

302827

N=24

2Ej.

RECEBIDA EN  
MOTOLINIA  
1994  
12  
1994



**UNIVERSIDAD MOTOLINIA A.C.**

**ESCUELA DE QUIMICA**

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

**MONITOREO MICROBIOLÓGICO DE LA VIRUTA  
EMPLEADA POR CUATRO BIOTERIOS DIFERENTES.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
**P R E S E N T A:**  
LUZ MARÍA TEJERO CÁCERES

MÉXICO, D.F.

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A DIOS, POR GUIARME CON SU INFINITA LUZ EN TODO MOMENTO.

A MIS PADRES, TOMÁS Y LUZ MARÍA, POR SER LOS MEJORES DEL MUNDO !

LOS QUIERO CON TODO EL CORAZÓN.

A MIS HERMANOS, PATY Y TOMMY, GRACIAS POR APOYARME Y ESTAR SIEMPRE CONMIGO.

A MI ESCUELA, UNIVERSIDAD MOTOLÍN, POR HABER SIDO MI SEGUNDO HOGAR  
DURANTE 18 AÑOS.

A MIS AMIGOS, TERE, RAFAEL, MARTHA ALICIA Y MARTHA ELENA.

A LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM, EN DONDE ENCONTRÉ GRANDES AMIGOS:  
ATONATIU, RODOLFO PASTELÍN, Y TODOS MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO; SIN  
SU AYUDA NO HUBIERA SIDO POSIBLE ÉSTE TRABAJO. GRACIAS.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA FÁCULTAD DE QUÍMICA  
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
CON LA COLABORACIÓN DE LOS BIOTERIOS DE LAS SIGUIENTES  
INSTITUCIONES:

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, UNAM

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN, SECRETARÍA DE SALUD

LABORATORIO NACIONAL DE SALUD, SECRETARÍA DE SALUD

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

M.V.Z. ATONATIU E. GÓMEZ MARTÍNEZ

Q.F.B. RODOLFO PASTELÍN PALACIOS

## ÍNDICE

---

### Í N D I C E

	Pág.	
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Introducción		2
1.1. Planteamiento del problema		3
1.2. Objetivo		4
1.3. Hipótesis		4
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
2.1. Fundamentos		6
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>23</b>
3.1. Diagrama general		24
3.2. Material. Reactivos y Equipo		25
3.2.1. Material de Laboratorio		25
3.2.2. Reactivos		25
3.2.3. Equipo		26
3.3. Metodología		26
3.3.1. Preparación de reactivos		26
3.3.2. Técnicas		27
3.3.3. Método		28
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
4.1. Resultados		30
4.2. Discusión		43
<b>CAPÍTULO V</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
5.1 Conclusiones		46
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>47</b>

## CAPÍTULO I

## **INTRODUCCIÓN**

La habilidad de los científicos para acrecentar el bienestar de los humanos y de los animales depende directamente de los avances que son posibles mediante la investigación; la gran mayoría de estas pruebas científicas requieren el uso de animales de experimentación.

Los científicos han desarrollado y seguirán perfeccionando y utilizando métodos científicamente validados en la experimentación animal, por lo cual, es importante identificar cada una de las variables, involucradas en el manejo de animales en una investigación, y tratar de controlarlas. Entre ellas están comprendidas básicamente las que conforman el ambiente que rodea al animal, como son: el alimento, el agua que toman, la limpieza del lugar en donde se aloja, el estado de salud de las personas que se encargan de su cuidado, el material que se utiliza para su cama, la temperatura, la humedad relativa, la intensidad de la luz, etc.

En un afán por demostrar la importancia del control de cada uno de estos factores ambientales, surge el tema del presente trabajo.

Para esta investigación se eligieron cuatro bioterios de Instituciones que llevan a cabo actividades diferentes entre sí y que involucran el uso de animales de experimentación (ratas y ratones principalmente):

- Facultad de Química UNAM - Enseñanza e investigación
- Instituto de Fisiología Celular UNAM - Enseñanza e investigación
- Instituto Nacional de la Nutrición SS - Investigación
- Laboratorio Nacional de Salud SS - Pruebas biológicas de productos que se encuentran en el mercado.

