, del método de elección de los próximos reproductores y del método de cruzamiento que se elija.(11)(13)

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

- **10 – 25 machos reproductores por generación.** Se recomienda:  
Sistemas que maximizan evitar la endocría.

- **26 – 100 Machos reproductores por generación.** Se recomienda:  
Sistemas que maximizan evitar la endocría.  
Sistemas de cruzamiento rotatorio.
  
- **Más de 100 Machos reproductores por generación.** Se recomiendan:  
Sistemas de cruzamiento rotatorio.  
Cruzamiento al azar.(11)(13)

### **Sistemas que maximizan evitar la Endocría**

Están basados en que cada macho reproductor contribuye un macho y cada hembra reproductora contribuye una hembra para la próxima generación de reproductores, estos nuevos reproductores se aparean de forma de evitar el cruzamiento de familiares cercanos.(11)(13)

### **Sistemas de Cruzamiento Rotatorio**

El 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. Esquemas convenientes fueron descritos por Poiley en 1960.(11)(13)

### **Cruzamiento al Azar**

El núcleo de reproducción para la próxima generación se elige al azar de 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 ocasionará un nivel alto de endocría cuando la colonia es de tamaño considerable.  
(11)(13)

## **b. CEPAS ENDOCRIADAS**

Son obtenidas a partir de una pareja única por continuo cruzamiento entre hermanos o entre padres e hijos.

Después de 30 o más generaciones con este método se obtiene un coeficiente de endocría (probabilidad de que dos genes de cualquier locus sean idénticos) del 98,6%. Este es el mínimo nivel aceptado internacionalmente para que una cepa sea designada endocriada. Estas cepas deben ser mantenidas por continuo apareamiento del mismo tipo.(11)(13)

En general la endocría disminuye el rendimiento reproductivo y tiende a disminuir la expectativa de vida.

El proceso de endocría, con frecuencia, pone al descubierto anomalías genéticas que están encubiertas en las colonias exocriadas.(11)(13)

## **c. HÍBRIDOS**

Existen dos tipos, el F1 y el F2. El F1 resulta del cruzamiento de dos cepas endocriadas. Todos los animales 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 tiene 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)(13)

## **d. COLONIAS PARCIALMENTE ENDOCRIADAS**

Son colonias en las cuales el cruzamiento entre hermanos no ha alcanzado aún 20 generaciones.

**e. CEPAS ENDOCRIADAS APAREADAS AL AZAR**

Son 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").(11)(13)

**f. CEPAS ENDOCRIADAS RECOMBINANTES**

Estas cepas son producidas a partir de dos cepas endocriadas progenitoras 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 azarística en las cepas endocriadas recombinantes obtenidas.(11)(13)

**Mutantes**

Son 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.(11)(13)

**g. CEPAS CONGÉNICAS**

Son cepas producidas por retrocruzamiento (backcrossing). Esto significa 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 – 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 congénica.(11)(13)

#### **h. CEPAS COISOGÉNICAS**

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

#### **i. 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 período 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 períodos se puede recurrir a las técnicas de preservación de embriones por congelamiento a muy bajas temperaturas.(11)(13)

### **1.3.3.2. MÉTODOS DE APAREAMIENTO**

El sistema elegido dependerá de los hábitos de la especie y del tipo de cría requerida.

#### **a. PARES MONOGÁMICOS**

Consiste en albergar juntos una hembra y un macho en forma permanente. Este método facilita el sistema de registros. También permite aprovechar el estro postparto cuando éste ocurre. Es un método más costoso en espacio, trabajo y materiales.(11)(13)

## **b. 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**

Donde el grupo se mantiene junto durante su vida reproductiva y se aprovecha el estro postparto pero se dificultan registros detallados y hay riesgo de sobrepoblación.(11)(13)

### **Retiro de la Jaula**

Donde las hembras grávidas son retiradas a cajas separadas en el último período de gestación, para facilitar los registros. Se evita la sobrepoblación pero se pierde la posibilidad de aprovechar el estro postparto.(11)(13)

## **1.3.3.3. CONTROL GENÉTICO**

A fin de garantizar la autenticidad de las cepas o colonias utilizadas en la investigación o trabajo biológico, la crianza de Animales de laboratorio debe ser sometidas a un control genético programado. Esto es de la mayor relevancia para el monitoreo de líneas consanguíneas. La finalidad es descubrir, en forma temprana, la aparición de mutaciones o errores en la elección de los reproductores. Como los ensayos genéticos son efectuados sobre una muestra pequeña de los individuos y locus, sus resultados tienen valor relativo y deben utilizarse varios métodos en forma complementaria.

Los principales métodos utilizados consisten en:

- a. Injertos de Piel.
- b. Identificación de genes de pigmentación.
- c. Análisis de polimorfismo bioquímico.
- d. Morfología esquelética.
- e. Análisis de histocompatibilidad.
- f. Análisis de DNA genómico.

La observación de variaciones en: la prolificidad, la agresividad, las particularidades patológicas y/o fisiológicas y la respuesta a drogas, pueden también alertar sobre posibles contaminaciones genéticas.(11)(13)

#### **1.3.3.4. BANCO DE EMBRIONES**

En la actualidad existen numerosas cepas endocriadas, congénicas y mutantes como también numerosas colonias exocriadas. Solamente el Índice Internacional de Animales de Laboratorio tiene más de 4500 entradas, correspondiendo la mayoría a ratones y en segundo lugar a ratas.

Sería totalmente imposible mantener un número muy elevado de cepas y colonias en constante reproducción debido al costo, espacio y trabajo requeridos. Además existe riesgo de la aparición de mutaciones y de contaminación con agentes patógenos. Por esos motivos muchas de estas cepas están siendo mantenidas en banco de embriones, congelados en nitrógeno líquido, en estado de preimplantación. Estos son descongelados y transferidos a madres adoptivas cuando las necesidades de las investigaciones lo requieren.(11)(13)

#### **1.3.3.5. ELECCIÓN DEL MODELO GENÉTICO**

Algunas propiedades como: isogenicidad, homocigosis, estabilidad genética a largo término, identificabilidad, uniformidad fenotípica, individualidad, posibilidad de distribución internacional y existencia de un banco de datos; difieren en magnitud en los diferentes tipos genéticos y esto debe ser considerado al realizarse la decisión de usar un determinado modelo.

La elección dependerá del tipo de trabajo que se desee realizar, de las características de las cepas y colonias, de la información disponible en trabajos publicados y de la disponibilidad local. Cuando no se tiene suficiente información, deben realizarse estudios pilotos en varios modelos para determinar el más conveniente. Siempre debe tenerse en cuenta el desempeño reproductivo, pues esto puede llegar a ser un factor limitante para la realización de los trabajos definitivos.(11)(13)

Cuando la característica importante no es fuertemente hereditaria, podrán usarse colonias exocriadas que, generalmente, tienen un potencial reproductivo alto. No es lógico usar las colonias exocriadas con el criterio de que ellas representan mejor a la totalidad de la especie. Para este objetivo es mejor utilizar un espectro de diferentes cepas endocriadas y de híbridos F1.

Clásicamente se pensaba que cuando el experimento requiere un modelo animal como intención de extrapolar los resultados al hombre (ejemplo: para el estudio de una enfermedad humana) la utilización de animales criados al azar sería más adecuada por asemejarse más al tipo de reproducción de los humanos. Esto ha sido cuestionado últimamente con variados argumentos por varios autores, que proponen el uso de varias cepas isogénicas en diseños factoriales.(11)(13)

Cuando el carácter requerido es altamente hereditario es preferible utilizar una cepa endocriada conveniente. Las cepas congénicas si muy útiles para estudiar los efectos de un gen mutante simple, puesto que la cepa endocriada no portadora de ese gen provee el animal control ideal.

Cuando los animales son utilizados es como reactivos para valoraciones biológicas debe tenerse en cuenta el índice de precisión lambda (cociente entre la desviación estándar y la pendiente) característico de la especie, colonia o cepa. Este determinará el número de respuestas necesarias para los límites de confianza requeridos. El mejor modelo será el que proporcione el valor más bajo para lambda a igualdad de precio por unidad.(11)(13)

La literatura internacional presenta numeroso ejemplos del impacto de la genética de los animales de laboratorio sobre los resultados experimentales.

#### **1.3.3.6. NOMENCLATURA**

Como ya se dijo antes, la validez, interpretabilidad y reproducción de los resultados dependen de la exacta identificación del modelo animal utilizando una nomenclatura adecuada. En los trabajos publicados existe una gran omisión a este respecto, la que se manifiesta más marcadamente al describir colonias exocriadas. Muchos

investigadores siguen usando los nombres originales (por ejemplo ratones suizos o ratas wistar), a pesar de que en la actualidad los criadores tienen nombres más diferenciados para una identificación más exacta.

Debido a los diferentes sistemas de creación y al número limitado de parejas trasladadas, las colonias derivadas de una misma colonia original pueden ser genéticamente diferentes y por lo tanto deben tener diferente denominación. Si esto no es tenido en cuenta, las diferencias genéticas pueden ocasionar variables inexplicables en los resultados experimentales.(11)(13)

Existen normas internacionales para nomenclatura de colonias exocriadas y de cepas endocriadas y congénicas. Estas reglas son para ratas y ratones pero se recomienda que un sistema de nomenclatura similar sea usado para hamsters, cobayos y otros roedores. Cuando no se pueda obtener animales estandarizados de origen específico puede resultar imposible aplicar las guías publicadas de nomenclatura. En tales casos los animales deben ser identificados por clasificación taxonómica y fuente de origen. El comité internacional de Nomenclatura Genética para Ratones también desarrolló extensas reglas para nomenclatura de genes, anomalías cromosomales y cepas endocriadas.

El objetivo del sistema de nomenclatura es dar la mayor cantidad de información relevante posible.(11)(13)

#### **1.3.4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas.(35)

Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos hasta la fecha son insustituibles.(32)

Existen algunas definiciones de animal de laboratorio, entre las que citaremos:

1. **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".(32)

2. **Según Nombra (1987), Instituto Central de Animales de Laboratorio en Kawasaki (Japón)(32)**

"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 y

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**

#### **1.3.4.1. MODELOS ANIMALES**

Cuando estamos planteando un experimento y seleccionamos la metodología experimental, el equipamiento y los materiales, debemos tomar decisiones importantes.

Los proyectos de investigación médica y biológica generalmente emplean por lo menos una de las siguientes categorías:

- a) Voluntarios humanos.
- b) Animales de experimentación.
- c) Embriones, órganos, tejidos o células de origen vegetal, animal o humano.
- d) Bacterias, hongos y protozoos.
- e) Modelos inanimados tales como programas de computación o productos químicos o físicos.(20)

El material experimental a utilizar debería ser elegido con el objetivo de resolver el caso en estudio del modo más simple posible. Además de las consideraciones científicas, existen también problemas legales y éticos que deben tenerse en cuenta cuando se lleva a cabo la selección del material a ser utilizado.(20)

#### **1.3.4.1.1. USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Los animales de experimentación son utilizados en investigación con fines médicos como:

- **Proveedores de productos biológicos**, tales como hormonas o anticuerpos. Ej: producción de anticuerpos poli o monoclonales que se utilizan con fines científicos y también terapéuticos o diagnósticos.(20)
- **Modelos para el estudio de respuestas biológicas**, en este caso se emplean parámetros fisiológicos, fisiopatológicos o comportamentales para estudiar la respuesta del animal luego de la administración de compuestos o estímulos. Ej: monitoreo del efecto farmacológico o tóxico de determinados compuestos, para establecer la eficacia y seguridad de vacunas, etc. En este caso, los animales empleados sirven como un dispositivo de medición o un instrumento biológico. La utilización de animales definidos con un entorno (macro y microambiente) controlado es de vital importancia.(20)
- **Instrumentos para el estudio de procesos biológicos**, en esta área de estudio se trata de investigar aspectos de la fisiología, fisiopatología, la etiología del animal. Ej: crecimiento y desarrollo de órganos, procesos inmunológicos, desarrollo de tumores, desórdenes metabólicos, etc.(20)

Los animales de laboratorio también son utilizados para llevar a cabo investigaciones tendientes a mejorar el cuidado, salud y calidad de los mismos y de su medio ambiente. En muchos experimentos, el animal empleado sirve como un sustituto del ser humano y nos referimos a él como modelo animal.

Podemos definir **modelo animal** como un modelo en el cual se puede estudiar la biología o el comportamiento, investigar un proceso patológico espontáneo o inducido y en el cual el fenómeno refleje (por lo menos en un aspecto) el mismo fenómeno en el ser humano o en otras especies animales.(20)

Esta definición incluye el uso de animales como modelos para estudios de biología o comportamiento, pero la mayor parte de los modelos animales son desarrollados y utilizados para estudiar la etiología y la posible cura de enfermedades humanas.

No existen reglas acerca de la elección de un modelo animal apropiado ni para la extrapolación de los resultados obtenidos con un modelo a otra especie animal o al ser humano. Los modelos animales utilizados en el estudio de enfermedades humanas pueden ser divididos en 4 grupos:

- a) Modelos inducidos.
- b) Modelos espontáneos.
- c) Modelos negativos.
- d) Modelos huérfanos.(20)

#### **a. MODELOS ANIMALES INDUCIDOS**

Se refiere a aquellos animales en los cuales la enfermedad o desorden es producido experimentalmente, ya sea mediante **métodos quirúrgicos** (modelo de isquemia cerebral por ligadura de la arteria carótida), **químico-farmacológicos** (modelo de diabetes por administración de estreptozotocina), **infecciosos** (infección con virus junin, siendo el cobayo especialmente sensible), **inmunológicos** (modelo de shock anafiláctico experimental en el cobayo), **genéticos** (ratones knock out, es decir carentes, para un determinado gen) o **físicos** (modelo de inflamación: eritema por radiación UV en el cobayo), con la finalidad de obtener un correlativo entre los síntomas y/o la etiología inducida experimentalmente con aquellos esperados u observados en las especies blanco de esa patología.(20)

Los animales transgénicos constituyen un nuevo grupo dentro de los modelos animales inducidos. Existen numerosas técnicas posibles, para producir animales

transgénicos, siendo una de las más utilizadas la inyección directa de un fragmento de DNA clonado en uno de los pronúcleos (en general el masculino). Los ratones son los animales preferidos para investigar en este campo, si bien otras especies como por ejemplo los peces, están siendo utilizados en la dilucidación de la regulación y expresión de los genes.(20)

También cabe mencionar a las quimeras, quienes han sido de gran importancia para estudiar la cooperación celular durante el desarrollo embrionario.

Las quimeras se obtienen por fusión de las células provenientes de dos embriones diferentes, la fusión se puede llevar a cabo en el estadio de 2, 4 u 8 células o simplemente introduciendo 2 o 4 células provenientes de la masa celular interna de un blastocito en otro. Se pueden obtener embriones quiméricos provenientes de la fusión de células de un embrión normal con aquellas pertenecientes a un embrión "anormal", con una composición cromosómica diferente de la normal ( $2n+1$ ;  $2n-1$ ;  $2n$ , etc), o incluso mediante fusión con un oocito no fecundado.(20)

## **b. MODELOS ANIMALES ESPONTÁNEOS**

Son aquellos que exhiben variantes espontáneas (mutaciones). Actualmente existen cientos de cepas que han sido analizadas y categorizadas. Ej: modelo espontáneo de aterosclerosis en conejo o paloma, el ratón NOD (non obese diabetic mice), modelo de diabetes tipo I.

Los modelos espontáneos pueden ser obtenidos a partir de cepas endocriadas (genéticamente uniformes) o a partir de poblaciones cruzadas al azar (heterogéneas), donde un alto porcentaje de los animales se encuentren afectados por la enfermedad.(20)

## **c. MODELOS NEGATIVOS**

Son especies, líneas o cepas que no desarrollan una determinada enfermedad. Este término podría ser asignado a un modelo insensible a un determinado estímulo que

usualmente tiene efecto sobre otras especies o líneas. Los mecanismos involucrados en la insensibilidad pueden ser estudiados con el objetivo de proveer un mayor conocimiento en esta área de investigación.

Ej: en el caso del desarrollo de la diabetes tipo I el ratón mediante dosis consecutivas subdiabetogénicas de estreptozotocina, se observa que la cepa C57BL/Ks posee una mayor susceptibilidad a desarrollar esta patología de la C57BL/6, pese a ser cepas coisogénicas (solamente difieren en un gen).(20)

#### **d. MODELOS DE ANIMALES HUÉRFANOS**

Se refiere a modelos donde se reconoce y estudia una enfermedad, pensando que en el futuro se podría identificar una contraparte humana.

Ej: el virus del papiloma en tumores epiteliales malignos y el virus de la enfermedad de Mareks como un agente linfoproliferativo.(20)

#### **1.3.4.2. SELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL**

La selección del modelo animal requiere un planteamiento cuidadoso. Antes de comenzar, se debe tener en claro cual es el problema a investigar (podemos plantearlo como una pregunta, una hipótesis o un objetivo), ya que esto determinará la elección del modelo animal. Solamente cuando la pregunta clave ha sido definida será posible determinar qué sustrato clave será conveniente utilizar para proveer la respuesta, Ej: un tipo particular de célula o tejido, un órgano o la interacción entre órganos.(20)

A continuación se deberá definir el sustrato clave, es posible buscar entre las especies o cepas que posean la característica requerida. El siguiente paso será determinar de qué modo será examinado el sustrato clave. Ej: se analizará como un órgano "in vitro" o el animal vivo e intacto podría ser utilizado como un portador del sustrato clave.

Esto último permitiría llevar a cabo estudios de más larga duración y estudiar interacciones entre órganos.

Los pasos a seguir en la selección de un modelo animal pueden ser resumidos de la siguiente manera:

- a) Definir la cuestión clave;
- b) Elegir el sustrato clave;
- c) Determinar en qué especie o cepa se encuentra ese sustrato;
- d) Establecer cuáles de las especies mencionadas en el punto anterior son las más ventajosas desde el punto de vista técnico.
- e) Establecer cuáles son los factores prácticos decisivos Ej: asequebilidad, equipamiento, información publicada, experiencia, costo.
- f) Seleccionar el modelo animal en base a consideraciones científicas, prácticas y éticas.(20)

Buscar en la bibliografía, indicará qué especies son utilizadas en el tópico de nuestro interés, pero a menudo éstas especies son utilizadas más por una cuestión de hábito que por el hecho de haber sido elegidas en base a estudios comparativos.

Para el estudio de enfermedades específicas, la literatura disponible puede informarnos de la existencia de modelos espontáneos y/o inducidos.

Cuando el modelo animal adecuado no se encuentre disponible, habrá que considerar el desarrollarlo.(20)

#### **1.3.4.3. SELECCIÓN DE LOS ANIMALES**

El problema de la selección de los animales se presentará desde el inicio por problemas imperativos, económicos.