Se estudió el tipo de viruta empleada (cama) en cada bioterio, el tratamiento que se le dió al material antes de colocarlo en las cajas de los animales y se practicó un ensayo bacteriológico a la viruta para conocer el estado microbiano del material al entrar en contacto con el animal, y así determinar posibles hallazgos de hongos y/o bacterias que pudieran afectar el estado de salud del roedor.

Además se proponen tipos de viruta novedosos que facilitan el control de esta variable, poco tomada en cuenta en diversas investigaciones.

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El contar con animales de alta calidad es el resultado de todo un proceso de control estricto sobre el macroambiente y el microambiente que los rodea. (1)

La calidad de los animales de laboratorio está en función de su estado microbiológico; de esta manera en la actualidad hay animales denominados axénicos, gnotobióticos, SPF (Specific Pathogen Free), animales mantenidos en barrera, animales convencionales, etc. (17) Uno de los factores ambientales que están en estrecho contacto con los animales de laboratorio es la cama.

Al hablar de cama, se hace referencia al material depositado en el fondo de las cajas o jaulas en las que están los animales y cuyo propósito consiste en absorber deyecciones y derrames de agua, proveer aislamiento térmico, permitir la construcción de un nido si es necesario y brindar seguridad y comodidad a los animales. (23, 25)

La cama puede convertirse en un transmisor importante de enfermedades puesto que entra en íntimo contacto con los animales. Cuando la cama es de viruta de madera, ésta deberá ser tamizada para eliminar astillas, polvo excesivo y todo material extraño, tóxico y/o adherible, como son: trozos de madera con pintura, barniz, pegamento, etc.; después debe ser esterilizada, ya que por lo general la viruta utilizada en los bioterios de la Ciudad de México proviene de madererías en donde no hay un control de fauna nociva, como pueden ser ratones, ratas, perros, gatos y hasta el mismo humano. (4, 17)

Por ello surge la importancia de llevar a cabo un método que disminuya el número de microorganismos de la viruta.

La esterilización es el conjunto de operaciones destinadas a eliminar o matar todas las formas de seres vivientes contenidas en un objeto o sustancia. (21)

El método más común para esterilizar la viruta es mediante autoclave. En ésta, se utiliza calor húmedo para eliminar a los microorganismos. El vapor a presión proporciona temperaturas considerablemente por encima de las que se pueden obtener al hervir el agua. Éste método tiene la ventaja de lograr un calentamiento rápido, penetración abundante humedad, lo que origina la coagulación de las proteínas de células microbianas. (21)

El tiempo de funcionamiento para lograr la esterilidad depende de la naturaleza del material que se está esterilizando, del tipo de envase y del volumen del material. Por lo general, el ciclo de esterilización se lleva a cabo a una presión de  $1.054 \text{ kg/cm}^2$  (equivalentes a  $15 \text{ lb/in}^2$ ) y a  $121^\circ\text{C}$ . (21)

## **1.2 OBJETIVO**

a) Comprobar que el método de esterilización que emplean los bioterios de la Facultad de Química-UNAM, Instituto de Fisiología Celular-UNAM, Instituto Nacional de la Nutrición y Laboratorio Nacional de Salud, para esterilizar la viruta es el adecuado, mediante su monitoreo microbiológico antes de colocarla en las cajas de los ratones.

b) Proponer nuevas opciones para la obtención de una cama adecuada para los animales de los bioterios.

c) Describir cual es el método más adecuado para lograr disminuir el número de microorganismos de la viruta.

## **1.3 HIPÓTESIS**

Los bioterios visitados para la realización de este trabajo, utilizan distintas cantidades de viruta a la semana, misma que debe tratarse para eliminar posibles contaminantes. Para ello, los bioterios emplean el método de esterilización por calor humedo; cada uno esteriliza la viruta en formas diferentes, dependiendo de las cantidades de que consume por semana.

Se demostrará que efectivamente la viruta está estéril, al realizar un monitoreo microbiológico de diversas muestras de ésta, tomadas al azar. Si el proceso de esterilización es el adecuado, entonces no se detectará crecimiento microbiano en la muestra.

## CAPÍTULO II

## ANTECEDENTES

### 2.1 FUNDAMENTOS

El bioterio es un lugar con características específicas de construcción, con un medio ambiente controlado y equipo especial (cajas de contención, termómetros, higrómetros, material para cirugía, etc.), en donde se reproducen y/o alojan animales de laboratorio útiles para la práctica de la investigación biomédica, actividades de enseñanza, control de calidad de medicamentos y apoyo a los laboratorios de diagnóstico. ( 20 )

Los bioterios, desde el punto de vista de la especie animal que se maneje, se clasifican para grandes, medianas y pequeñas especies y de acuerdo con los servicios que se otorgan se les divide en tres clases:

- bioterios de producción.- son aquéllos que tienen el propósito fundamental de producir animales para satisfacer la demanda del laboratorio. Corresponden a los consorcios comerciales, así como algunas instituciones gubernamentales o con participación gubernamental que se dedican a esta actividad.
- bioterios de experimentación.- en ellos exclusivamente se efectúa experimentación, y no se reproducen animales, excepto en el caso que la reproducción sea parte del experimento. Este tipo de bioterios se encuentran principalmente dentro de compañías farmacéuticas, instituciones que realizan investigación bajo contrato y algunos centros educativos.
- bioterios mixtos.- en este tipo de bioterio los animales son producidos y utilizados dentro de la misma institución que los produce. En México es el tipo más común de bioterio debido principalmente a la ausencia de productores comerciales responsables y a que la mayor parte de la investigación científica es realizada en instituciones educativas o gubernamentales. ( 4, 7, 20 )

Además de constituirse como áreas de apoyo a las actividades de investigación y de enseñanza de las unidades de atención médica, de investigación biomédica y clínica, intervienen en planos no hospitalarios, por ejemplo laboratorios de obtención de productos biológicos y laboratorios de control de calidad. ( 7 , 29 )

La creciente necesidad de los investigadores por contar con animales libres de enfermedades y de controlar todas las variables ambientales que afectan los resultados de la investigación científica, han ocasionado el desarrollo de técnicas sofisticadas de producción para animales de laboratorio, las cuales se denominan barreras. ( 18 )

El tipo de barrera utilizado depende del animal que se pretende reproducir. Diferentes clasificaciones han sido establecidas para definir las características de los animales producidos bajo un sistema de barreras, todas ellas han tomado como base un criterio microbiológico para su desarrollo.

A continuación se resume la clasificación utilizada por el Medical Research Council del Reino Unido ( 18 ) la cual por su simplicidad y características podría adecuarse mejor a las necesidades de nuestro país.

Las categorías son:

\* ( Una estrella ) .- Animales tradicionalmente denominados convencionales o criados sin barreras. Son animales libres de enfermedades transmisibles al hombre y son apropiados para demostraciones y enseñanza.

\*\* ( Dos estrellas ) .- Animales comparables a los convencionales o criados sin barreras pero mantenidos en condiciones excelentes de higiene, por lo tanto no están infectados con céstodos lo cual indica contaminación directa o indirecta de la colonia por otros animales. Estos animales están libres de enfermedades epidémicas serias por lo que son recomendables para la mayor parte de los experimentos de corta duración ( menos de tres meses ).

\*\*\* ( Tres estrellas ) .- Los animales de este grupo han sido generalmente obtenidos por cesárea o histerectomía y por lo tanto están libres de microorganismos que no son capaces de cruzar la barrera placentaria.

\*\*\*\* ( Cuatro estrellas ) .- Estos animales son comparables a los descritos en la literatura internacional como animales libres de patógenos específicos ( SPF ). Están mantenidos con estrictas normas de manejo y seguridad utilizando barreras físicas y administrativas. Los animales así mantenidos están libres de una gran cantidad de gérmenes patógenos.