Se utilizarán principalmente mamíferos. El ratón, la rata, el hámster, el cobayo, el conejo, el gato, el perro.(20)

#### 1.3.4.4. LA RATA

La especie comúnmente utilizada es el *Rattus norvegicus*. La primera rata blanca fue desarrollada por el laboratorio Wistar de USA.(15)(20)

Hoy, hay varias cepas endogámicas y estirpes exogámicas, aunque las ratas exogámicas se usan más comúnmente en los laboratorios. En los estudios relacionados con la nutrición y conducta a menudo se emplean ratas como modelos animales.(15)(20)

Al igual que los ratones, las ratas pueden desarrollar enfermedades que ocurren naturalmente, tales como diabetes y la hipertensión, lo que los hace valiosos en el estudio de las mismas enfermedades en los humanos.(15)(20)

##### 1.3.4.4.1. ESTIRPES EXOGÁMICAS DE RATAS

Comúnmente se usan en la investigación tres estirpes exogámicas de ratas de laboratorio:

- a) **Wistar (WD)**. Esta rata albina fue desarrollada en el Instituto Wistar de Filadelfia. Tiene una cabeza relativamente ancha y orejas largas. La cola es usualmente más corta que el cuerpo.
- b) **Sprague – Dawley (SD)**. Originalmente producida por Sprague – Dawley Farms de madison, Wisconsin, esta rata albina crece más rápidamente que la rata Wistar. Tiene una cabeza más larga y estrecha y su cola tiene aproximadamente la misma longitud que su cuerpo.
- c) **Long – Evans (LE)**. Esta rata es más pequeña que la rata Wistar o Sprague – Dawley. Su pelaje blanco está usualmente entremezclado con parches negros y su cabeza es por lo general negra. Debido a su “capucha” negra, este animal se conoce a veces como la rata encapuchada.(15)(20)

**1.3.4.4.2. Rata (*Rattus norvegicus*)**



**FOTOGRAFÍA 2. *Rattus norvegicus***

**a. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:**

**Superreino:** Eucariota

**Reino:** Animalia

**Subreino:** Eumetazoa

**Superphylum:** Deuterostomia

**Phylum:** Chordata

**Subphylum:** Vertebrata

**Infraphylum:** Gnathostomata

**Superclase:** Tetrapoda

**Clase:** Mammalia

**Subclase:** Theria

**Infraclase:** Placentalia

**Orden:** Rodentia

**Suborden:** Myomorpha

**Superfamilia:** Muroidea

**Familia:** Muridae

**Subfamilia:** Murinae

**Género:** *Rattus*

**Especie:** *norvegicus*

**Nombre binomial:** *Rattus norvegicus*

**Subspecies:** *R. n. albinicus* - *R. n. albus* - *R. n. norvegicus*(37)

**La rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*) (FOTOGRAFÍA 2) es el segundo mamífero, después del ratón de laboratorio (*Mus musculus*) más usado como modelo en la investigación biomédica.(37)**

No tiene buena vista ni la capacidad de distinguir colores, pero posee un gran olfato y oído. Es activo en la noche y duerme y descansa en el día. Para su alimentación y defensa cuenta con dos filosos incisivos superiores y dos inferiores que crecen durante toda su vida.(37)

No puede vomitar, ya que se lo impide un pequeño pliegue en el esófago. Carece de vesícula biliar; el pulmón derecho presenta cuatro lóbulos, mientras que el izquierdo sólo uno. Tiene cinco pares de glándulas mamarias y unas pequeñas glándulas lagrimales en la parte posterior del globo ocular cuya secreción es rica en lípidos y porfirinas y que durante los periodos de estrés y/o ciertas enfermedades tiñen de rojo los párpados y la nariz dando la impresión, cuando seca, de sangre coagulada.(37)

Su principal órgano regulador de la temperatura es la cola, además de salivar profusamente mojándose el cuello y el pecho. No hiberna, y puede vivir más de tres años. Los machos llegan a pesar más de quinientos gramos.

La rata tiene aproximadamente cien años de haber sido domesticada, lo cual es relativamente poco tiempo si la comparamos con otras especies animales. Sin embargo, ha acompañado al hombre en sus desplazamientos desde la época de las cavernas. (37)

La domesticación es una forma de evolución. En el caso de la rata de laboratorio, los cambios ocurren en el tamaño y el color así como en su comportamiento, por ejemplo en la disminución de la agresividad. A diferencia de lo que sucede en la vida silvestre, donde los individuos más agresivos y territoriales son los que copulan con las hembras, en la rata de laboratorio se busca seleccionar a los individuos menos agresivos para su reproducción, aun así, conserva cierta agresividad que puede variar de una cepa a otra.

Otros instintos se mantienen prácticamente inalterados: siguen siendo animales de hábitos nocturnos; si se les permite, construyen madrigueras y son grandes exploradores (curiosos y destructivos); ocultan sus heridas o enfermedades.(37)

La rata de laboratorio, también llamada rata noruega, pasó de ser una alimaña inspiradora de cuentos (The Pied Piper of Hamelin escrito por Robert Browning en 1888) y causante indirecta de pestes que azolaron a la humanidad durante siglos (recordemos la peste bubónica que mató a un tercio de la población londinense durante los años de 1664 a 1665) a ser el segundo mamífero que más ha contribuido al desarrollo de la ciencia. **Para muchos es el modelo biológico ideal.**(37)

#### b. HISTORIA DE SU DOMESTICACIÓN



FOTOGRAFÍA 3. *Rattus norvegicus*

Su inicio como modelo animal en la *Historia de la Ciencia Moderna* (ya antes había participado en estudios principalmente nutricionales, no reportados) fue el trabajo hecho por **Philippeaux en Francia en 1856**, en el que se describe el Efecto de la Adrenalectomía en Rata Albino.(37)

La rata noruega albino (FOTOGRAFÍA 3) fue el primer mamífero en ser domesticado con propósitos científicos. **Es originaria del este de Asia. Llegó a Europa y a América a principios del Siglo XVIII**, a través del comercio mercante marítimo. Se distribuyó en toda Europa procedente de la Península Nórdica (de ahí su nombre).(37)

**En Europa y América por ese entonces habitaba otra rata, la rata negra (*Rattus rattus*), la cual fue rápidamente desplazada de sus nichos por la rata invasora, de mayor tamaño y agresividad. Para “desventura” de la rata negra, no hizo “alianzas” con la noruega por resultar en cruas estériles, así es que la *Rattus rattus* a partir de entonces fue marginada y cedió su lugar en la historia de la ciencia a la *Rattus norvegicus*.(37)**

**Durante los siglos XVIII Y XIX** fueron muy populares las peleas entre perros y ratas en recintos clandestinos. Se cruzaban apuestas sobre cuántas ratas podía matar un perro en determinado tiempo. Charles Dickens en su conocida novela *Oliver Twist* nos hace referencia a uno de estos episodios.

Se hizo necesario atrapar y criar una gran cantidad de ratas que eran requeridas en estas contiendas. **Cuando los “cazadores de ratas” atrapaban alguna albino la separaban del resto, la reproducían y la hacían su mascota.** Fue así como se inició la domesticación de la rata noruega albino. Los investigadores biomédicos que por entonces usaban ratas para sus trabajos prefirieron usar las albinas, atraídos principalmente por su docilidad.(37)

**A finales del siglo XIX se creó en el Instituto Wistar**, llamado así en honor de Caspar Wistar (1761-1818), un médico dedicado al estudio de la anatomía y poseedor de una colección de modelos anatómicos.

Este instituto que ocupa un lugar especial en la historia de las ciencias biomédicas, es **considerado la cuna de la rata de laboratorio.**

**H. Donaldson (1857-1938)** fue el fundador de la colonia de ratas que más tarde se llamaría Wistar. **En 1979, J.R. Lindsey** reconocía 25 cepas descendientes directas de la rata Wistar y 10 como resultado de cruas con otras cepas, como la Sprague-Dawley y la Long-Evans, ambas resultantes de cruas entre hembras Wistar y machos silvestres.(37)

### c. INFORMACIÓN GENERAL

La rata de laboratorio presenta un pelaje áspero y grueso con prominentes orejas desnudas y cola prácticamente desnuda, que generalmente es más corta que el cuerpo y cabeza. (48)

El color es blanco. Las hembras tienen 12 mamas. Al igual que el resto de los roedores, posee cuatro incisivos, dos superiores y dos inferiores, carece de caninos y premolares anteriores lo que ocasiona que haya un diastema. Sus incisivos crecen durante toda su vida a partir de la base, que va sustituyendo la porción desgastada por la actividad de cortar y roer materiales duros. La parte exterior del diente es más dura y carece de nervio, salvo en la base (Nowak, 1991).(48)

d. **FÓRMULA DENTAL:** I (1/1), C (0,0), P (0/0), M (3/3) (Redford y Eisenberg, 1992).

### e. MEDIDAS

Longitud total: 80 a 480 mm. (Nowak, 1991; Redford y Eisenberg, 1992; Ballenger, 2001).

Longitud de la cola: 187 mm. en promedio (Ballenger, 2001); 153 a 218 mm (Redford y Eisenberg, 1992).

Longitud de la pata trasera: 37 a 44 mm. en promedio (Redford y Eisenberg, 1992).

Peso: 200 a 500 g (Nowak, 1991; Bertram y Nagorsen, 1995).(48)

### f. HÁBITOS

**Nocturnos**, en general puede guarecerse en sitios como hoyos, debajo de rocas, en troncos o en pilas de basura y desperdicios. Esta especie es particularmente terrestre y de acuerdo a Redford y Eisenberg (1992) es una activa cavadora de túneles. Sus túneles están formados por varias ramificaciones con una o varias salidas y cámaras de descanso y almacén de alimentos. En las construcciones generalmente ocupa sótanos, áticos y pisos bajos, lo mismo que coladeras y basureros. Es una excelente

nadadora y buceadora. Se ha calculado en promedio un ámbito hogareño de 25 a 150 metros de diámetro. Sin embargo, se ha observado el movimiento de individuos desde su madriguera hasta 3 kilómetros en una sola noche (Nowak, 1991).(48)

#### **g. SOCIALIZACIÓN**

Presentan un sistema social en el que los machos establecen territorios individuales alrededor de los túneles y en los que habitan varias hembras, las cuales crían en conjunto y alejan a las ratas ajenas al grupo. Las hembras sólo se aparean con el macho poseedor del territorio. En estos territorios, se da una reproducción eficiente y se mantienen nidos en buenas condiciones por sus miembros.

Mientras tanto, los machos no dominantes, no establecen territorios y se genera una situación promiscua con bajas tasas reproductivas y de mantenimiento de los nidos. Poseen un sistema de comunicación vocal compuesto por silbidos y gritos sobre todo usados en encuentros violentos. Se han reportado múltiples ataques a personas.(48)

En relación a su densidad, se calculó con base a la población presente en los EUA (100 a 175 millones) de 25 a 150 individuos/cuadra y de 50 a 300 individuos/granja. Aparentemente como en otras especies del género, sus densidades son cíclicas aumentando drásticamente en ciertos momentos, durante los cuales son posibles movimientos masivos a otras áreas (Nowak, 1991).(48)

#### **h. RESIDENTE / MIGRATORIO**

Residente.

#### **i. PRESENCIA DE DIMORFISMO**

No presentan un dimorfismo sexual marcado (Nowak, 1991).

#### **j. CICLO REPRODUCTIVO**

Puede ser a lo largo de todo el año, aunque se han reportado picos en primavera y otoño; las hembras son poliéstricas y pueden tener entre 1 y 12 camadas al año; presentan estro posparto. Las hembras son receptivas por un período de 20 horas, cada 4 a 6 días (Nowak, 1991).(48)

**k. TIEMPO DE GESTACIÓN:** De 21 a 26 días (Nowak, 1991).

#### **l. TAMAÑO DE LA CAMADA**

Desde 2 hasta 22 crías; promedio 8 a 9. Las crías nacen ciegas y desnudas, pero pueden ver y están completamente cubiertas de pelo a los 15 días, dejando el nido a los 22 días, aproximadamente (Nowak, 1991).(48)

**m. MADUREZ SEXUAL:** Entre 2 y 3 meses (Nowak, 1991).

#### **n. HÁBITOS ALIMENTICIOS**

*Omnívora*, comiendo desde materia vegetal, hasta animal y en particular semillas, granos, nueces, vegetales y frutas, su alimento base son las semillas (70%) con un complemento de alimento fresco (20%), de preferencia alimentos que contengan vitamina E como el Aguacate más un complemento de proteínas de origen animal (10%), aunque también comen insectos y otros invertebrados. Esta especie come todo lo que el ser humano y más, incluyendo papel, cera de abejas, jabón, etc. La comida comúnmente es llevada para almacenar a sus guaridas. En particular prefiere alimentarse de productos animales, tales como pájaros y huevos, y es excelente cazadora de peces.(48)

También se pueden alimentar de ratones, pollos y crías de cerdos y borregos, atacando en ocasiones animales mayores. La principal limitante es la presencia de agua. (Nowak, 1991).(48)

#### **o. LONGEVIDAD**

Hasta 3 años (Nowak, 1991).

#### **p. INTERACCIONES**

Las ratas noruegas, aunque se alimentan preferentemente de granos, nueces, vegetales y frutas, son importantes depredadores de animales nativos como pequeños mamíferos, aves, huevos, reptiles y anfibios. También son herbívoros de hojas, ramas y raíces de algunas plantas. Esta especie es un competidor potencial con otras especies de roedores y es un portador y transmisor de múltiples enfermedades y parásitos que afectan a especies de fauna nativa e incluso al ser humano.

Adicionalmente, representan una presa importante de numerosas especies de depredadores nativos como mustélidos, cánidos, felinos, aves rapaces, entre otros.(48)

La introducción de ratas (*Rattus* spp.) en varias islas oceánicas ha permitido el crecimiento de gatos domésticos, depredadores exóticos oportunistas cuyas poblaciones pueden crecer y establecerse ante la presencia de una presa abundante, incluso durante períodos en que la abundancia de las especies nativas es menor y con ello impactar más fuertemente a las especies nativas de aves, reptiles o invertebrados de las que también se alimentan (Atkinson 1985, Courchamp, Langlais y Sugihara, 1999 y 2000).

Estas especies de presas exóticas presentan características poblacionales y conductuales que les permiten soportar altos niveles de depredación por lo que sus poblaciones siguen siendo viables (Courchamp, Langlais y Sugihara, 1999 y 2000). Otro tipo de interacción que pueden tener las ratas introducidas es el de

desplazamiento o extinción de especies por competencia, ejemplificado por la desaparición de la tuatara (*Sphenodon punctatus*) por otra especie de rata introducida (*Rattus exulans*) en varias islas de Nueva Zelanda (Macdonald y Thom, 2001).(48)

#### **q. ORIGEN**

La rata noruega proviene del viejo mundo (Concretamente de China), llegaron consigo a través de embarcaciones en la edad media en donde venían alimentos y los alimentos atrajeron a las ratas consigo a los barcos y de ahí a Europa y luego se volvieron prácticamente cosmopólitos dada su gran inteligencia, capacidad reproductora y adaptación.(48)

#### **r. CRIANZA**

Las ratas se caracterizan por ser muy prolíficas como gran parte de los roedores, las hembras son aptas para reproducirse a los 2 meses de edad, con una gestación de unos 18-20 días y con un número de crías que va de los 8-12 retoños (una curiosidad es la presencia de himen en las hembras que se rompe en el primer coito).

Se recomienda separar el macho luego de la cópula y dejar a la hembra sola en un lugar adecuado para que pueda criar a los cachorros sin problemas (la hembra se desenvuelve muy bien criando a tantos retoños, por lo tanto no hay ningún problema con el número).(48)

#### **s. ENFERMEDADES**

Las ratas por lo general no tienen enfermedades comunes muy a menudo, salvo cuando las condiciones no son las adecuadas, son animales muy resistentes. Aunque pueden ser más propensas a ciertas patologías dependiendo de la raza (las de laboratorio y sus descendientes directos o medianamente indirectos pueden ser propensos a tumores malignos, las dumbo son propensas a problemas de la columna, las rex a la conjuntivitis, etc.)

Toda raza de rata tiene un riesgo de patología, esto se debe a las mutaciones realizadas que en este caso van para mal en cuanto a la salud de las ratas.(48)

#### **t. ALOJAMIENTO**

Las ratas son animales aptos para jaula (en lo posible esta debe ser de barrotes horizontales), debe medir como mínimo 65 x 40 x 35 (largo x alto x ancho) de tal modo de proporcionarle una buena superficie para trepar y hacer ejercicio, en cuanto a los accesorios éstos deben ser para roer (no gustan mucho de utilizar la rueda de ejercicio como ocurriría en los ratones).(48)

#### **u. COMPORTAMIENTO**

Las ratas son animales muy dóciles (por ello junto con las cobayas son muy populares como animal de laboratorio), inteligentes y de fácil cuidado y aclimatación. Su esperanza de vida es de 2-3 años.(48)

#### **v. VARIEDADES**

En cuanto a variedades podemos encontrar morfológicas (Rex, dumbo, común o standard, sin cola y sin pelo; las morfológicas están expuestas a determinadas patologías dependiendo del tipo de cambio morfológico que tengan) y cromáticas (Dove, azul, husky, holandés, moteada, pía, beige, chocolate, etc).(48)

### **1.4. MEDIO AMBIENTE DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

El ambiente de los animales de laboratorio está constituido por el microambiente y el macroambiente.

Son esenciales el manejo y alojamiento apropiados del bioterio para animales de laboratorio, para su bienestar, la calidad de los resultados de la investigación científica

y los programas de pruebas de control y de enseñanza, en las cuales se utilicen dichos animales y para la salud y seguridad del personal.

Un buen programa de manejo ofrece el ambiente, alojamiento y cuidado que permite a los animales crecer, madurar, reproducirse y mantener una buena salud. La realización de procedimientos específicos depende de muchos factores que son singulares a cada institución y situación particular. Con frecuencia el personal bien entrenado y motivado puede asegurar alta calidad en el cuidado de los animales, aún en instituciones con instalaciones y equipo no óptimos.(26)

Al planear un adecuado ambiente físico y social, hospedaje, espacio y manejo se deben considerar muchos factores entre ellos:

1. *Las especies, variedad y raza de animales y sus características individuales tales como sexo, edad, tamaño, conducta, experiencia y salud.*
2. *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.*
3. *El diseño y construcción del alojamiento.*
4. *La disponibilidad y adecuación de elementos que enriquezcan el medio ambiente.*
5. *Las metas del proyecto y el diseño experimental (producción, crianza, investigación, pruebas de laboratorio y educación).*
6. *La intensidad de la manipulación animal y el grado de daño que causen los procedimientos.*
7. *La presencia de materiales peligrosos o que causen enfermedad.*
8. *La duración del período de permanencia de los animales.*
9. *Los animales deben alojarse con el objeto de permitir el despliegue completo de conductas específicas de cada especie y disminuir al mínimo conductas inducidas por estrés.(36)*

Los principales factores ambientales que afectan a los animales pueden clasificarse, según Osorio & Rusenkranz (1990) en:(11)(32)

- Climáticos (Temperatura, Humedad, Ventilación).
- Físicos-Químicos (Iluminación, Ruido, Anestésicos, Higienizantes, Aire, Presencia de contaminantes).
- Habitacionales (Forma, Tamaño y Tipo de Jaulas, Densidad poblacional).
- Nutricionales (Alimento, Agua, Esquema de administración de dietas).
- Microorganismos (Patógenos específicos de cada especie).

Todos estos factores pueden ser controlados a través de la aplicación de las Buenas Prácticas de Producción, conllevando al bienestar de los animales, así como a satisfacer los requerimientos particulares de la investigación (Roubicek & Tucker, 1964). (11)(32)

#### **1.4.1. MACROAMBIENTE**

El macroambiente o encierro secundario está constituido por la habitación: tamaño, iluminación, temperatura, ventilación y humedad relativa, ausencia de ruido y polvo, entre otros. (11)(36)

##### **a. TEMPERATURA Y HUMEDAD**

El mantenimiento de la temperatura corporal dentro de los límites de la variación normal es esencial para el bienestar de los homeotermos. 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 (Gordon 1990), que pueden poner en peligro la vida.(11)(36)

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 (Garrard y otros 1974; Gordon 1993; Pennycuik 1967).(11)(36)

La temperatura ambiental y la humedad relativa (TABLA 1) pueden depender del diseño y prácticas del alojamiento y pueden ser considerablemente diferentes entre los

encierros primario y secundario. Los factores que contribuyen a la variación de temperatura y humedad, incluyen los materiales y la construcción del alojamiento, uso de filtros, número de animales por jaula, ventilación forzada de los encierros, frecuencia del cambio de material de lecho y tipo de lecho.