Las categorías tres y cuatro estrellas son las más recomendables para realizar investigación en la mayor parte de las disciplinas.

\*\*\*\*\* ( Cinco estrellas ) .- Estos animales son mantenidos en un sistema estéril completamente cerrado, por lo tanto están libres de cualquier microorganismo demostrable.

Las grandes compañías farmacéuticas líderes en el campo de producción de nuevos fármacos han estado utilizando animales tres y cuatro estrellas por más de 20 años. ( 4, 5, 18 )

Si bien el grado de sofisticación de las barreras depende de la categoría del animal que se pretende producir y del tiempo que dure el experimento, existe un mínimo de barreras que deben prevalecer en cualquier tipo de bioterio. Estas son:

- 1) Aislamiento del edificio de posibles causas de contaminación ( animales silvestres o enfermos ).
- 2) Diseño de la construcción de tal forma que obligue al personal a circular en un solo sentido, manteniendo una clara demarcación entre áreas 'limpia' y 'sucias'.
- 3) Diseñar espacio adicional dentro de las instalaciones para realizar ciclos de desinfección periódicos.
- 4) Colocación de barreras que prevengan la introducción de roedores silvestres en cada una de las puertas de acceso y salida del edificio.
- 5) Colocar barreras que eviten el acceso de insectos en todas las entradas y salidas del edificio.
- 6) Restringir y controlar estrictamente el ingreso del personal así como de visitantes a las áreas del bioterio.
- 7) Implantar una serie de normas higiénicas en el personal y realizar un examen médico frecuente para así identificar a los portadores de gérmenes indeseables.
- 8) Esterilización del equipo, alimento, agua, cajas, cama, botellas, etc.
- 9) Limpieza continua de superficies con soluciones desinfectantes
- 10) Proporcionar recambio adecuado de aire filtrado
- 11) Practicar períodos de cuarentena activos para todos los animales que ingresen al bioterio. ( 18 )

El cuidado humanitario y el uso de toda vida animal es interés de cualquier sociedad moral y consciente, y constituye la principal responsabilidad de aquellos individuos que utilizan animales con objetivos experimentales. ( 22 )

Hablar de animales de laboratorio es referirse a toda especie animal susceptible de ser sometida a la experimentación con el único propósito de obtener información. La utilización de los animales de laboratorio dentro de las pruebas de constatación de la calidad de diversos productos es sólo uno de los múltiples usos que se les da a estos seres.

A través de los animales de laboratorio se pretende constatar y/o validar la calidad de ciertos productos generados en la industria, por ello resulta obvia la necesidad de contar con los animales que posean la calidad necesaria para poder ser considerados instrumentos de dicha constatación.

Si al referirnos a la calidad de un animal de laboratorio se deben considerar el conjunto de cualidades que lo caracterizan, es inobjetable que en la medida que éstas sean deseables, constantes, controlables y permanentes, estos seres serán más valiosos, puesto que brindarán mayor confiabilidad en las pruebas de constatación requeridas. ( 17 )

La mayoría de los animales comparten algunas necesidades y deseos básicos. Los animales de laboratorio encerrados en jaulas necesitan más cuidado que los animales libres porque ellos están imposibilitados de mantenerse por sí mismos. La manera más práctica de prepararse uno mismo para el importante trabajo de mantener a los animales saludables y en el mejor estado son:

- a) buscar la mayor información posible sobre sus hábitos y necesidades
- b) tratar de "ponerse en su lugar", y darles, lo más posible, lo que ellos buscarían si pudieran. ( 22 )

Un factor determinante dentro de la producción de animales de laboratorio, por lo tanto, lo constituye el medio ambiente, por ser este el conjunto de factores físicos, químicos y biológicos que rodean al ser viviente. ( 23 )

La alteración de los factores ambientales, trae como consecuencia el padecimiento de distintas enfermedades. Algunos de los factores importantes que deben considerarse son:

#### A. FACTORES AMBIENTALES

- Temperaturas extremas
- Cambios climáticos bruscos
- Ventilación inadecuada
- Altos niveles de vapores amoniacales

- Corrientes excesivas de aire
- Humedad
- Camas inadecuadas
- Hacinamiento
- Alteraciones de la jerarquización social
- Alto nivel de ruidos
- Iluminación inadecuada
- Acumulación de suciedad
- Exposición a agentes infecciosos

**B. FACTORES INTRÍNSECOS**

- Diferencias sexuales
- Diferencias genéticas
- Comportamiento y ciclos
- Estado inmunológico
- Edad
- Obesidad
- Anorexia
- Falta de ejercicio
- Lactación
- Gestación
- Agentes inespecíficos que alteran la conducta del animal

**C. FACTORES EXPERIMENTALES**

- Sujeción
- Cirugía
- Efectos causados por medicamentos
- Inducción de neoplasias
- Efectos de la radiación
- Inoculaciones patógenas
- Hemorragias

**D. FACTORES ALIMENTICIOS**

- Insuficiencia cuantitativa de alimentos y bebidas
- Comedores y bebedores inaccesibles
- Presentación inadecuada del alimento
- Alimentos deteriorados
- Alimentos programados para otra especie
- Contaminación (bacterias, hongos, insectos, orina, etc.)

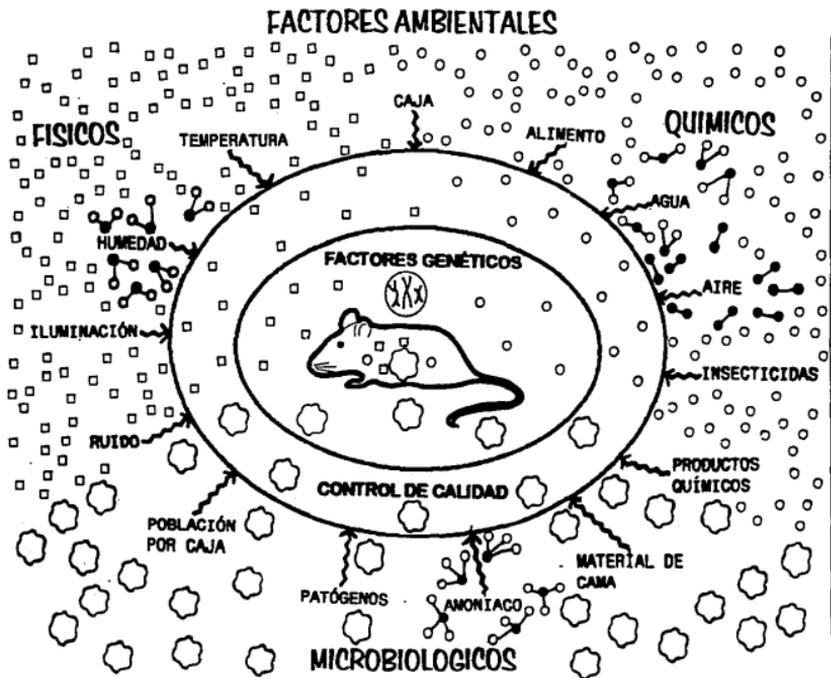
En el diseño del experimento ideal se deben poder controlar todos los factores o parámetros que puedan afectar un resultado experimental, de hecho el control de todas las variables que afectan un sistema biológico es muy difícil de alcanzar ya que el mismo es afectado por tantas variables, que resulta difícil reconocerlas y mucho menos controlarlas, por lo tanto, aquellas que se pueden reconocer, deberán ser corregidas a fin de obtener una definición ambiental. (29)

Dentro del campo de los animales de laboratorio, se puede decir que el medio ambiente se divide en:

**MACROAMBIENTE.**- El que se refiere al local en donde se encuentran los animales y lo constituye el medio atmosférico que se les proporciona; los elementos básicos de éste son:

- a. Ventilación : 8 a 10 recambios totales por hora
- b. Temperatura : 21 a 23°C
- c. Humedad relativa : 45 a 55%
- d. Iluminación : 100 a 125 Lux ( intensidad luminosa ) con 12 horas de requerimiento de luz al día.