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%.

**TABLA 1. Temperaturas de Bulbo Seco recomendadas para Animales de Laboratorio**

<b>Especie Animal</b>	<b>Temperatura de Bulbo seco °C</b>
Ratón, rata, hámster, gerbo	18 - 26
Cuyos, conejos	16 - 22

**Fuente:** Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)

## **b. 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.

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.(11)(36)

### **c. ILUMINACIÓN**

La luz puede afectar la morfología, fisiología y conducta de varios animales (Brainard y otros 1986; Erkert y Grober 1986; Newbold y otros 1991; Tucker y otros 1984). Los fotoestresores potenciales son: fotoperíodo, fotointensidad y calidad espectral de la luz (Stoskopf 1983) 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 (Brainard 1989; Duncan y O'Steen 1985; O'Steen 1980; Saltarelli y Coppola 1979; Semple-Rowland y Dawson 1987; Wax 1977).(11)(36)

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 (Lanum 1979). 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 (Bellhorn 1980), 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 (Clough 1982).(11)(36)

Algunas guías recomiendan una intensidad de luz tan baja como 40 luxes medidos a nivel de una caja intermedia del estante (NASA 1988). 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.

### **d. RUIDO**

El ruido que producen los animales y las actividades de cuidado son inherentes a la operación de un bioterio (Pfaff y Stecker 1976). Por lo tanto, el control del ruido se debe considerar en el diseño y operación de las instalaciones (Pekrul 1991). 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. Los animales ruidosos, deben alojarse lejos de los animales silenciosos como los roedores.(11)(36)

La exposición a sonidos más altos de 85 dB puede tener tanto efectos auditivos como no auditivos (Fletcher 1976; Peterson 1980), que incluyen eosinopenia y aumento del peso de las adrenales y (Geber y otros 1966; Nayfield y Besch 1981) disminución de la fertilidad en roedores (Zondek y Tamari 1964).

Muchas especies pueden oír frecuencias de sonidos que son inaudibles para los seres humanos (Brown y Pye 1975; Warfield 1973), 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, tales como terminales de repetición de videos (Sales 1991). 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.(11)(36)

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.

#### **e. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LOS ENCIERROS SECUNDARIOS**

Todos los componentes de las instalaciones para animales, incluyendo los cuartos de animales y los espacios de apoyo (como áreas de almacenamiento, instalaciones para el lavado de jaulas, pasillos y salas de procedimientos) deben limpiarse regularmente y desinfectarse de acuerdo a las circunstancias y con una frecuencia basada en el uso del área y en la naturaleza de la posible contaminación.(11)(36)

Cuando las áreas tengan diferentes riesgos de contaminación, los utensilios de limpieza deberán asignarse a cada una de ellas y no trasladarse de una a otra. Estos utensilios de limpieza deben ser aseados regularmente y estar fabricados con materiales resistentes a la corrosión, los utensilios desgastados deben reemplazarse regularmente. Los utensilios deben guardarse de una forma organizada y limpia que facilite su secado y reduzca al mínimo la contaminación.

#### **f. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD SANITARIA**

La evaluación de las prácticas sanitarias debe ser adecuada a los procesos y materiales utilizados, puede incluir la inspección visual de los materiales, la verificación de la temperatura del agua, y el análisis microbiológico. La intensidad de los olores animales, particularmente del amoníaco no debe usarse como único medio de constatar la efectividad del programa sanitario.

La decisión de modificar la frecuencia del cambio de cama de las jaulas o del lavado de las mismas, debe basarse en factores tales como la concentración de amoníaco, la apariencia de las jaulas, la condición del lecho y el número y tamaño de los animales hospedados en la jaula.(11)(36)

#### **1.4.2. MICROAMBIENTE**

El microambiente constituye el encierro primario del animal, determinado por el habitáculo o jaula y todo lo que en él se incorpora, como: lecho; agua; alimento, número de animales y objetos de enriquecimiento. Sus componentes deben satisfacer las necesidades fisiológicas, de conducta y las interacciones sociales entre individuos de la misma especie, así como el establecimiento de jerarquías dentro del encierro.(11)(36)

**a. ALOJAMIENTO O ENCIERRO PRIMARIO**

El encierro primario (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 (de acuerdo con los requerimientos de las especies).
- 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.(11)(36)

Deben estar contruidos con materiales durables que resistan la corrosión y que soporten la manipulación ruda sin despostillarse, cuartearse u oxidarse. En algunas situaciones, materiales menos durables, como la madera, pueden ofrecer un ambiente más apropiado y pueden usarse para construir perchas, estructuras para que trepen, áreas de descanso y rejas perimetrales para los encierros primarios. Puede ser

necesario el reemplazo periódico de los objetos de madera, debido a su deterioro y dificultades para sanearlo.

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.(11)(36)

Con frecuencia los roedores se hospedan sobre pisos de alambre que mejoran la sanidad de las jaulas, al permitir el paso de heces y orina para recolectarse en una charola colocada debajo. Sin embargo, algunas evidencias sugieren que los alojamientos sobre piso sólido y material de cama son preferidos por los roedores (Fullerton y Gilliatt 1967; Grover-Johnson y Spencer 1981; Ortman y otros 1983). Por lo tanto, se recomiendan las jaulas de piso sólido con lecho para los roedores.(11)(36)

## **b. AMBIENTE SOCIAL**

Se deben tomar en consideración las necesidades sociales de los animales.

El medio ambiente social usualmente comprende la comunicación y el contacto físico entre individuos de la misma especie (conespecíficos) aunque puede inducir la comunicación sin contacto entre los individuos a través de señas (visual), señales olfatorias o auditivas. Los animales gregarios deben alojarse con sus conespecíficos, siempre y cuando sea oportuno y sean compatibles. Son esenciales las interacciones sociales apropiadas entre conespecíficos para el desarrollo normal de muchas especies. La compañía social puede aminorar una situación estresante (Gust y otros 1994), reducir las anormalidades de conducta (Reinhardt y otros 1988, 1989), aumentar las posibilidades de ejercicio (Whary y otros 1993) y expandir las conductas típicas de la especie y la estimulación cognoscitiva.(11)(36)

Deben evaluarse factores tales como la densidad de población, la habilidad de dispersarse, la familiaridad inicial entre los animales y la estratificación social para formar los grupos animales (Borer y otros 1988; Diamond y otros 1987; Drickamer 1977; Harvey y Chevins 1987; Ortiz y otros 1985; Vandenbergh 1986, 1989). (11)(36)

Al seleccionar un medio ambiente social conveniente se debe prestar atención a si los animales son naturalmente territoriales o comunales, o si deben alojarse en parejas o en grupos; la comprensión de la conducta social natural típica de la especie facilita un alojamiento socialmente exitoso.(11)(36)

### **c. ALIMENTACIÓN**

Los animales deben ser alimentados con dietas apetitosas, no-contaminadas y nutricionalmente adecuadas, 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 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 (insectos y otras plagas) y contaminantes químicos a las colonias animales.(11)(36)

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 (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. El alimento viejo o el alimento transportado y almacenado incorrectamente puede volverse deficiente en nutrientes.(11)(36)

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.(11)(36)

*El diseño y ubicación de los comederos* deben permitir un fácil acceso al alimento y reducir al mínimo la contaminación con orina y heces. Cuando los animales se alojen en grupos deberá haber suficiente espacio y suficientes lugares en donde alimentarse, para reducir al mínimo la competencia por la comida y asegurar el acceso a ella de todos los animales, especialmente si el protocolo experimental o las prácticas de manejo restringen el alimento. Los contenedores de alimento no deben cambiarse entre áreas que representen diferentes riesgos de contaminación. Estos deben ser aseados y sanitizados regularmente.(11)(36)

#### **d. 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 (Hombberger y otros 1993).(11)(36)

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.

Los utensillos 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.(11)(36)

#### **e. 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.(11)(36)

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 (Vesell 1967; Vesell y otros 1973, 1976). No se recomiendan las virutas de cedro porque emiten hidrocarburos aromáticos inductores de las enzimas microsomales hepáticas y citotoxicidad (Torrönen y otros 1989; Weichbrod y otros 1986) y se ha reportado que aumentan la incidencia de cáncer (Jacobs y Dieter 1978; Vlahakis 1977).(11)(36)

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.(11)(36)

La cantidad de lecho en la jaula debe ser suficiente para que los animales se mantengan secos durante el lapso comprendido entre los cambios y en el caso de los animales de laboratorio pequeños se debe tener cuidado de que las pipetas de los bebederos no toquen el lecho, porque esto causa derrame de agua dentro de la jaula.(11)(36)

#### **f. CAMBIO DE LECHO**

La cama sucia debe retirarse y reemplazarse por material limpio, tan frecuente como sea necesario para mantener a los animales limpios y secos. La frecuencia del cambio depende del criterio profesional del personal que cuida a los animales, de acuerdo con el investigador y depende de factores tales como el tamaño y número de animales en el encierro primario, el tamaño del encierro, la producción de heces y orina, la apariencia y grado de humedad de la cama y las condiciones experimentales (cirugía o debilitamiento que pueden limitar el movimiento o acceso de los animales a las áreas de la jaula que no están sucias con heces u orina).(11)(36)

No existe de manera absoluta una frecuencia mínima de cambio de lecho, pero típicamente varía desde diario hasta una vez por semana. En algunos casos está contraindicado el cambio frecuente de cama, como en los períodos inmediatamente anteriores y posteriores al parto, cuando las feromonas son esenciales para el éxito de la reproducción o bien cuando los objetivos de la investigación no lo permitan.(11)(36)

#### **1.5. CALIDAD SANITARIA DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

El control sanitario es el conjunto de procedimientos que se realiza a intervalos regulares de tiempo a través de los cuales se puede determinar la presencia o no de un agente microbiano.(4)

Para la evaluación de la calidad sanitaria se realizan controles microbiológicos en:

- Animales.
- Ambiente.
- Alimento.
- Agua.
- Eficiencia del UV. (4)

### **1.5.1. CATEGORÍAS HIGIÉNICO – SANITARIAS DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO**

En función de la fuente de obtención y las condiciones de cría del animal, así como la microbiota asociada al mismo, los animales de laboratorio se clasifican en diferentes categorías higiénico-sanitarias. 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(32)

#### **a. 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 trasmisibles al hombre, tanto en el examen clínico como post – mortem. Se refiere a las siguientes entidades biológicas:(32)

- *Salmonella y Shigella*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Yersinia pseudotuberculosis*
- *Leptospira spp*
- Dermatofitos
- *Sarcoptes scabiei*
- Virus de la Coriomeningitis linfocitaria (LCM)(32)

#### **b. 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* (*Clostridium piliformis*)
- Estadios intermedios de Céstodos y de Artrópodos parásitos obligados.
- Especies determinadas demandan la ausencia de los Virus: Ectromelia (Ratón)(32)

**c. CATEGORÍA III: "ANIMAL GNOTOBIÓTICO CON MICROBIOTA 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*
- *Pasteurella*
- Coccidias (*Eimerias spp*) y Helmintos patógenos(32)

Además especies determinadas demandan la ausencia de:

- *Streptobacillus moniliformis* (Ratones y Ratas)
- *Corynebacterium kutscheri* (*C. murium*) (Ratones)
- Todas las especies de *Mycoplasma* (Ratones y Ratas)(32)

**d. 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(32)

#### **e. 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.(32)

#### **1.5.2. CONTROL MICROBIOLÓGICO A LOS ANIMALES DE LABORATORIO.**

El control microbiológico a los animales de laboratorio se recomienda para detectar la presencia de microorganismos no deseados o para conocer los cambios microbiológicos en el ambiente y así poder evaluar los procedimientos rutinarios de desinfección. (32)

El monitoreo periódico a los animales de laboratorio para determinar la presencia de su microbiota no patógena definida implantada voluntariamente o su microbiota no patógena para la especie obtenida espontáneamente o accidentalmente en contacto con el hombre es de gran importancia. (32)

Existen cuatro razones básicas para incluir un microorganismo particular en un monitoreo de salud:

- Los microorganismos pueden influir en los resultados de la prueba en los cuales los animales son usados.
- Los microorganismos tienen una influencia negativa en el status de los animales.
- Los microorganismos pueden infectar otras especies, incluyendo al hombre.

- Los microorganismos tienen una influencia negativa en el resultado de la producción de los animales.(32)

En un monitoreo biológico para organismos específicos no deseados, existen consideraciones generales, así como aspectos a tener en cuenta como es la frecuencia de los muestreos, el tamaño de la muestra (número de animales a muestrear), el tipo de muestras, el método de examen o el procedimiento para detectar e identificar los organismos específicos, el conocimiento de la sensibilidad y especificidad de los métodos o test usados y el conocimiento de la prevalencia de los microorganismos.(32)

#### **1.5.2.1. FRECUENCIA DEL CONTROL EN LOS ANIMALES DE LABORATORIO**

En dependencia de la categoría higiénico sanitaria del animal de experimentación se realizarán los controles bajo el siguiente lapso de tiempo.

- Animales convencionales: 6 meses
- Animales SPF: 3 ó 4 meses
- Animales Axénicos: 15 días
- Animales Gnotobióticos: 15 días
- Animales Centinelas: 3 ó 4 meses(4)

## **CAPÍTULO II**

### **2. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN**

El trabajo de tesis fue realizado en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia con el fin de efectuar un diagnóstico acertado y veraz del estado actual tanto del ambiente como de los animales, este bioterio se encuentra ubicado en el segundo piso de las aulas de Bioquímica tras el bar, ocupando un área total de 33,06m<sup>2</sup>.

Dicho bioterio está dividido en dos áreas; en su primera área (delantera) funciona una oficina donde se encuentra el responsable, en su segunda área (trasera) se albergan los animales de experimentación 106 en total, los mismos que se encuentran dispuestos en dos estanterías, además consta de 3 mesones en donde se realizan los diferentes ensayos y un anaquel en donde se almacenan los materiales y utensillos necesarios para los animales.

#### **2.2. METODOLOGÍA DE TRABAJO**

##### **2.2.1. ASPECTOS DE LA METODOLOGÍA**

La metodología comprendió fases de: Identificación de los puntos de control en el macroambiente, microambiente y animales de experimentación, planificación, ejecución y procesamiento de resultados.

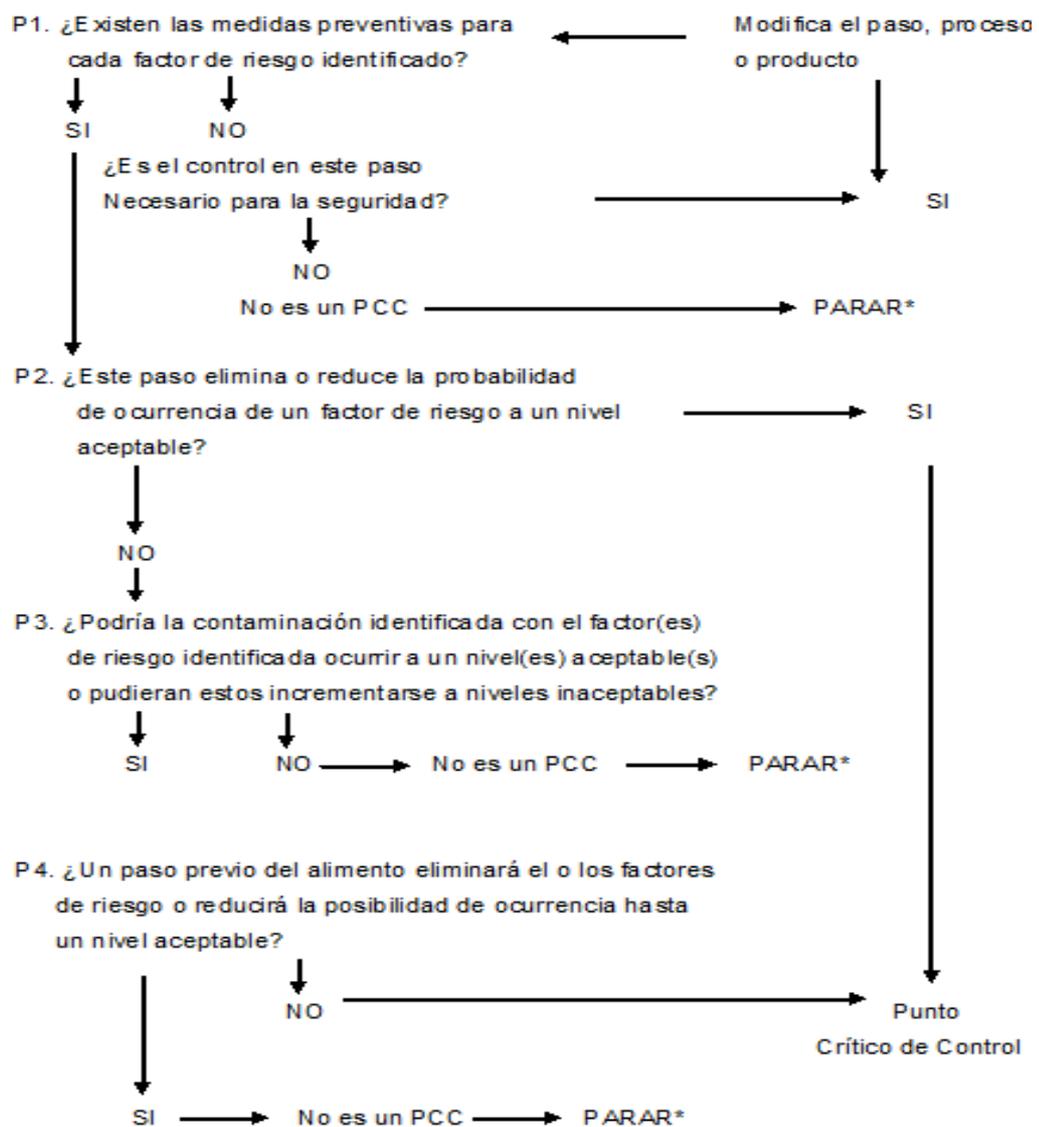
##### **2.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL**

La identificación de los puntos críticos de control tanto del macroambiente como del microambiente se determinaron mediante el Árbol de decisiones, este análisis fue

aplicado a cada paso del proceso que tenga un factor de riesgo y los resultados obtenidos fueron cotejados con los parámetros de calidad que se establecen en las normativas internacionales.

Los parámetros que se analizarán en el macroambiente son: temperatura, humedad relativa, ventilación, iluminación, ruido, pisos, techos, paredes, estanterías, aire, ventanas; mientras que los parámetros que comprenden el microambiente son: espacio designado a cada animal, jaulas, lechos, agua, alimento, bebederos, comederos e implementos para ejercicio.

### ÁRBOL DE DECISIONES DE PC



### 2.2.3. PLANIFICACIÓN

Se tomaron muestras de acuerdo con la complejidad del sistema, se analizaron según el Árbol de Decisiones de PCC y el número de elementos en estudio en el macroambiente, microambiente y animales para experimentación.

#### 2.2.3.1. MACROAMBIENTE

- **Temperatura:** Se recopilaron datos dos veces por día (09h00 y 17h00), durante 15 días.
- **Humedad relativa:** Se recopilaron datos dos veces por día (09h00 y 17h00), durante 15 días.
- **Iluminación:** Se recopilaron datos dos veces por día (09h00 y 17h00), durante 15 días.
- **Ruido:** Se recopilaron datos dos veces por día (09h00 y 17h00), durante 15 días.
- **Estanterías:** Se tomaron muestras en cada una de las divisiones de las 2 estanterías.
- **Ambiente:** El bioterio cuenta con un área de 33,06m<sup>2</sup>. (Análisis microbiológico)

#### 2.2.3.2. MICROAMBIENTE

- **Jaulas:** Existen 106 ratas distribuidas en 53 jaulas de las cuales se tomaron una muestra para comprobar la contaminación microbiana de las mismas.
- **Comederos:** Cada una de las 53 jaulas cuenta con un comedero.
- **Agua:** Se tomará muestras de puntos estratégicos dentro del sistema de distribución del agua, los mismos estarán localizados desde el pozo hasta los bebederos utilizados por los animales.
- **Alimento:** Se tomará muestras del alimento en distintos puntos, desde su almacenamiento hasta su distribución en los comederos de los animales.

### **2.2.3.3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

#### **a) POBLACIÓN**

El bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia cuenta con 106 animales de experimentación, ratas (*Rattus norvegicus*), criadas y reproducidas en el bioterio, de genética desconocida y sin codificación.

#### **b) MUESTRA**

10 animales (*Rattus norvegicus*) de diferentes colonias, fueron escogidas completamente al azar con las siguientes características.

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

### **2.2.4. EJECUCIÓN**

#### **2.2.4.1. MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA**

El equipo utilizado para realizar el control de la temperatura es el **Termohigrómetro**, el mismo que está calibrado por el Centro de Metrología de la Fuerza Terrestre y cuya última calibración se realizó el 20 de enero de 2010, los datos se recogieron dos veces por día, en la mañana y en la tarde (09h00 y 17h00); durante 15 días.

#### **2.2.4.2. MEDICIÓN DE LA HUMEDAD RELATIVA**

El equipo utilizado para realizar el control de la humedad relativa es el **Termohigrómetro**, el mismo que está calibrado por el Centro de Metrología de la

Fuerza Terrestre y cuya última calibración se realizó el 20 de enero de 2010, los datos se recogieron dos veces por día, en la mañana y en la tarde (09h00 y 17h00); durante 15 días.

#### **2.2.4.3. MEDICIÓN DE LA ILUMINACIÓN**

El equipo utilizado para realizar el control de la iluminación es el **Luxómetro**, el mismo que está calibrado por la Empresa Eléctrica Riobamba S.A. y cuya última calibración se realizó el 21 de diciembre de 2010, los datos se recogieron dos veces por día, en la mañana y en la tarde (09h00 y 17h00); durante 15 días.

- *Especificaciones del equipo:*

Luxómetro TES – 1335  
Digital Light Meter  
Electrical Electronic Corp.

#### **2.2.4.4. MEDICIÓN DEL RUIDO**

El equipo utilizado para realizar el control de la iluminación es el **Sonómetro**, el mismo que está calibrado por la Empresa Eléctrica Riobamba S.A. y cuya última calibración se realizó el 21 de diciembre de 2010, los datos se recogieron dos veces por día, en la mañana y en la tarde (09h00 y 17h00); durante 15 días.

- *Especificaciones del equipo:*

Sonómetro TES 1350 A  
Sound Level Meter  
35~130dB Range                      Fast/Slow Response  
0.1 dB Resolution                      Max Hold function  
1.5 dB Accuracy                      AC/DC Output  
A/C Weighting

#### **2.2.4.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AMBIENTE**

El bioterio cuenta con un área de 33,06 m<sup>2</sup>, el mismo que se analizó a través del Método de sedimentación o Caída a placas que consiste en evaluar las colonias microbianas que por efecto de la gravedad se depositan en la superficie solidificada del medio de cultivo; se procedió de la siguiente manera:

##### **Materiales**

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

##### **Procedimiento**

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

#### **2.2.4.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ESTANTERÍAS, JAULAS Y COMEDEROS**

Para este análisis se realizó el examen microbiológico de superficies, para esto se tomó muestras en cada una de las divisiones de las 2 estanterías que se encuentran en el bioterio. Se tomó también muestras de las jaulas en las que se alojan los animales de experimentación y además de los comederos presentes en las mismas para comprobar su contaminación microbiana.

## **Materiales**

- Plantillas de papel de 10 cm<sup>2</sup> 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**

1. Remojar el hisopo estéril en la solución, presionar contra las paredes para desechar el exceso.
2. 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.
3. Frotar 4 áreas adicionales de 10 cm<sup>2</sup>, enjuagando el hisopo después de cada barrido.
4. Agitar los tubos con las soluciones contaminadas contra la palma de la mano.
5. Realizar disoluciones de la muestra, 1 mL en el tubo 1 con 9 mL de agua de peptona, 1mL del tubo 1 pasamos al tubo 2 con 9 mL de agua de peptona y sucesivamente hasta el número de disoluciones que se elija.
6. Sembrar 0.1 mL de las disoluciones elegidas en las cajas petri.
7. Contar las colonias y reportar por 10 cm<sup>2</sup> (42)

### **2.2.4.7. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA**

Las muestras para este análisis fueron tomadas de cuatro puntos estratégicos dentro del sistema de distribución del agua en la ESPOCH, desde el pozo hasta los

bebederos que se encuentran en cada jaula, como se muestra en el esquema siguiente:

### **Procedimiento**

1. Preparar asépticamente el área en la que se van a inocular las muestras.
2. Preparar las muestras de agua a analizar.
3. Retirar la pipeta estéril de 1mL del set de análisis PETRIFILM, quitar la envoltura con cuidado de no tocar el extremo de la pipeta para evitar una posible contaminación.
4. Tomar exactamente 1mL de la muestra con la pipeta estéril.
5. Levantar la hoja de la cubierta de la placa y aplicar suavemente la muestra en el centro del círculo rosado.
6. Remover suavemente la placa de lado a lado para distribuir uniformemente la muestra.
7. Colocar la placa sobre una superficie plana.
8. Incubar a 35°C durante 48 h.
9. Realizar el conteo de las colonias.

### **2.2.4.8. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL ALIMENTO**

Se tomaron cuatro muestras del alimento las mismas que permitirán determinar el punto en el que sucede o no una contaminación, los puntos a realizar el análisis fueron: alimento sellado en el lugar de almacenamiento, alimento abierto y en uso, alimento distribuido en los comederos de las jaulas grupales y de las jaulas individuales.

### **Procedimiento**

1. Preparar asépticamente el área en la que se van a inocular las muestras.

2. Preparar una disolución del producto alimenticio de 1:10.
3. Retirar la pipeta estéril de 1mL del set de análisis PETRIFILM, quitar la envoltura con cuidado de no tocar el extremo de la pipeta para evitar una posible contaminación.
4. Tomar exactamente 1mL de la dilución de la muestra con la pipeta estéril.
5. Levantar la hoja de la cubierta de la placa y aplicar suavemente la muestra en el centro del círculo rosado.
6. Remover suavemente la placa de lado a lado para distribuir uniformemente la muestra.
7. Colocar la placa sobre una superficie plana.
8. Incubar a 35°C durante 48 h.
9. Realizar el contaje de las colonias.

## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se tomaron 10 animales de experimentación de una población de 100 animales, ratas *Rattus norvegicus*, del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, es decir se trabaja con una muestra centesimal para realizar los siguientes análisis: físico, anatómico, hematológico, parasitario y microbiológico.

### a. ANÁLISIS FÍSICO

La realización de este análisis tiene por objeto observar las características externas de las ratas, peso, sexo y distancia cola-cabeza. Para el mismo se inspeccionó el animal externamente, se usa una balanza analítica calibrada, se observa y mide la distancia ano genital.

## **b. ANÁLISIS ANATÓMICO**

Este análisis se realizó mediante una disección del animal que tuvo por objeto observar las características internas de las ratas, es decir se observaron las características morfológicas de cada uno de los órganos del animal de experimentación.

### **Materiales**

- Equipo de disección.
- Bandeja.
- Alcohol.
- Éter etílico.
- Cámara de vidrio.
- Algodón.
- Espumaflex.
- Papel toalla.
- Alfileres.
- Guantes de goma.

### **Procedimiento**

1. Colocar sobre el espumaflex papel toalla.
2. Anestesiarse al animal.
3. Colocar al animal anestesiado sobre el espumaflex y con la ayuda de los alfileres sujetar al mismo con sus extremidades extendidas.
4. Desinfectar la zona donde se va a realizar la insición.
5. Proceder a la disección del animal, separando primero la piel del animal.
6. Una vez abierto observar la forma, el color y tamaño de cada uno de los órganos del animal.

**c. ANÁLISIS HEMATOLÓGICO**

La extracción de sangre para este análisis debe ser del corazón, usando técnicas apropiadas y previa anestesia del animal, los resultados deben ser comparados con los valores normales para este tipo de animales de experimentación que se especifican en las normativas internacionales.

**d. IDENTIFICACIÓN DE ECTOPARÁSITOS**

Este análisis permite la identificación de Ectoparásitos o parásitos externos del animal, el mismo que se realizó aplicando el Método de Graham.

**Materiales**

- Baja lenguas.
- Cinta engomada.
- Placas portaobjetos.
- Guantes de goma.
- Microscopio.

**Procedimiento**

1. Colocar la cinta engomada en el baja lenguas.
2. Tomar la muestra de los animales arrastrando el baja lenguas por el vientre del animal, el lomo, orejas, cola, hocico, patas y piel.
3. La cinta adhesiva se colocó sobre un portaobjetos con la cara engomada hacia el cristal, y se analiza en el microscopio.

## **e. IDENTIFICACIÓN DE ENDOPARÁSITOS**

Este análisis permite la identificación de parásitos intestinales del animal, el mismo que se realizó tomando una muestra del contenido cecal y analizándolo mediante un examen coproparasitario.

### **Materiales**

- Frasco para muestras de heces.
- Placas Porta y cubreobjetos.
- Palillos.
- Suero fisiológico.
- Lugol.
- Microscopio.

### **Procedimiento**

1. En una placa portaobjetos se colocan dos gotas, en la parte izquierda solución salina (suero fisiológico) y en la derecha lugol.
2. 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.
3. Se homogeniza en la lámina primero en la solución salina y luego en el lugol.
4. Se cubre las muestras con los cubreobjetos. La suspensión no debe quedar muy gruesa pero tampoco muy delgada.

## **f. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS**

### **a. CULTIVO DE SECRESIÓN FARÍNGEA**

La flora aislada incluye cocos y bacilos, tanto Gram positivos como Gram negativos 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. Se realizó cultivos para demostrar la presencia de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y otras especies del género *Streptococcus*.

### **Procedimiento**

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Incubar por 18 a 24 horas a 36°C.

### **b. 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 género *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**

1. Colocar la muestra de heces del contenido cecal en tetracionato, dejar de 8 a 12 horas a una temperatura de 35-37 °C
2. Sembrar en las cajas de agar EMB, sabouraud y una caja de SS.
3. Diseminar el inóculo utilizando dos asas en anillo.
4. Ya diseminadas de esta manera las muestras en la superficie de las cajas, incubar a 36°C por 18 a 24 horas.

### **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 grueso 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 pruebas 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.

### **c. COLORACIÓN DE GRAM**

1. Hacer un frotis.
2. Fijar el frotis con calor y dejar enfriar.
3. Cubrir el frotis con cristal violeta por 1 minuto.
4. Lavar con agua de chorro, eliminar el exceso de agua.

5. Cubrir el frotis con lugol para Gram por 1 minuto.
6. Lavar con agua de chorro.
7. Decolorar con alcohol acetona por 20-30 segundos.
8. Lavar con agua de chorro.
9. Cubrir con safranina el frotis por 30 segundos.
10. Lavar con agua de chorro.
11. Dejar secar al aire y observar al microscopio con objetivo 100x.

#### **d. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN**

##### **I. 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).

**Reactivo:** Agua oxigenada al 3%.

##### **Método**

Tomar con el asa una colonia de 24 horas y depositarla sobre un porta. Añadir con una pipeta una gota de agua oxigenada al 3%.

##### **Interpretación de los resultados**

Se considera la prueba positiva cuando se observa desprendimiento de burbujas de gas (O<sub>2</sub>).

## II. 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.

### Medios y Reactivos

La prueba puede hacerse partiendo directamente de una colonia obtenida en la placa de aislamiento o previamente reactivada en algún medio líquido enriquecido.

**Reactivo:** Plasma de conejo o plasma humano obtenido de sangre fresca estéril, no nitrada.

### Método

*Prueba del portaobjetos:* Depositar una gota de agua destilada estéril sobre un porta. Homogeneizar sobre ella una gota de suspensión bacteriana de veinticuatro horas en Caldo Cerebro-Corazón. Añadir una gota de plasma junto al homogeneizado anterior y mezclar bien.

### Interpretación de los resultados

La reacción positiva se observa entre los 15 y 20 segundos con formación de abundantes grumos de color blanco. Se considera negativa la prueba, si no hay aglutinación en 3 o 4 minutos.

### III. 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.

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*).

### IV. FERMENTACIÓN DE MANITOL

Es una prueba útil en la identificación de *Staphylococcus aureus* debido a que el agar Chapman manitol es un medio selectivo para su aislamiento, sirve como medio diferencial de cepas fermentadoras del manitol como *S. aureus* que en condiciones anaerobias es la única especie del género que produce la citada fermentación, cambiando el color del agar de rosa a color amarillo.

### V. PRUEBA DE LA SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA

Esta prueba puede utilizarse como diagnóstico presuntivo en la identificación de los *Streptococcus* beta-hemolíticos del grupo A de Lancefield, ya que, a diferencia de la mayoría de los *Streptococcus*, suelen ser sensibles a bajas concentraciones de Bacitracina.

#### Medio y Reactivo

Se utiliza agar sangre y discos de Bacitracina de 0.04 U.

### **Método**

Inocular por diseminación en superficie una placa de agar sangre con una suspensión del microorganismo problema. Dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Colocar con unas pinzas estériles un disco de Bacitracina en el centro de la placa inoculada. Incubar de 35° a 37°C durante 24 horas.

### **Interpretación de los resultados**

Se considera la prueba positiva cuando hay inhibición del desarrollo bacteriano alrededor del disco de Bacitracina, es decir si se observa un halo de 14mm de diámetro o más alrededor del disco es un *Streptococcus*  $\beta$  hemolítico del Grupo A y si el halo que se forma alrededor del disco es menor de 14mm pertenece al Grupo No A. La prueba será negativa cuando no se observe inhibición.

## **VI. PRUEBA DE CAMP**

Es una prueba presuntiva de identificación de los *Streptococcus* del Grupo B. Está basada en la potenciación de la zona de lisis formada por *Staphylococcus aureus* productores de beta-lisina, por una sustancia denominada CAMP-factor, elaborada por los *Streptococcus* del Grupo B.

**Medio de cultivo:** agar sangre

### **Método**

La prueba se realiza utilizando una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de beta-lisina estafilocócica.

Sembrar una estría espesa con el *Streptococcus* problema y, perpendicularmente a ella, y a 3 ó 4mm. de distancia, una estría de la cepa de *Staphylococcus aureus*

productora de beta-lisina (o un disco con beta-lisina estafilocócica). Incubar a 35-37°C durante 24-48 horas.

### **Interpretación de los resultados**

Se considera la prueba positiva, si se observa una hemólisis clara en triángulo o punta de flecha.

## **VII. PRUEBA DEL TUBO DE GERMINACIÓN (TEST DE FILAMENTACIÓN)**

Es una prueba de gran valor para la identificación rápida y presuntiva de *Candida albicans*, que con *Candida stellatoidea* son las únicas levaduras del género cándida, capaces de producir tubos germinales.

**Reactivo:** Suero humano.

### **Inoculación**

Suspender una colonia en un tubo de hemólisis que contenga 0.5mL de suero (el inóculo no debe ser demasiado denso, ya que puede inhibir la filamentación).

### **Incubación**

Incubar a 35-37°C durante dos a cuatro horas.

### **Interpretación de los resultados**

Examinar al microscopio, con 400 aumentos, una gota de la suspensión entre porta y cubre.

La prueba se considera positiva cuando se observa la formación en las células de cortos filamentos hifales en forma de dedo de guante, llamados tubos de germinación.

Estos tubos son prolongaciones de las células, sin separación ni membrana visible. Cuando no hay formación de tubos germinales se considerará la prueba negativa.

### **VIII. PRUEBAS CON AGAR HIERRO DE KLIGLER**

Es un medio utilizado preferentemente para la diferenciación de *Enterobacteriaceae*. En este se puede determinar las fermentaciones de los hidratos de carbono (glucosa y lactosa), la producción de gas y Sulfuro de hidrógeno.

#### **Inoculación**

Con una aguja de inoculación se toma una colonia aislada y se siembra por picadura hasta unos 0.6cm del fondo. Se retira la aguja siguiendo el mismo camino de entrada y, sin volver a cargar el asa, se siembra en estría la superficie del pico de flauta.

#### **Incubación**

Incubar a 35-37°C durante dieciocho a veinticuatro horas. Es importante respetar estos tiempos de incubación, ya que lecturas de menor o mayor incubación pueden dar resultados falsamente positivos o negativos.

#### **Interpretación de los resultados**

Se tendrán en cuenta los siguientes aspectos:

a. ***Producción de ácido a partir de glucosa***

Se pone de manifiesto en la parte inferior del medio al producirse un cambio de color debido al viraje del indicador de pH que pasa de rojo-naranja a amarillo (ácido).

b. ***Producción de ácido a partir de lactosa***

Se aprecia por un cambio de color de rojo-naranja a amarillo en la parte del pico de flauta del medio.

c. ***Producción de gas a partir de la glucosa***

Los gases producidos son el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>, productos terminales del metabolismo de la glucosa, que se aprecia por la aparición de burbujas en la parte inferior del medio, por una producción de grietas en su interior e incluso por una elevación del medio que se separa del fondo.

d. ***Producción de sulfhídrico***

Se manifiesta por un ennegrecimiento del medio en la línea de inoculación o sobre la capa superficial. En cultivos de bacterias muy productoras de SH<sub>2</sub> a veces llega a ennegrecer todo el medio, ocultando la reacción ácida de la parte inferior del medio (tubo), pero si se ha formado SH<sub>2</sub> es que existe una condición ácida en esa zona por lo que se considerará el resultado, de la producción de ácido a partir de la glucosa, como positivo.

## **IX. PRODUCCIÓN DE INDOL**

La prueba del indol determina la capacidad de las bacterias de degradar el triptófano dando indol. Algunas bacterias, gracias a la enzima triptofanasa hidrolizan el aminoácido, dando indol, ácido pirúvico y amoníaco. La presencia de indol se detecta observando la formación de una coloración rosa-roja en el medio al añadir para-dimetilaminobenzaldehído.

**Medio de cultivo:** SIM

**Reactivo:** Reactivo de Kovacs

### **Inoculación**

Inocular una o dos colonias, con asa de platino, en el caldo.

### **Incubación**

Incubar durante 24-48 horas a 35-37°C

### **Interpretación de los resultados**

Después de la incubación, realizar lo siguiente:

Añadir 5 gotas del reactivo de Kovacs agitando suavemente. La aparición de un anillo de color rojo en la superficie del medio indica producción de indol. Si no se forma el anillo rojo, se considera la prueba negativa.