Éstos se consideran los rangos de variación "óptimos" de los elementos del medio atmosférico ya mencionados aplicables a diferentes especies animales, a sus diferentes fases de producción y a los diversos tipos de instalaciones. Por estas razones es importante mencionar que los rangos de variación "óptimos" publicados y recomendados deben ser considerados únicamente como guías que permiten establecer los valores reales apropiados a las necesidades particulares. ( 2, 10, 17)



**MICROAMBIENTE.**- El que se encuentra en el interior de la jaula; éste puede ser controlado conservando los factores ambientales adecuados y va a depender de:

1. Tipo de cama ( material que se coloca dentro de las cajas de los animales de laboratorio )
2. Proporción de animales de acuerdo a su tamaño y forma de la jaula
3. Programación y establecimiento de buenas medidas de higiene de la jaula, comedero y bebedero. ( 2, 10 )

Las especificaciones y requerimientos que poseen las camas de contacto de roedores están en función de la necesidad de obtener condiciones adecuadas o condiciones óptimas, es decir, ideales para los animales. ( 9 )

Las condiciones adecuadas son aquéllas que permiten al animal reproducirse y sobrevivir con una salud razonable. ( 9 )

Las condiciones óptimas o ideales por su parte, son las que se tienen cuando todas las variables, excepto las que marca el experimento que se va a realizar, se conocen en detalle y por lo tanto son controladas. ( 9 )

El Comité Internacional de Animales de Laboratorio ( ICLA ), en 1978 instó a que cualquier experimento que utilizara animales, debía reportar el tipo de cama que usara, las veces que cambiara esta cama, el método de esterilización de la misma, etc. ( 9 )

Una cama debe reunir las siguientes características:

- Confortable
- Absorbente
- Esterilizable
- No tóxica
- Libre de polvo o contaminantes
- Que no permita el crecimiento microbiano
- Fácilmente almacenable
- Que no origine productos extraños debido a su esterilización
- De preferencia que sea combustible para ser incinerada y así desecharse
- De bajo costo
- De fácil adquisición ( 4, 5, 9 )

Otros requisitos más específicos son los siguientes:

- Permanecer químicamente estable durante su uso
- Manifestación de uniformidad entre lotes
- Que optimice el comportamiento normal animal
- No tóxico para el personal que labora en el bioterio.

Al cumplirse todos de los puntos anteriores, se le dá el uso adecuado a una cama, y por consiguiente, ésta se puede eliminar de la lista de variables ambientales que persigue controlar el investigador, quien pretende obtener resultados reproducibles. ( 9 )

Aún cuando aparentemente la cama es un insumo menos problemático que el alimento o el agua, éste no lo es. Dicha cama es un vector importante de enfermedades puesto que entra en íntimo contacto con los animales. Es quizá el vector más común de ectoparásitos. ( 15 )

En lo referente a materiales de cama que comunmente son empleados en la producción y alojamiento de roedores, existen diferentes tipos de materiales de cama ingeribles y no ingeribles, los cuales se enuncian a continuación:

#### MATERIALES DE CAMA

##### a) INGERIBLES

- Granos de maíz
- Mazorcas de maíz machacadas
- Pulpa de remolacha

##### b) NO INGERIBLES

- Viruta de madera (pino, lobina, álamo) a granel o pelletizada
- Tiras de papel periódico
- Confeti de papel
- Aserrín de madera

El aserrín de madera no es muy recomendable por predisponer a problemas de vías respiratorias y oculares.

Los materiales de cama ingeribles presentan el gran inconveniente de que el roedor puede consumir parte de la cama y por lo consiguiente no consumirá el alimento balanceado peletizado, aunque cualquier cama y lugar resultan satisfactorios cuando se trata de procrear.