## **X. PRUEBA DE LA MOVILIDAD**

La movilidad es una característica importante al hacer una determinación bacteriana, pues indirectamente señala que el microorganismo posee flagelos, rasgo taxonómico que es difícil poner de manifiesto por otros métodos, incluidos los tintoriales.

**Medio de cultivo:** SIM

### **Inoculación**

Se siembra por picadura en el centro del medio, introduciendo la aguja con cuidado hasta unos 0.6cm del fondo y extrayéndola siguiendo el mismo recorrido de entrada.

### **Incubación**

La temperatura de incubación dependerá de la bacteria estudiada, ya que muchos organismos no son móviles a su temperatura óptima de crecimiento (35-37°C) y lo son a 18-25°C.

Se deben inocular dos tubos simultáneamente, incubando uno a 35-37°C y, el otro, a 22-25°C realizando lecturas diarias durante diez días.

### **Interpretación de los resultados**

El test de movilidad se interpreta por un examen macroscópico del medio. Si el microorganismo es móvil, se producirá una zona de difusión del crecimiento a los lados de la línea de inoculación. Si la bacteria es inmóvil, crecerá sobre la línea de siembra.

La movilidad deberá ser interpretada antes de adicionar el reactivo de Kovacs.

## **XI. PRUEBA DEL CITRATO**

Determina la capacidad que poseen algunos microorganismos de utilizar como única fuente de carbono el citrato, produciendo alcalinidad.

### **Inoculación**

Inocular en estría, en el pico de flauta.

### **Incubación**

Incubar a 35-37°C durante 24-48 horas.

### **Interpretación de los resultados**

Son dos los aspectos que confirman la positividad de la prueba:

- a. La observación de crecimiento sobre el pico de flauta.

- b. La variación de coloración de verde a azul, debido a la alcalinización del medio, producida por la liberación de sodio del citrato utilizado, sodio, que con las moléculas de agua presentes formará NaOH.

## **XII. PRUEBA DE LA ÚREA**

Determina la capacidad de un organismo para desdoblar la úrea, en amoníaco y CO<sub>2</sub>, por acción de la enzima ureasa. La visualización del proceso se fundamenta en que la alcalinización producida en el medio de cultivo se detecta mediante un indicador de pH (rojo de fenol).

### **Solución de úrea básica**

Se utiliza una solución de úrea al 20%. Pesar 20g de úrea deshidratada y disolverlos en 100mL de agua destilada. No debe calentarse la solución ya que la úrea se desnaturaliza por el calor. Esterilizar por filtración.

### **Inoculación**

Efectuar un inóculo denso en la zona del pico de flauta.

### **Incubación**

Incubar a 35-37°C durante 24-48 horas.

### **Interpretación de los resultados**

Se considera la prueba positiva si el medio adquiere una tonalidad rosada, y negativa si mantiene su coloración inicial.

**e. PROCESO DE RESULTADOS**

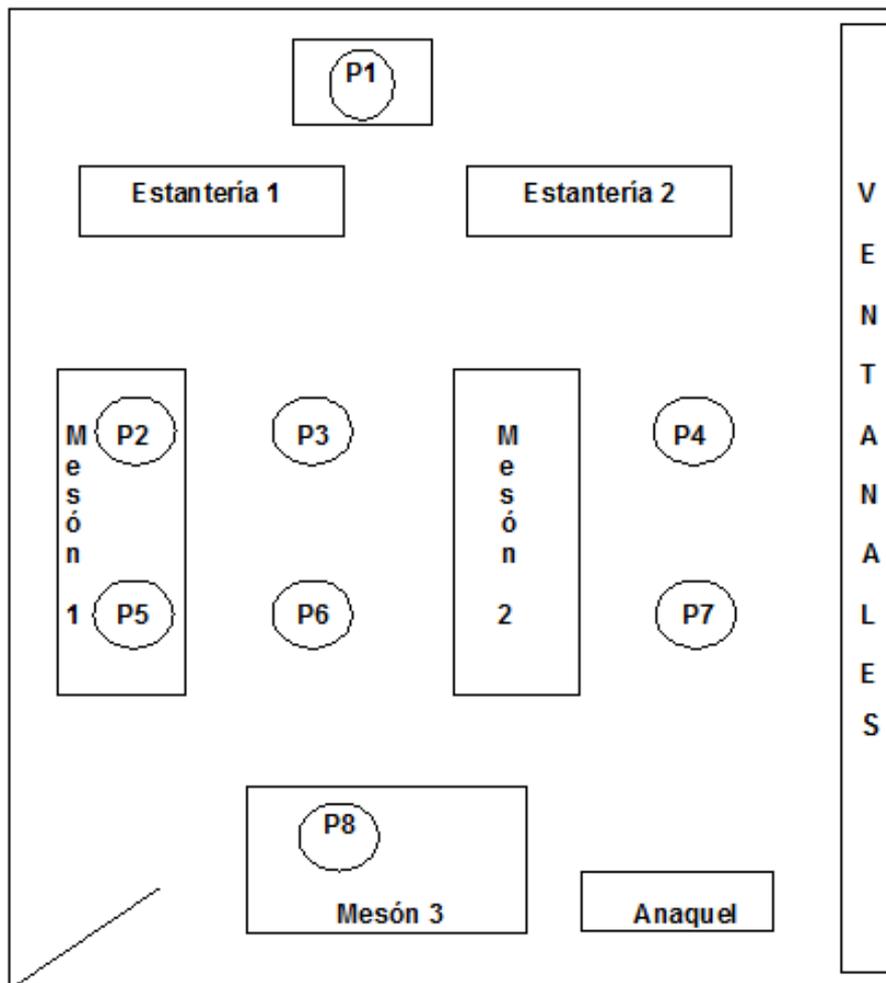
Es el proceso a través del cual se revisa los resultados generados y el parámetro con el cual se compara y difiere dependiendo de las muestras tomadas en los diferentes puntos críticos de control, en donde cada uno debe cumplir con las normas internacionales establecidas.

### CAPÍTULO III

#### 10. RESULTADOS

##### a. MEDIO AMBIENTE

Croquis del bioterio (puntos de toma de muestra para análisis del aire)



## MACROAMBIENTE (MA)

**TABLA 2. Análisis microbiológico del aire en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

Sitio de muestreo	N°UFC/placa de PCA	N°UFC/placa de Agar Sangre	*Rango permitido UFC/placa
Punto 1	228	144	0 – 25
Punto 2	264	156	0 – 25
Punto 3	180	216	0 – 25
Punto 4	124	204	0 – 25
Punto 5	176	112	0 – 25
Punto 6	276	260	0 – 25
Punto 7	108	112	0 – 25
Punto 8	120	112	0 – 25
<b>Promedio</b>	<b>184,5</b> <b>14,8x10<sup>3</sup>/m<sup>3</sup></b>	<b>164,5</b> <b>13,2x10<sup>3</sup>/m<sup>3</sup></b>	<b>0 – 25</b> <b>&lt;5UFC/m<sup>3</sup></b>
<b>Desviación Estándar</b>	<b>65,8</b>	<b>56,2</b>	
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0,35%</b>	<b>0,34%</b>	

\*Oficina Nacional de Normalización de Cuba.

Una vez realizado el estudio microbiológico del aire, se determinó que la cantidad de aerobios mesófilos presentes en el ambiente es de 185 UFC/placa de PCA equivalente a  $14,8 \times 10^3 / m^3$  y 165 UFC/placa de Agar Sangre equivalente a  $13,2 \times 10^3 / m^3$ , superando en gran cantidad los niveles permitidos de aerobios mesófilos presentes en un bioterio cuyo valor oscila entre los 0 – 25UFC/placa que equivale a  $<5 \text{UFC} / m^3$ . Se determinó además que los puntos en donde existe mayor contaminación son los puntos P1 que corresponde al lugar en el que se tienden los limpienes lavados, P2 en el mesón 1 junto al cual se almacena el aserrín y P6 que es el punto con mayor contacto al abrir y cerrar la puerta del bioterio.

## Estanterías

**TABLA 3. Análisis microbiológico de estanterías del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Sitio de muestreo</b>	<b>N°UFC/placa en 24horas</b>	<b>*Rango permitido</b>
Punto 1	12	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 2	16	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 3	12	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 4	32	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 5	16	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 6	44	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 7	36	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 8	28	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 9	44	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 10	36	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 11	36	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 12	60	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 13	36	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 14	20	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 15	28	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 16	16	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 17	36	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 18	24	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 19	24	<5UFC/m <sup>2</sup>
Punto 20	36	<5UFC/m <sup>2</sup>
<b>Promedio</b>	<b>29,6</b> <b>296x10<sup>6</sup>UFC/m<sup>2</sup></b>	<b>&lt;5UFC/m<sup>2</sup></b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>12,4</b>	
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0,42%</b>	

\*Oficina Nacional de Normalización de Cuba.

En la Tabla 3 se observa los resultados del análisis microbiológico realizado a las superficies de las estanterías los mismos que muestran el número de UFC/placa en una dilución  $10^{-6}$  a 24 horas de incubación, obteniéndose  $29,6 \times 10^9$  UFC/m<sup>2</sup>, excediendo por mucho el rango permitido para Aerobios mesófilos, establecido por la Oficina Nacional de Normalización de Cuba en un bioterio que es de  $<5$  UFC/m<sup>2</sup>.

**TABLA 4. Intensidad del Ruido emitido a la estantería 1 del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

Día	Medida en la mañana (09:00)	Medida en la tarde (17:00)	*Rango permitido
1°	57,40 dB	56,35 dB	50 – 70 dB
2°	63,30 dB	63,64 dB	50 – 70 dB
3°	59,25 dB	62,74 dB	50 – 70 dB
4°	58,74 dB	56,81 dB	50 – 70 dB
5°	60,45 dB	57,65 dB	50 – 70 dB
<b>Promedio</b>	<b>59,83 dB</b>	<b>59,44 dB</b>	<b>50 – 70 dB</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>2,23</b>	<b>3,47</b>	
<b>Coficiente de variación</b>	<b>0,04%</b>	<b>0,06%</b>	

\*Canadian Council on Animal Care (CCAC)

**TABLA 5. Intensidad del Ruido emitido a la estantería 2 del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

Día	Medida en la mañana (09:00)	Medida en la tarde (17:00)	*Rango permitido
1°	58,01 dB	57,68 dB	50 – 70 dB
2°	63,70 dB	59,76 dB	50 – 70 dB
3°	58,62 dB	58,87 dB	50 – 70 dB
4°	56,49 dB	55,02 dB	50 – 70 dB
5°	60,32 dB	58,96 dB	50 – 70 dB
<b>Promedio</b>	<b>59,43 dB</b>	<b>58,06 dB</b>	<b>50 – 70 dB</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>2,75</b>	<b>1,85</b>	
<b>Coficiente de variación</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,03%</b>	

\*Canadian Council on animal Care (CCAC)

Se realizó el control del ruido emitido a cada una de las estanterías en las que se alojan animales de experimentación, dicho control se realizó en dos horarios, uno en la mañana cuyo resultado fue de 59,63dB y otro en la tarde cuyo resultado fue de 58,75dB; estos resultados se encuentran dentro de los rangos permitidos que oscilan entre 50 – 70dB.

**TABLA 6. Cantidad de Luz presente en la estantería 1 del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Día</b>	<b>Medida en la mañana (09:00)</b>	<b>Medida en la tarde (17:00)</b>	<b>*Rango permitido</b>
1°	48,77 lux	42, 17 lux	130 – 325 lux
2°	77,03 lux	102,15 lux	130 – 325 lux
3°	32,83 lux	8,46 lux	130 – 325 lux
4°	80,79 lux	18,90 lux	130 – 325 lux
5°	56,77 lux	21,42 lux	130 – 325 lux
<b>Promedio</b>	<b>59,24 lux</b>	<b>37,73 lux</b>	<b>130 – 325 lux</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>19,96</b>	<b>43,31</b>	
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0,34%</b>	<b>1,15%</b>	

\*Canadian Council on Animal Care (CCAC)

**TABLA 7. Cantidad de Luz presente en la estantería 2 del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Día</b>	<b>Medida en la mañana (09:00)</b>	<b>Medida en la tarde (17:00)</b>	<b>*Rango permitido</b>
1°	52,13 lux	25,38 lux	130 – 325 lux
2°	135,00 lux	34,40 lux	130 – 325 lux
3°	39,27 lux	12,42 lux	130 – 325 lux
4°	67,80 lux	22,67 lux	130 – 325 lux
5°	82,90 lux	24,86 lux	130 – 325 lux
<b>Promedio</b>	<b>75,42 lux</b>	<b>23,95 lux</b>	<b>130 – 325 lux</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>37,12</b>	<b>7,85</b>	
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0,5%</b>	<b>0,3%</b>	

\*Canadian Council on Animal Care (CCAC)

Al realizar el control de la cantidad de luz a la que están expuestos los animales de experimentación tanto en la mañana como en la tarde se obtuvo como resultado 67,33 luxes en la mañana y 30,84 luxes en la tarde, dichos resultados se encuentran dentro del rango permitido para el mantenimiento y producción de animales de experimentación que es de 130 – 325 luxes.

**TABLA 8. Control de la Temperatura del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Día</b>	<b>Medida en la mañana (09:00)</b>	<b>Medida en la tarde (17:00)</b>	<b>*Rango permitido</b>
1°	19 °C	21 °C	18 – 26 °C
2°	18 °C	21 °C	18 – 26 °C
3°	18 °C	21 °C	18 – 26 °C
4°	19 °C	19 °C	18 – 26 °C
5°	19 °C	21 °C	18 – 26 °C
<b>Promedio</b>	<b>18,6 °C</b>	<b>20,6 °C</b>	<b>18 – 26 °C</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0,55</b>	<b>0,90</b>	
<b>Coficiente de variación</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,04%</b>	

\*Canadian Council on Animal Care (CCAC)

Otro de los parámetros físicos determinantes para el mantenimiento óptimo de un bioterio es la temperatura, una vez realizado el control de la misma se obtuvo como resultado en la mañana 18,6°C y en la tarde 20,6°C los mismos que se encuentran dentro del rango permitido que es de 18 – 26°C.

**TABLA 9. Control de Humedad relativa en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Día</b>	<b>Medida en la mañana (09:00)</b>	<b>Medida en la tarde (17:00)</b>	<b>*Rango permitido</b>
1°	56 %	52 %	40 – 70 %
2°	58 %	45 %	40 – 70 %
3°	59 %	54 %	40 – 70 %
4°	54 %	48 %	40 – 70 %
5°	56 %	52 %	40 – 70 %
<b>Promedio</b>	<b>56,6 %</b>	<b>50,2 %</b>	<b>40 – 70 %</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>1,95</b>	<b>3,63</b>	
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,07%</b>	

\*Canadian Council on Animal Care (CCAC)

Al efectuar el control de la Humedad relativa del bioterio de la escuela de Bioquímica y Farmacia se obtuvo como resultado de la medida tomada en la mañana 56,6% de Humedad relativa y en la medida tomada en la tarde 50,2% de Humedad relativa, dichos valores se encuentran dentro del rango permitido que es de 40 – 70% de Humedad relativa.

i. **MICROAMBIENTE**

**TABLA 10. Análisis microbiológico de jaulas existentes en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Sitio de muestreo</b>	<b>N°UFC/placa en 24 horas</b>	<b>*Rango permitido</b>
Jaula 1	3	<5 UFC/m <sup>2</sup>
Jaula 2	11	<5 UFC/m <sup>2</sup>
Jaula 3	8	<5 UFC/m <sup>2</sup>
Jaula 4	2	<5 UFC/m <sup>2</sup>
Jaula 5	0	<5 UFC/m <sup>2</sup>
Jaula 6	1	<5 UFC/m <sup>2</sup>
<b>Promedio</b>	<b>4,17</b> <b>4,17x10<sup>9</sup>UFC/m<sup>2</sup></b>	<b>&lt;5 UFC/m<sup>2</sup></b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>4,35</b>	
<b>Coeficiente de variación</b>	<b>1,04%</b>	

\*Oficina Nacional de Normalización de Cuba.

Como se muestra en la Tabla 10, una vez realizado el análisis microbiológico a las jaulas donde se alojan los animales de experimentación se obtiene como resultado en una dilución 10<sup>-6</sup> a 24 horas de incubación 4,17x10<sup>9</sup>UFC/m<sup>2</sup>; conteaje que excede el rango permitido de aerobios mesófilos presentes en jaulas de animales de experimentación que corresponde a <5UFC/m<sup>2</sup>.

**TABLA 11. Análisis microbiológico de comederos de los animales del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Sitio de muestreo</b>	<b>N° UFC/placa en 24 horas</b>	<b>*Rango permitido</b>
Comedero 1	3	<5 UFC/m <sup>2</sup>
Comedero 2	13	<5 UFC/m <sup>2</sup>
Comedero 3	5	<5 UFC/m <sup>2</sup>
Comedero 4	6	<5 UFC/m <sup>2</sup>
Comedero 5	1	<5 UFC/m <sup>2</sup>
Comedero 6	4	<5 UFC/m <sup>2</sup>
<b>Promedio</b>	<b>5,33x10<sup>6</sup> 5,33x10<sup>9</sup>UFC/m<sup>2</sup></b>	<b>&lt;5 UFC/m<sup>2</sup></b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>4,13</b>	
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0,77%</b>	

\*Oficina Nacional de Normalización de Cuba.

En la Tabla 11, se observan los resultados obtenidos después de haber sido realizado el análisis microbiológico a las comederos en los que se distribuye el alimento de los animales de experimentación, los mismos presentan un resultado en una dilución 10<sup>-6</sup> a 24 horas de incubación de 5,33x10<sup>9</sup>UFC/m<sup>2</sup>; contaje que excede el rango permitido de aerobios mesófilos que corresponde a <5UFC/m<sup>2</sup> según la Oficina Nacional de Normalización de Cuba.

**TABLA 12. Análisis microbiológico del alimento de los animales del Bioterio de la Escuela de Bioquímica de Farmacia.**

Muestra	Análisis	Contaje	*Rango permitido	T°	pH
Pellets en uso	Enterobacterias	MNPC	3x10 <sup>6</sup> UFC/g	20C	7
	Coliformes totales	MNPC	10 UFC/g		
	<i>Escherichia coli</i>	MNPC	10 UFC/g		
	Mohos y Levaduras	13UPC/g	10 UPC/g		
Pellets sellados	Enterobacterias	MNPC	3x10 <sup>6</sup> UFC/g	19C	6.8
	Coliformes totales	MNPC	10 UFC/g		
	<i>Escherichia coli</i>	MNPC	10 UFC/g		
	Mohos y Levaduras	10UPC/g	10 UPC/g		
Pellets comederos (jaulas)	Enterobacterias	MNPC	3x10 <sup>6</sup> UFC/g	20C	6.9
	Coliformes totales	MNPC	10 UFC/g		
	<i>Escherichia coli</i>	MNPC	10 UFC/g		
	Mohos y Levaduras	20UPC/g	10 UPC/g		
Pellets comederos (individuales)	Enterobacterias	MNPC	3x10 <sup>6</sup> UFC/g	19C	6.9
	Coliformes totales	MNPC	10 UFC/g		
	<i>Escherichia coli</i>	MNPC	10 UFC/g		
	Mohos y Levaduras	23UPC/g	10 UPC/g		

\*Canadian Council on Animal Care.

**MNPC:** muy numeroso para contar

Como se puede observar en la tabla 12, el análisis microbiológico se realizó al alimento en uso, alimento sellado y al alimento distribuido en los comederos de las jaulas grupales y de las jaulas individuales, los resultados obtenidos indican que tanto el alimento en uso como el sellado y el distribuido en las diferentes jaulas, presentan enterobacterias MNPC (muy numerosas para contar), coliformes totales MNPC (muy numerosas para contar), *E. coli* MNPC (muy numerosas para contar) variando únicamente en el contenido de mohos y levaduras ya que el alimento en uso presenta 13UPC/g, el alimento sellado 10UPC/g, el alimento distribuido en los comederos de las jaulas grupales 20UPC/g y el alimento distribuido en los comederos de las jaulas individuales 23UPC/g, los mismos que no se encuentran dentro de los parámetros permitidos, convirtiéndose el alimento en un punto crítico de infección y contaminación.

**TABLA 13. Análisis microbiológico del Agua utilizada en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Muestra</b>	<b>Análisis</b>	<b>Contaje UFC/100mL</b>	<b>Rango permitido UFC/100mL*</b>	<b>T°</b>	<b>pH</b>
Agua pozo 1	Aerobios mesófilos	50	30	8C	7.80
	Coliformes totales	11	2		
	Coliformes fecales	ausencia	ausencia		
Agua cisterna	Aerobios mesófilos	160	30	16C	7.97
	Coliformes totales	8	2		
	Coliformes fecales	ausencia	ausencia		
Agua grifo	Aerobios mesófilos	122	30	16C	7.18
	Coliformes totales	7	2		
	Coliformes fecales	ausencia	ausencia		
Agua bebedero	Aerobios mesófilos	160	30	16C	8.57
	Coliformes totales	7	2		
	Coliformes fecales	ausencia	ausencia		

\*Norma INEN 1105.

Como se observa en la Tabla 13 el análisis microbiológico fue realizado en diferentes puntos del sistema de distribución del agua dentro de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, así el Agua del pozo 1 presenta aerobios mesófilos 50UFC/100mL, el agua de la cisterna 160UFC/100mL, el Agua del grifo 122UFC/100mL y el agua de los bebederos 160UFC/100mL, las mismas que se encuentran fuera de los rangos permitidos (30 UFC/100mL); además el 100% de las muestras presentan coliformes totales fuera del rango permitido (2 UFC/100mL) y el 100% de las muestras cumplen con la normativa en cuanto a coliformes fecales ya que estos reportan ausencia de los mismos.

**b. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

**TABLA 14. Control de Peso de *Rattus norvegicus* en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Animal</b>	<b>Peso</b>	<b>*Valor de referencia</b>	
Adultos (8 – 9 meses)	A1	245,5g	300 – 400g
	A2	186,5g	300 – 400g
	A3	234,6g	300 – 400g
	A4	239,4g	300 – 400g
<b>Promedio</b>	<b>226,5g</b>	<b>300 – 400g</b>	
<b>Desviación estándar</b>	<b>27,04</b>		
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0,12%</b>		
Jóvenes (4 meses)	J5	233,1g	200 – 250g
	J6	162,6g	200 – 250g
	J7	274,7g	200 – 250g
<b>Promedio</b>	<b>223,5g</b>	<b>200 – 250g</b>	
<b>Desviación estándar</b>	<b>56,7</b>		
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0,25%</b>		
Destete (1 mes)	D8	73,0g	80 – 100g
	D9	96,3g	80 – 100g
	D10	89,4g	80 – 100g
<b>Promedio</b>	<b>86,2g</b>	<b>80 – 100g</b>	
<b>Desviación estándar</b>	<b>12,0</b>		
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0,14%</b>		

\*Quezada Abraham "Introducción al Manejo de Animales de Laboratorio"

En la Tabla 14 se observa el control del peso por grupos etarios realizado a los animales de experimentación, dicho control indica que los animales de experimentación adultos (8 – 9 meses) presentan un peso promedio de 226,5g, dicho valor se encuentra por debajo del valor mínimo de referencia que es de 300 – 400g; los animales de experimentación jóvenes (4 meses) presentan un peso promedio de 223,5g el mismo que se encuentra dentro del valor de referencia que es de 200 – 250g y los animales de experimentación de destete (1 mes) presentan un peso promedio de 86,2g el cual se encuentra dentro del valor de referencia que corresponde a 80 – 100g.

**TABLA 15. Identificación de Ectoparásitos presentes en *Rattus norvegicus* en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Animal</b>	<b>Parásitos</b>	<b>Cantidad</b>	
Adultos (8 – 9 meses)	A1	NP	–
	A2	NP	–
	A3	NP	–
	A4	NP	–
Jóvenes (4 meses)	J5	NP	–
	J6	NP	–
	J7	NP	–
Destete (1 mes)	D8	Ácaros	2 / placa
	D9	Ácaros	1 / placa
	D10	NP	–
<b>Prevalencia</b>	<b>Ácaros</b>	<b>20%</b>	
	<b>NP</b>	<b>80%</b>	

**NP:** no se encontró parásitos en la muestra.

Como se observa en la Tabla 15 se efectuó el análisis de ectoparásitos presentes en la piel de los animales de experimentación, por grupos etarios, se observó la presencia de ácaros en el 20% de la población, los mismos que únicamente se encontraron en los animales de destete.

**TABLA 16. Identificación de Endoparásitos presentes en *Rattus norvegicus* en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

Animal	Parásitos	Cantidad	
Adultos (8 – 9 meses)	A1	Quistes de <i>Giardia lamblia</i> Larvas de <i>Estrongiloides estercoralis</i>	num esc
	A2	Quistes de <i>Giardia lamblia</i>	alg
	A3	Huevos de <i>Enterobius vermicularis</i> Huevos de <i>Trichuris trichiura</i>	esc esc
	A4	NP	-
Jóvenes (4 meses)	J5	NP	-
	J6	NP	-
	J7	NP	-
Destete (1 mes)	D8	NP	-
	D9	Quistes de <i>Giardia lamblia</i>	esc
	D10	NP	-
<b>NP (60%)</b>		-	
<b>Prevalencia</b>	<b>PARÁSITOS (40%)</b>	<b>QGL</b>	<b>30%</b>
		<b>LSS</b>	<b>10%</b>
		<b>HEV</b>	<b>10%</b>
		<b>HTT</b>	<b>10%</b>

**NP:** no se encontró parásitos en la muestra.

**QGL:** Quistes de *Giardia lamblia*

**LSS:** Larvas de *Estrongiloides estercoralis*

**HEV:** Huevos de *Enterobius vermicularis*

**HTT:** Huevos de *Trichuris trichiura*

**esc:** escasos

**alg:** algunos

**num:** numerosos

Como muestra la tabla 16, una vez efectuado el análisis coproparasitario en la muestra del contenido cecal, se pudo evidenciar que el 60% de la población se encuentra libre de parásitos y el 40% de la población registra presencia de los mismos; dentro de la población parasitada se pudo determinar la presencia de quistes de *Giardia lamblia* en el 30% de la población hallándose en el grupo de animales adultos y de destete, sin embargo la presencia de estos parásitos es considerada típica en roedores, se determinó también la presencia de larvas de *Estrongiloides estercoralis* en el 10% de la población, huevos de *Enterobius vermicularis* en el 10% de la población y huevos de

*Trichuris trichiura* en el 10% de la población, estos parásitos fueron hallados únicamente en el grupo de animales adultos.

**TABLA 17. Biometría Hemática por grupos etarios de *Rattus norvegicus* en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

Animales	Parámetro	Valor obtenido	*Valor de referencia
<b>ADULTOS (8-9 meses)</b>	Glóbulos blancos (WBC)	10,68 x10 <sup>3</sup> /μL	4,0 - 12,0x10 <sup>3</sup> /μL
	Glóbulos rojos (RBC)	9,68 x10 <sup>6</sup> /μL	7,2 - 9,6x10 <sup>6</sup> /μL
	Hemoglobina (HGB)	19,25 g/dL	12 - 18 g/dL
	Hematocrito (HCT)	56,7%	35 - 45%
	Plaquetas (PLT)	626 250/mm <sup>3</sup>	26000 - 140000/mm <sup>3</sup>
<b>JÓVENES (4 meses)</b>	Glóbulos blancos (WBC)	7,05 x10 <sup>3</sup> /μL	4,0 - 12,0x10 <sup>3</sup> /μL
	Glóbulos rojos (RBC)	9,9 x10 <sup>6</sup> /μL	7,2 - 9,6x10 <sup>6</sup> /μL
	Hemoglobina (HGB)	18,3 g/dL	12 - 18 g/dL
	Hematocrito (HCT)	55,7%	35 - 45%
	Plaquetas (PLT)	539 666,6/mm <sup>3</sup>	26000 - 140000/mm <sup>3</sup>
<b>DESTETE (1 mes)</b>	Glóbulos blancos (WBC)	1,82 x10 <sup>3</sup> /μL	4,0 - 12,0x10 <sup>3</sup> /μL
	Glóbulos rojos (RBC)	7,94 x10 <sup>6</sup> /μL	7,2 - 9,6x10 <sup>6</sup> /μL
	Hemoglobina (HGB)	17,1 g/dL	12 - 18 g/dL
	Hematocrito (HCT)	48,6%	35 - 45%
	Plaquetas (PLT)	804 000/mm <sup>3</sup>	26000 - 140000/mm <sup>3</sup>

\*Canadian Council on Animal Care (CCAC)

Como se observa en la Tabla 17 una vez realizado el análisis de sangre se estableció que los animales adultos presentaron un promedio de 10,68x10<sup>3</sup>/μL Glóbulos blancos; 9,68x10<sup>6</sup>/μL Glóbulos rojos, ambos encontrándose dentro del valor de referencia; 19,25g/dL de Hemoglobina; 56,7% de Hematocrito y 626 250/mm<sup>3</sup> Plaquetas, dichos valores se encuentran sobre el límite superior del valor de referencia. Los animales de experimentación jóvenes presentan un promedio de 7,05x10<sup>3</sup>/μL Glóbulos blancos; 9,9x10<sup>6</sup>/μL Glóbulos rojos; 18,3g/dL de Hemoglobina, los mismos que se encuentran dentro del valor de referencia; 55,7% de Hematocrito y 539 666,6/mm<sup>3</sup> Plaquetas,

dichos valores se encuentran sobre el límite superior del valor de referencia y los animales destete presentan un promedio de  $1,82 \times 10^3/\mu\text{L}$  Glóbulos blancos;  $7,94 \times 10^6/\mu\text{L}$  Glóbulos rojos; 17,1g/dL de Hemoglobina, dichos valores los mismos que se encuentran dentro del valor de referencia; 48,6% de Hematocrito y  $804\ 000/\text{mm}^3$  Plaquetas, ambos valores encontrándose sobre el límite superior del valor de referencia.

**TABLA 18. Fórmula Leucocitaria por grupos etarios de *Rattus norvegicus* en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

Animales	Célula	Porcentaje	*Valor de referencia
ADULTOS (8-9 meses)	Neutrófilos	42,8	6 – 25%
	Linfocitos	54,5	73 – 90%
	Eosinófilos	0,25	1 – 4%
	Monocitos	2,5	1 – 8%
	Basófilos	0	1%
JÓVENES (4 meses)	Neutrófilos	35,6	6 – 25%
	Linfocitos	63,6	73 – 90%
	Eosinófilos	0	1 – 4%
	Monocitos	0,6	1 – 8%
	Basófilos	0	1%
DESTETE (1 mes)	Neutrófilos	30,3	6 – 25%
	Linfocitos	68,6	73 – 90%
	Eosinófilos	0	1 – 4%
	Monocitos	1	1 – 8%
	Basófilos	0	1%

\*Quezada Abraham "Introducción al Manejo de Animales de Laboratorio"

Como se puede observar en la Tabla 18 al realizar el conteo de la Fórmula leucocitaria en los animales adultos se encontró que presentan un promedio de 42,8% de Neutrófilos los mismos que se encuentran sobre el valor de referencia que es de 6 – 25%; 54,5% de Linfocitos, 0,25% de Eosinófilos; 2,5% de Monocitos y 0% de Basófilos, las mencionadas células se encuentran dentro de los valores de referencia especificadas para cada una de ellas, en los animales jóvenes, presentan un promedio de 35,6% de Neutrófilos los mismos que se encuentran sobre el valor de referencia que es de 6 – 25%; 63,6% de Linfocitos, 0% de Eosinófilos; 0,6% de Monocitos y 0% de Basófilos, dichas células se encuentran dentro de los valores de referencia y en animales de destete se estableció que existe un promedio de 30,3% de Neutrófilos los

mismos que se encuentran sobre el valor de referencia que es de 6 – 25%; 68,6% de Linfocitos, 0% de Eosinófilos; 1% de Monocitos y 0% de Basófilos, las mencionadas células se encuentran dentro de los valores de referencia especificadas para cada una de ellas.

**TABLA 19. Microorganismos presentes en *Rattus norvegicus* del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia**

<b>Animal</b>	<b>Microorganismo</b>
Adultos (8 – 9 meses)	A1 <i>Candida albicans</i> <i>Streptococcus no grupo A</i> <i>Yersinia enterocolítica</i>
	A2 <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
	A3 <i>Escherichia coli</i>
	A4 <i>Escherichia coli</i>
Jóvenes (4 meses)	J5 <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i>
	J6 <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Yersinia enterocolítica</i>
	J7 <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter gergoviae</i>
Destete (1 mes)	D8 <i>Streptococcus no grupo A</i>
	D9 <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
	D10 <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus no grupo A</i>
<b>Prevalencia</b>	<b><i>Candida albicans</i> 50%</b>
	<b><i>Escherichia coli</i> 80%</b>
	<b><i>Streptococcus no grupo A</i> 30%</b>
	<b><i>Enterobacter gergoviae</i> 10%</b>
	<b><i>Proteus mirabilis</i> 10%</b>
	<b><i>Enterobacter cloacae</i> 20%</b>
	<b><i>Yersinia enterocolítica</i> 20%</b>

En la Tabla 19 se puede observar los resultados del análisis microbiológico realizado a cada uno de los animales de experimentación, los mismos que revelan que el 100% de los animales presentan por lo menos un tipo de microorganismo, entre los microorganismos hallados tenemos *Cándida albicans* en el 50% de la población total, *Escherichia coli* en el 80% de la población total, *Streptococcus no grupo A* en el 30% de la población total, *Proteus mirabilis* en el 10% de la población total, *Enterobacter cloacae* en el 20% de la población total y *Yersinia enterocolítica* en el 20% de la población total. Es necesario recalcar que la presencia de estos microorganismos en animales de experimentación no es normal, a excepción de *Escherichia coli*.

## CAPÍTULO IV

### 11. CONCLUSIONES

1. Durante el período de Noviembre 2009 y Abril 2010 se realizó el análisis de los Factores ambientales, tanto macroambientales (aire, estanterías, luz, ruido, humedad relativa y temperatura) como microambientales (jaulas, comederos, agua y alimento) que influyen directamente en el estado físico y microbiológico de los animales de experimentación (*Rattus norvegicus*) que se alojan en el bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, en el mismo se logró determinar que los factores microambientales particularmente el alimento, no cumplen con los parámetros exigidos por organizaciones encargadas de vigilar el buen manejo y mantenimiento de animales de experimentación; pues los mismos se hallan altamente contaminados microbiológicamente, lo que influye en una deficiente calidad sanitaria de los animales.
2. El análisis realizado a cada uno de los factores macroambientales físicos; temperatura, humedad relativa, luz y ruido se encuentran dentro de los rangos permitidos que han sido normados por el Canadian Council on Animal Care/Consejo Canadiense de Cuidado Animal, siendo estos, 19,6°C para la temperatura; 53,4% de Humedad relativa; 30,84 – 67,33 luxes que oscilan dentro de este rango entre la mañana y la tarde y 58,75 – 59,63dB de ruido entre la mañana y la tarde, contribuyendo a un alojamiento admisible de los animales de experimentación. Según las Tablas N<sup>4</sup>, 5, 6, 7, 8 y 9.
3. El resultado del análisis microbiológico del aire y de las estanterías,  $14 \times 10^3 \text{UFC/m}^3$  y  $296 \times 10^6 \text{UFC/m}^2$  respectivamente, exceden en gran cantidad los rangos permitidos por la Oficina Nacional de Normalización de Cuba ( $<5 \text{UFC/m}^3$  para el aire y  $<5 \text{UFC/m}^2$  para las estanterías), lo que revela una gran carga microbiana producto del deficiente sistema de ventilación y circulación del aire además de la inadecuada limpieza y sanitización de las estanterías y superficies del bioterio. Según las Tablas N<sup>2</sup> y 3.

4. El análisis microbiológico de los factores microambientales, jaulas y comederos;  $4,17 \times 10^9$  UFC/m<sup>2</sup> y  $5,33 \times 10^9$  UFC/m<sup>2</sup> respectivamente, superan los niveles permitidos de aerobios mesófilos según la Oficina Nacional de Normalización de Cuba (<5UFC/m<sup>2</sup> para jaulas y comederos), lo que indica una vez más que el método, los utensilios y las sustancias de limpieza utilizadas durante el aseo del bioterio son insuficientes o incluso deficientes, constituyéndose estos, en puntos de control inmediato ya que los animales tienen contacto directo con los mismos. Como muestran las Tablas N°10 y 11.
  
5. El análisis microbiológico realizado a cada una de las muestras de agua tomadas de distintos puntos de la red de distribución de la misma dentro de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Pozo 1, cisterna, grifo, bebederos), presenta Aerobios mesófilos entre 122 – 160UFC/100mL cuando el rango permitido señala 30UFC/100mL lo que indica que el 100% de las muestras no cumple con la normativa, presenta también Coliformes totales entre 2 – 11UFC/100mL cuando el rango permitido señala 2UFC/100mL lo que indica que únicamente el 25% de las muestras se encuentra dentro del rango permitido, finalmente el 100% de las muestras registran ausencia de Coliformes fecales coincidiendo con lo establecido en la Norma INEN 1105. Es importante destacar que las muestras que reportan mayor contaminación son las de la cisterna y de los bebederos, lo que indica un incorrecto método de almacenamiento y deficiente limpieza de los mismos. Según la Tabla N°13.
  
6. El análisis microbiológico realizado a las diferentes muestras de alimento (pellets en uso, pellets sellados, pellets distribuidos en los comederos de jaulas grupales, pellets distribuidos en los comederos de jaulas individuales) reportan Enterobacterias MNPC (muy numerosas para contar) siendo su rango permitido de  $3 \times 10^6$  UFC/g, Coliformes totales MNPC siendo su rango permitido 10UFC/g, *E. coli* MNPC siendo su rango permitido 10UFC/g, Mohos y Levaduras entre 10 - 13UFC/g siendo su rango permitido 10UFC/g ; lo que indica que el 100% de las muestras no cumple con los rangos normados por el Canadian Council on Animal Care en cuanto a Enterobacterias, Coliformes totales y *E. coli*, mientras que para Mohos y levaduras sólo el 25% de las muestras cumplen con la normativa. Estos exagerados niveles de microorganismos revelan que la ingesta de este alimento constituye un foco infeccioso para los animales de experimentación y además

deja ver el defectuoso almacenamiento y manejo que se da al alimento. Según la Tabla N°12.

7. El control de peso por grupos etarios a los animales de experimentación demuestran que los animales adultos presentan un peso promedio de 226,5g el mismo que se encuentra por debajo del valor de referencia de 300 – 400g, esto se atribuye a la edad de los animales adultos, pues los mismos tenían 9 meses de edad, los jóvenes 223,5g y los de destete 86,2g los cuales se encuentran dentro del valor de referencia especificado para cada uno de ellos. Según la Tabla N°14.
8. El análisis de ectoparásitos en la piel de los animales de experimentación registra la presencia de ácaros en el 20% de la población total de ratas y el análisis de endoparásitos en muestras de contenido cecal demuestra que el 60% de los animales de experimentación investigados se encuentran libres de parásitos, mientras que el 40% de los mismos se encuentran parasitadas, los animales parasitados presentan quistes de *Giardia lamblia* en un 30%, larvas de *Estrongiloides estercoralis* en un 10%, huevos de *Enterobius vermicularis* en un 10% y huevos de *Trichuris trichiura* en un 10%. El análisis microbiológico en muestras de secreción faríngea y del contenido cecal evidencian que el 100% de los animales posee por lo menos un tipo de microorganismo, entre los que se encuentran *Candida albicans* en un 50%, *Escherichia coli* en un 80%, *Streptococcus no grupo A* en un 30%, *Enterobacter gergoviae* en un 10%, *Proteus mirabilis* en un 10%, *Enterobacter cloacae* en un 20% y *Yersinia enterocolítica* en el 20% de la población total. Con estos resultados se puede verificar el estado general del bioterio ya que los factores macroambientales y microambientales inciden en el contenido microbiológico de los animales de experimentación, por esto es necesario primero mejorar los factores ambientales del bioterio y cumplir juiciosamente las normas de bioseguridad estipuladas. Según las Tablas N°15, 16 y 19.
9. El control sanitario de los animales de experimentación *Rattus norvegicus* del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH, indica que el manejo y cuidado que el personal y los estudiantes dan a cada una de las áreas de producción y mantenimiento deben ser mejoradas siguiendo los parámetros

establecidos por los organismos internacionales responsables del cuidado y la vigilancia del manejo de animales de laboratorio, para que de esta manera los resultados que se obtengan del estudio de los mismos sean favorables, confiables y reproducibles.

- 10.** Se elaboró el “Manual para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio (Ratas)” el mismo que pretende promover el trato humanitario de los animales y el mejoramiento en la calidad de la enseñanza e investigación en los que dichos animales son utilizados, el documento está basado en un sin número de normas y reglamentos internacionales vigentes.

## **CAPÍTULO V**

### **12. RECOMENDACIONES**

1. Es urgente la readecuación de la infraestructura del bioterio para mejorar y controlar los factores ambientales que influyen directamente en el mantenimiento y producción de los animales de experimentación.
2. La Facultad de Ciencias y la Escuela de Bioquímica y Farmacia son los responsables del buen funcionamiento del bioterio, razón por la cual es necesaria la conformación de un comité que elabore un reglamento interno y sea el encargado de normar protocolos y manejo de los bienes materiales y biológicos del mismo.
3. La capacitación y la suficiente formación del personal responsable del manejo de los animales de experimentación es de vital importancia para lograr una mejor enseñanza y el mejoramiento continuo de la calidad de métodos y protocolos.
4. Planear la formulación y elaboración de un balanceado que cumpla con las normativas nutricionales y microbiológicas exigidas por los organismos internacionales, para evitar de esta manera una ingesta de alimento contaminado y de mala calidad.
5. Aplicar los criterios que se señalan en el “Manual para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (Ratas)” que se anexa en este documento con el fin de mejorar el uso, cuidado, mantenimiento y producción de los animales.
6. Realizar un control sanitario periódico de los factores ambientales y de los animales de experimentación para determinar su estado, una vez que se han cumplido y aplicado las especificaciones dadas en el “Manual para Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (Ratas)”

## CAPÍTULO VI

### 6.1. RESUMEN

La Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, cuenta con un bioterio que se ha creado con el fin de mejorar el proceso enseñanza-aprendizaje a través de la investigación, utilizando animales de laboratorio que cumplan con estándares internacionales de calidad. El objetivo de esta investigación es determinar parámetros de Buenas Prácticas de Producción (BPP) de *Rattus norvegicus* mediante la realización de ensayos físicos y microbiológicos, tanto en animales de experimentación como en su ambiente. Se analizó los factores microambientales como estanterías, jaulas, comederos, alimento y agua; y macroambientales como aire, temperatura, humedad, intensidad de luz y ruido, durante el período Noviembre 2009 – Abril 2010. El análisis microbiológico demostró que el aire excede el rango permitido de menos de 5UFC/m<sup>3</sup> de aerobios mesófilos, mientras que el análisis físico de temperatura, humedad, intensidad de luz y ruido, revela que dichos parámetros cumplen con los requisitos especificados por la Oficina Nacional de Normalización de Cuba para factores macroambientales. El análisis microbiológico de los factores microambientales demuestra que el contenido microbiano de jaulas, comederos y estanterías excede el rango permisible de menos de 5UFC/m<sup>2</sup> de aerobios mesófilos, indica además que el alimento en los ensayos para enterobacterias, coliformes totales, mohos/levaduras y *E. coli*, presenta un contenido de bacterias Muy Numeroso Para Contar (MNPC); también muestra que el agua no cumple con los requisitos en cuanto a presencia de aerobios mesófilos y coliformes totales, sin embargo cumple con el requisito de ausencia de coliformes fecales según la Norma INEN 1105. El análisis microbiológico de los animales de laboratorio evidencia que; el 20% de los animales presenta ectoparásitos y el 40% presenta endoparásitos como quistes de *Giardia lamblia* 30%, larvas de *Estrongiloides estercoralis* 10%, huevos de *Enterobius vermicularis* 10% y huevos de *Trichuris trichiura* 10%. El análisis de secreción faríngea y contenido cecal revela que el 100% de los animales posee por lo menos un tipo de microorganismo como, *Candida albicans* 50%, *Escherichia coli* 80%, *Streptococcus no grupo A* 30%, *Enterobacter gergoviae* 10%, *Proteus mirabilis* 10%, *Enterobacter cloacae* 20% y *Yersinia enterocolítica* 20%. La determinación de BPP de *Rattus norvegicus*, demostró que el manejo y cuidado del personal en cada una de las áreas de producción y mantenimiento deben ser mejoradas siguiendo los parámetros establecidos por los organismos internacionales.

## 6.2. SUMMARY

The Biochemistry and Pharmacy School at the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo have an animal facility created with the purpose to improve the learning-teaching process through the research. Using lab-animals with International standard. The objective of this research is to determine parameters of good production practices (PGP) of *Rattus norvegicus* through the physical and microbiological test. Both experimental animals and its environment. Microenvironmental factors were analyzed such as: jails, feeders, food and water; and macroenvironmental such as air, temperature, humidity, light intensity and noise, during November 2009 – April 2010. The microbiological analysis showed the air exceeds the permitted range of minus 5UFC/m<sup>3</sup> of mesophilic aerobes, while the temperature physical analysis, humidity, light intensity and noise, explain the parameters fulfill with the specified requirements for the National Normalization Office from Cuba for macroenvironmental factors. The microbiological analysis of the microenvironmental factors show the containing Microbial in jails, feeders and shelves exceeds the permitted range of minus 5UFC/m<sup>2</sup> of mesophilic aerobes, indicating the food in the tests for enterobacteriaceae, total coliforms, mould/yeast and *E. coli* show a content Very Numerous Bacteria to Count (VNBC); also shows the water does not fulfill with the specified requirements in mesophilic aerobes and total coliforms, however comply with the fecal-coliform absence requirement according to INEN Standard 1105. The laboratory-animals microbiological analysis showed; 20% of the animals have ectoparasites and 40% endoparasites such as *Giardia lamblia* cysts 30%, *Estrongiloides estercoralis* larvae 10%, *Enterobius vermicularis* eggs 10% and *Trichuris trichiura* eggs 10%. The pharyngeal secretion analysis and cecum content show 100% of the animals have at least a type of microorganism such, *Candida albicans* 50%, *Escherichia coli* 80%, non-group A *Streptococcus* 30%, *Enterobacter gergoviae* 10%, *Proteus mirabilis* 10%, *Enterobacter cloacae* 20% and *Yersinia enterocolitica* 20%. The PGP *Rattus norvegicus* determination, shows the management and personnel care in each production and maintenance area should be improved following the established parameters for International organizations.

## CAPÍTULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍA

#### 7.1. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

1. ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA. 1996. Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio. ILAR (Institute of Laboratory Animal Resource). National Research Council. Washington – USA, National Academy Press. 203p.
2. ALVAREZ, M; y otros. 1995. Manual de Técnicas en Microbiología Clínica.; 2ª Ed, Quito – Ecuador, Graficart. pp. 30-76; 100-180.
3. ANIMALES COMO MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN  
[http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp\\_468.htm](http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_468.htm)  
2009-01-11
4. BIOTERIO  
[http://www.cibnor.mx/servicios/dat/labs/elabmu.php?LAB\\_CLAVE=10086  
&FUNC=INFO\\_GEN](http://www.cibnor.mx/servicios/dat/labs/elabmu.php?LAB_CLAVE=10086&FUNC=INFO_GEN)  
2009-01-11
5. BIOTERIO  
[http://64.233.169.104/search?q=cache:N\\_8y2Fr34\\_4J:www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-3/modelo.pdf+Qu%C3%A9+es+macroambiente+\(ratas\)&hl=es&ct=clnk&cd=7&gl=ec&lr=lang\\_es](http://64.233.169.104/search?q=cache:N_8y2Fr34_4J:www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-3/modelo.pdf+Qu%C3%A9+es+macroambiente+(ratas)&hl=es&ct=clnk&cd=7&gl=ec&lr=lang_es)  
2009-01-11
6. CAGLIADA P. 2007. Importancia del Uso de los Animales de Laboratorio Estandarizados. Presentación Magistral. Argentina. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias.
7. CANADIAN Council on Animal Care. 1993. Categories of Invasiveness in Animal Experiments. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Appendix SV-B. Canadá.  
<http://www.wspa-international.org/news/archive/oldnews62.html>

8. CODE OF FEDERAL REGULATIONS. 1990. Title 9 (Animals and Animal Products) subchapter A. Animal Welfare parts 1, 2, 3. US Government Printing Office. Washington D.C.  
[http://64.233.169.104/search?q=cache:c35v\\_EMABTsJ:investigacion.us.es/cetico/Directrices\\_para\\_animales.pdf+norvegicus+rattus\(laboratorio\)&hl=es&ct=clnk&cd=30&gl=ec](http://64.233.169.104/search?q=cache:c35v_EMABTsJ:investigacion.us.es/cetico/Directrices_para_animales.pdf+norvegicus+rattus(laboratorio)&hl=es&ct=clnk&cd=30&gl=ec)
9. COOK W. 1966. Report of the Special Committee on the Care and Use of Experimental Animals appointed by the National research Council. Ottawa.  
<http://www.eurca.org/>
10. DÁVILA, AG; ZÚÑIGA JM. 2001. Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal. Madrid - España, McGraw Hill. pp. 3-22.
11. DECLARACIÓN UNIVERSAL PARA EL BIENESTAR ANIMAL  
<http://www.wspa-international.org/news/archive/oldnews62.html>  
2010-07-19
12. DIRECTRICES ÉTICAS Y LEGISLACIÓN PARA LA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES DE LABORATORIO  
[http://64.233.169.104/search?q=cache:c35v\\_EMABTsJ:investigacion.us.es/cetico/Directrices\\_para\\_animales.pdf+norvegicus+rattus\(laboratorio\)&hl=es&ct=clnk&cd=30&gl=ec](http://64.233.169.104/search?q=cache:c35v_EMABTsJ:investigacion.us.es/cetico/Directrices_para_animales.pdf+norvegicus+rattus(laboratorio)&hl=es&ct=clnk&cd=30&gl=ec)  
2008-01-11
13. EL MODELO ANIMAL EN LAS INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
<http://www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-3/modelo.pdf>  
2008-01-11
14. EL NUEVO BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL  
<http://www.invdes.com.mx/anteriores/Julio2000/htm/bioterio.html>  
2008-01-11
15. ELABORACIÓN DE UN CONCENTRADO PARA RATA PARA SU MANUTENCIÓN EN EL LABORATORIO  
<http://www.monografias.com/trabajos36/nutricion-rata-laboratorio/nutricion-rata-laboratorio.shtml>  
2010-12-09
16. ESTÁNDAR MÍNIMO QUE HA REVOLUCIONADO LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES LIBRES DE ENFERMEDADES

<http://www.monografias.com/trabajos42/animales-de-laboratorio/animales-de-laboratorio2.shtml>

2009-01-11

17. ÉTICA Y BIENESTAR ANIMAL

<http://www.eurca.org/>

2010-07-05

18. EVALUACIÓN DE LA BIOMETRÍA HEMÁTICA EN LA RATA DE LABORATORIO

[http://books.google.com.ec/books?id=RacLQWr2\\_JoC&pg=PT34&lpg=PT34&dq=par%C3%A1metros+hematol%C3%B3gicos+normales\(rattus+norvegicus\)&source=bl&ots=OdkwbtNr3V&sig=CkvpceZB0fQfahuAkCAromEMtkk&hl=es&ei=z1oBTcOeKML88AaXsKnqAg&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=5&ved=0CDUQ6AEwBA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=RacLQWr2_JoC&pg=PT34&lpg=PT34&dq=par%C3%A1metros+hematol%C3%B3gicos+normales(rattus+norvegicus)&source=bl&ots=OdkwbtNr3V&sig=CkvpceZB0fQfahuAkCAromEMtkk&hl=es&ei=z1oBTcOeKML88AaXsKnqAg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=5&ved=0CDUQ6AEwBA#v=onepage&q&f=false)

2010-12-10

19. FUNDACIÓN DEL PRIMER BIOTERIO MPF FUNCIONAL EN COLOMBIA

[http://64.233.169.104/search?q=cache:AcemeWbE2DEJ:medicina.udea.edu.co/Publicaciones/iatreia/Vol16%2520No2%2520Jun%25202003/Art.1.pdf+Bioterio\(Macroambiente\)&hl=es&ct=clnk&cd=4&gl=ec&lr=lang\\_es](http://64.233.169.104/search?q=cache:AcemeWbE2DEJ:medicina.udea.edu.co/Publicaciones/iatreia/Vol16%2520No2%2520Jun%25202003/Art.1.pdf+Bioterio(Macroambiente)&hl=es&ct=clnk&cd=4&gl=ec&lr=lang_es)

2009-01-11

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

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

2009-05-13

21. HISTORIA NATURAL DE LA RATA DE LABORATORIO

[http://www.ratlife.org/Home/1General-sections/Languages/Spanish\\_Script.htm](http://www.ratlife.org/Home/1General-sections/Languages/Spanish_Script.htm)

2010-03-20

22. INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. International Standardized Nomenclature for Outbred Stocks of Laboratory Animals. ILAR News. USA. Bulletin N° 30. pp. 6-11. March 1972.

23. LA ALERGIA EN LOS BIOTERIOS: Un riesgo siempre presente

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

2010-03-20

24. LA RATA DE LABORATORIO

<http://www.cinvestav.mx/Portals/0/Publicaciones%20y%20Noticias/Revistas/Avance%20y%20perspectiva/julsep04/6%20rata.pdf>  
2010-03-20

25. LA RATA EN LA CULTURA POPULAR  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Rata>  
2010-02-09
26. LAWSON, P. 1999. Manual de Entrenamiento de la Asociación Americana de las Ciencias del Animal de Laboratorio (ALAT). Chelsea - MI - USA. Sheridan Books. 243p.
27. MANEJO, ALOJAMIENTO Y MEDIO AMBIENTE DE LOS ANIMALES  
[http://books.nap.edu/openbook.php?record\\_id=10929&page=24](http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=10929&page=24)  
2010-02-09
28. MRAD DE OSORIO, A; ROSENKRANZ, A. 1990. Guía para el Uso de Animales de Laboratorio. Parte I. Bogotá – Colombia, Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. pp. 4-65.
29. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Principles for the Care and Use of Animals Used in Testing, Research and Education. Committee on Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources News. 1985. USA. DHEW publication N<sup>o</sup>(NIH) 86-23. pp. 81-83. June 1992.
30. NOMURA, T. Progresos y Perspectiva en la Experimentación Animal. Revista Experimentación Animal. Kawasaki-Japón. Volumen I, N<sup>o</sup>1. pp. 15-19. April 1990.
31. NOMURA, T; y otros. 1984. Manual for Genetic Monitoring of Inbred Mice. Tokio, University of Tokio Press. 187p.
32. PRÁCTICAS ESPECIALES  
[http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/GUIDES/SPANISH/V1\\_93/CHAP/CHVII.HTM](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/SPANISH/V1_93/CHAP/CHVII.HTM)  
2010-02-09
33. PRINCIPIOS BÁSICOS PARA EL 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=28&gl=ec>

- 2010-02-09
34. PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES PARA LA EXPERIMENTACIÓN  
<http://europa.eu/scadplus/leg/es/lvb/l28104.htm>  
2010-02-09
35. ¿QUÉ ES UN BIOTERIO?  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Bioterio>  
2010-05-23
36. QUEZADA DOMÍNGUEZ, A. 1997. Salud Animal – Introducción al Manejo de Animales de Laboratorio: Roedores y Especies Pequeñas. Mérida, Universidad Autónoma de Yucatán. 201p.
37. RATA NORUEGA  
<http://alaquairum.foros.ws/t120/rata-noruega-rattus-norvegicus/>  
2010-05-23
38. *Rattus norvegicus*  
[http://www.mma.es/secciones/biodiversidad/inventarios/inb/atlas\\_mamiferos/pdf/93\\_roden.pdf](http://www.mma.es/secciones/biodiversidad/inventarios/inb/atlas_mamiferos/pdf/93_roden.pdf)  
2010-05-23
39. *Rattus norvegicus*  
<http://64.233.169.104/search?q=cache:EIX1D2uO0ScJ:www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Rattusnorvegicus00.pdf+norvegicus+rattus&hl=es&ct=clnk&cd=2&gl=ec>  
2010-05-23
40. RIERA, L. 2001.; Control Microbiológico a Roedores de Laboratorio SPF.; Tesis de Maestría. La Habana – Cuba. Facultad de Biología. Universidad de la Habana. 125p.
41. RIERA, L; y otros. Programas de Aseguramiento de la Calidad en la Producción de Animales de Laboratorio. Revista Salud Animal. México DF - México. Volumen 30, N°1. pp. 12-16. Mayo 2008.
42. RODRÍGUEZ, J.C. 2001. Ciencia de los Animales de Laboratorio en Cuba. Retos y Perspectivas en el Siglo XXI. Memorias del II Congreso AMCAL 5-7 diciembre. México. 132p.
43. ROWSELL, H. C. 1967. Report of the feasibility survey on the establishment of a Canadian Council on Animal Care. Association of Universities and Colleges of Canada. Ottawa - Canadá.

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060610.html>

44. SARAVIA GÓMEZ, A. 2005. Manual de Ensayos Toxicológicos y Farmacológicos Experimentales In vivo e In vitro. Guatemala, Universitaria. 619 p.
45. SENASA - Servicio Nacional de Salud Agraria, Servicio Nacional de salud. 2004. La Calidad de los Animales de Laboratorio y su Influencia en las Pruebas de Diagnóstico, Investigación y Control de Calidad. Lima Perú.  
[http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp\\_468.htm](http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_468.htm)
46. SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD Y DE BUENAS PRÁCTICAS EN LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES EXPERIMENTALES PRODUCIDOS EN CONDICIONES CONVENCIONALES  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060610.html>  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>  
2010-07-19
47. ZÚÑIGA, J; y otros. 2001.; Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal. México DF – México, McGraw-Hill Interamericana. 682 p.
48. ZÚÑIGA, JM; y otros. 2001.; Instalaciones y Condiciones Ambientales. Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal. Madrid – España. McGraw Hill. pp. 153 – 178.

## CAPÍTULO VIII

### 8. ANEXOS

#### ANEXO N°1. VISTA EXTERIOR DEL BIOTERIO



*FOTOGRAFÍA 4. Vista exterior del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia*

**ANEXO N°2. VISTA INTERNA DEL BIOTERIO**



*FOTOGRAFÍA 5. Vista interior del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia*

**ANEXO N°3. ALMACENAMIENTO DEL ALIMENTO**



*FOTOGRAFÍA 6. Almacenamiento del alimento de los animales*

#### **ANEXO N°4. ALMACENAMIENTO DEL ASERRÍN**



*FOTOGRAFÍA 7. Almacenamiento del aserrín utilizado para las camas*

#### **ANEXO N°5. ALMACENAMIENTO DE LOS BEBEDEROS**



*FOTOGRAFÍA 8. Almacenamiento de bebederos*

## ANEXO N°6. ANÁLISIS DEL AIRE



*FOTOGRAFÍA 9. Aerobios mesófilos presentes en el aire*

## ANEXO N°7. ANÁLISIS DE JAULAS



*FOTOGRAFÍA 10. Toma de muestra para análisis de jaulas*

## ANEXO N°8. ANÁLISIS DE COMEDEROS



**FOTOGRAFÍA 11.** Toma de muestra para análisis de comederos

## ANEXO N°9. MEDICIÓN DE RUIDO



**FOTOGRAFÍA 12.** Medición del ruido

**FOTOGRAFÍA**

## ANEXO N°10. MEDICIÓN DE LA INTENSIDAD DE LUZ



FOTOGRAFÍA 13. Medición de la intensidad de luz

## ANEXO N°11. SONÓMETRO Y LUXÓMETRO



FOTOGRAFÍA 14. Sonómetro (izquierda) y Luxómetro (derecha)

## ANEXO N°12. ANÁLISIS DE AGUA Y ALIMENTO



*FOTOGRAFÍA 15. Muestras del análisis de alimento y agua*

## ANEXO N°13. CONTROL DE PESO DE LOS ANIMALES



*FOTOGRAFÍA 16. Control del peso de los animales*

#### ANEXO N°14. ANIMAL ANESTESIADO



*FOTOGRAFÍA 17. Anestesia del animal de experimentación*

#### ANEXO N°15. TEST DE GRAHAM



*FOTOGRAFÍA 18. Realización del test de Graham*

## ANEXO N°16. EXTRACCIÓN DE SANGRE



*FOTOGRAFÍA 19. Extracción de sangre por punción cardíaca*

## ANEXO N°17. DISECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN



*FOTOGRAFÍA 20. Disección del animal de experimentación*

### ANEXO N°18. TOMA DE MUESTRA DEL CONTENIDO CECAL



*FOTOGRAFÍA 21. Toma de muestra del contenido cecal*

### ANEXO N°19. MUESTRAS DE SECRECIÓN FARÍNGEA



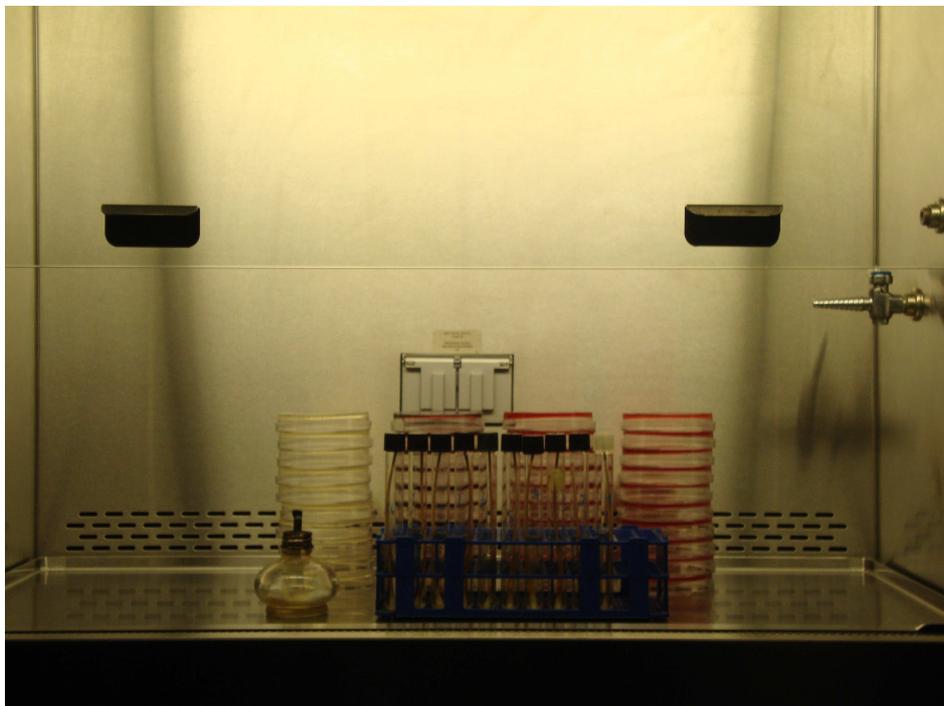
*FOTOGRAFÍA 22. Muestras de secreción faríngea*

## ANEXO N°20. SIEMBRA DE LAS MUESTRAS DE SECRECIÓN FARÍNGEA



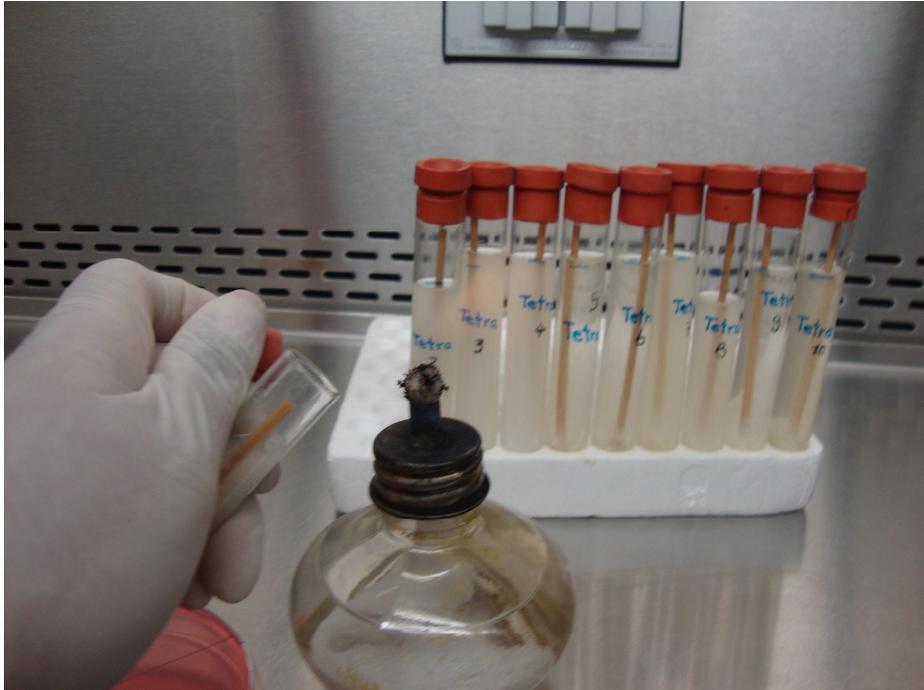
*FOTOGRAFÍA 23. Siembra de muestras de secreción faríngea*

## ANEXO N°21. MUESTRAS EN LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR



*FOTOGRAFÍA 24. Muestras de secreción faríngea en la cámara de flujo laminar*

**ANEXO N°22. SIEMBRA DE LAS MUESTRAS DE CONTENIDO C ECAL**



**FOTOGRA  
FÍA 25.  
Siembra**

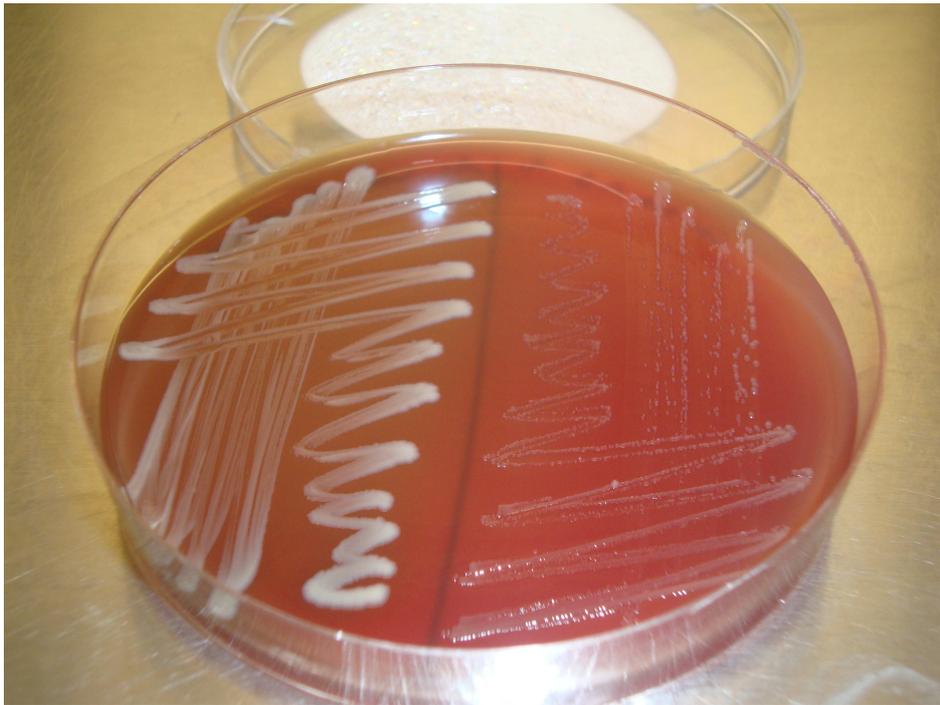
*de las muestras del contenido cecal*

**ANEXO N°23. INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS**



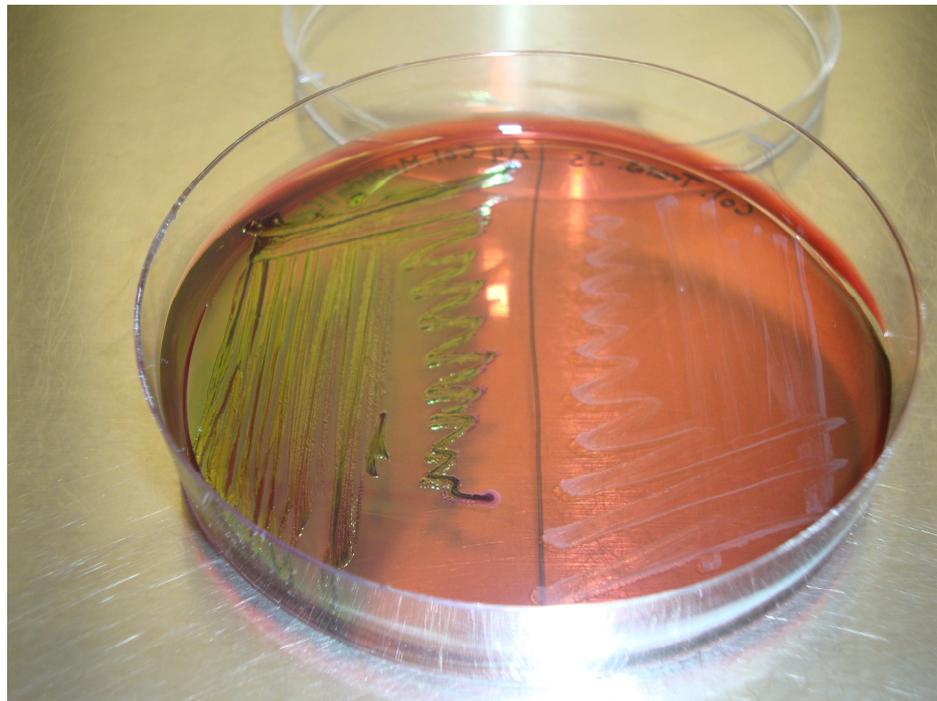
**FOTOGRAFÍA 26. Incubación de las muestras**

**ANEXO N°24. CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN AGAR SANGRE**



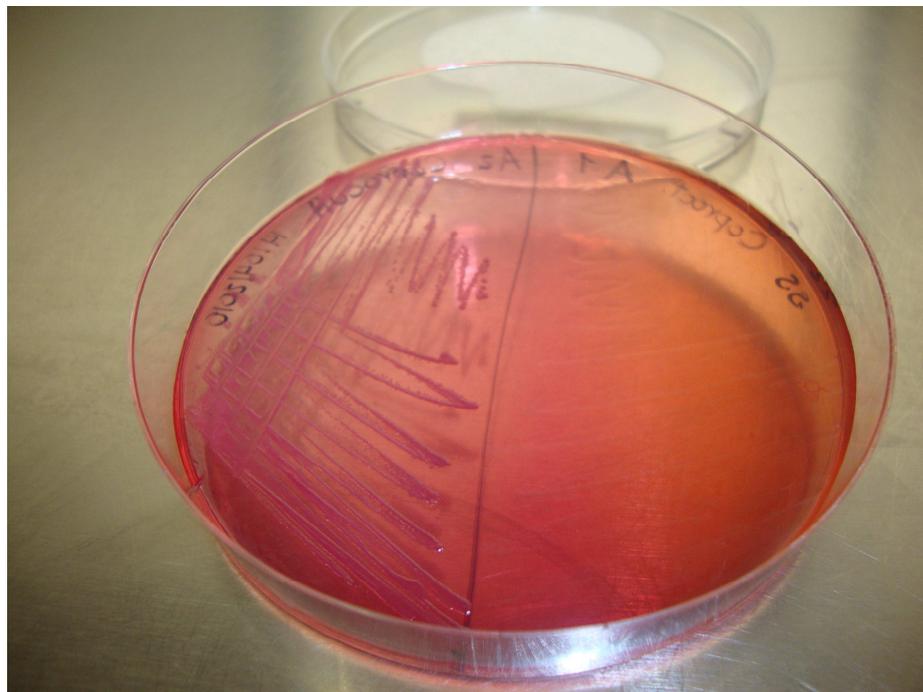
*FOTOGRAFÍA 27. Crecimiento de bacterias en Agar sangre*

**ANEXO N°25. CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN AGAR EMB**



*FOTOGRAFÍA 28. Crecimiento de bacterias en Agar EMB*

## ANEXO N°26. CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN AGAR SS



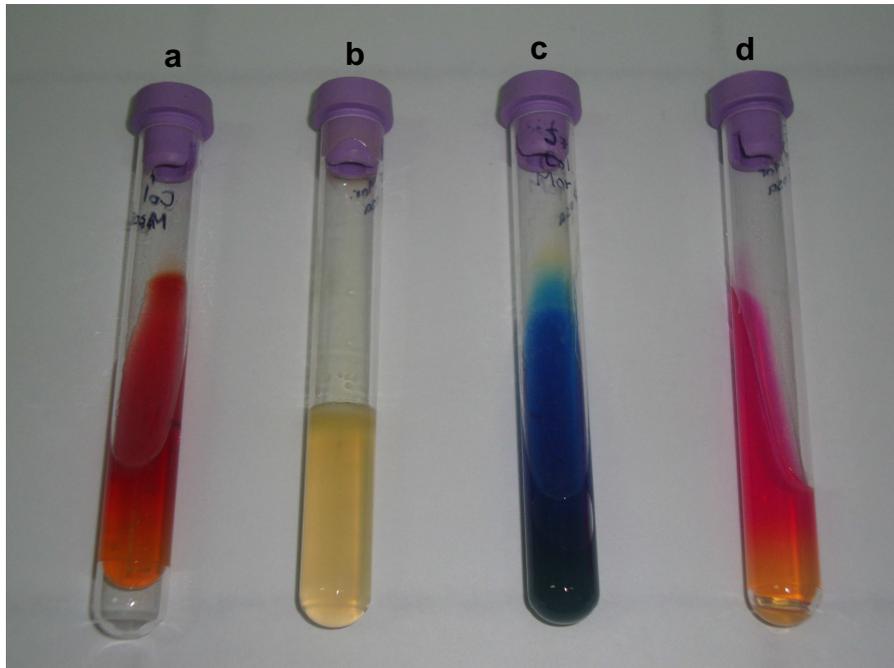
*FOTOGRAFÍA 29. Crecimiento de bacterias en Agar SS*

## ANEXO N°27. PRUEBA DE LA FILAMENTACIÓN



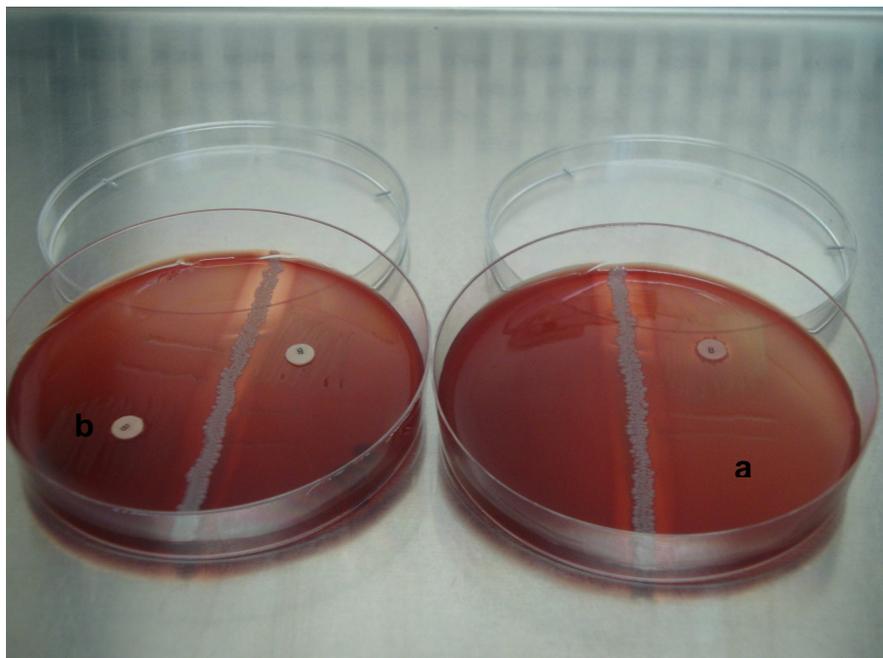
*FOTOGRAFÍA 30. Prueba de la Filamentación*

**ANEXO N°28. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN**



*FOTOGRAFÍA 31. Pruebas bioquímicas de identificación (a. Kligler, b. SIM, c. Citrato, d. Úrea )*

**ANEXO N°29. PRUEBA DE CAMP Y DE SENSIBILIDAD A LA B ACITRACINA**



*FOTOGRAFÍA 32. a) Prueba de Camp b) Sensibilidad a la Bacitracina*

**ANEXO N°30. HOJA TÉCNICA PARA ANÁLISIS DE AGUA**

**Escuela Superior Politécnica de Chimborazo  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Bioquímica y Farmacia**

**Datos Generales:**

**Muestra N°**.....

**Fecha de Muestreo**.....

**Hora de Muestreo**.....

**Parroquia**:.....

**Sitio de muestreo de acuerdo al sistema**:.....

**Toma de muestra**:.....

**Características sanitarias**:.....

**Aspectos Técnicos**:.....

**Color**:.....

**Olor**:.....

**Aspecto**:.....

**Temperatura**:.....

**pH**:.....

**ANEXO N°31. ESQUEMA PARA ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN BIOTERIOS DE PRODUCCIÓN**