La cama ideal para reproducción y alojamiento de roedores es la viruta de madera (pino, lobina o álamo). Ésta puede esterilizarse a presión y con una temperatura de hasta 125°C o con gas o radiaciones.

El empleo de viruta de madera de cedro resulta ser un material duro para los ratones, y por otro lado, el cedro rojo tiene el inconveniente de que libera al medio ambiente dos hidrocarburos volátiles, conocidos como cedreno y cedrol. El sistema microsomal enzimático está ubicado principalmente en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos; es el encargado de biotransformar una gran cantidad de fármacos a través de conjugaciones glucurónicas y de reacciones de oxidación, principalmente. ( 11 )

El cedreno y el cedrol, así como la viruta de pino blanco provocan una elevación de las enzimas microsomales hepáticas, las cuales pueden ocasionar que los estudios farmacológicos efectuados se invaliden. También disminuye el umbral de convulsiones en ratones que son inyectados con ciertos fármacos. ( 2, 4, 5 )

Por sí ésto fuera poco, algunas maderas muy olorosas, pueden inducir a una inadecuada circulación del aire y de esta manera pueden predisponer a enfermedades respiratorias ya que las altas concentraciones de amoníaco ambiental provocan parálisis ciliar de las vías superiores del tracto respiratorio. Se ha observado también que los ratones hembra producen camadas pequeñas, tienen una lactancia más corta y destetan menos animales cuanto tienen una cama de papel que cuando la tienen de viruta. ( 24 )

Cabe mencionar que actualmente existen empresas extranjeras dedicadas a la comercialización de cama para diferentes especies de laboratorio, con diversas características y en diferentes presentaciones, mismas que vienen ya empacadas y previamente tratadas con calor. Algunos de estos materiales de cama pueden reducir los intervalos en la frecuencia de cambio de la cama, ya que pueden durar hasta varios días sin cambio por ser muy absorbentes. ( 9, 13 )

Para lograr la calidad de los animales es necesario aplicar prácticas periódicas de control dentro del bioterio que permitan conocer el estado microbiológico de los animales, a través de los cuales se pueda evaluar el trabajo desarrollado. Estas prácticas periódicas pueden ser divididas en forma general en tres niveles:

A. Control de calidad de los principales insumos: alimento, agua y material de cama (3)

**PROGRAMA INTEGRAL DE MONITOREO**

TIPO DE MUESTRA	TAMAÑO DE LA MUESTRA	FRECUENCIA
Alimento, agua y material de cama	Variable	Semanalmente
Cajas y botellas de agua limpias	16	Semanalmente
Pisos y superficies de trabajo	Un hisopo de cada cuarto y varios de corredores	Semanalmente
Botellas de agua para <i>Pseudomona aeruginosa</i>	100	Semanalmente
Heces para detectar <i>Salmonella spp</i>	100	Semanalmente
Necropsias	25 - 30	Cada 2 meses

NOTA: Si en un lapso de 6 meses no se reporta la presencia de algún microorganismo importante, se puede reducir el tamaño de la muestra.

## B. Control de calidad del ambiente ( macro y microambiente ) ( 3, 9, 13 )

## PROGRAMA DE MONITOREO MACROAMBIENTAL

FACTOR AMBIENTAL	METODO DE MONITOREO	FRECUENCIA DE REVISION	ACCION CORRECTIVA
Temperatura	Revisar registros diarios	Diaria	Verificar la certeza de los registros y corregir el termostato
Humedad	Revisar registros diarios	Diaria	Igual al anterior
Presión de Aire	Inclinan manómetro ( Calibrar la presión diferencial ).	Diaria	Verificar la presión del equilibrio: inyección-extracción del aire. Revisar filtros de aire, puertas, etc.
Iluminación (intensidad)	Medidor de intensidad de luz	Variable	Constatar el buen funcionamiento de todas las lámparas y las balastras. Revisar "Timers" y su ciclo.

## C. Control de calidad de los animales propiamente dichos. ( 3, 9, 13 )

Es necesario constatar en forma periódica la calidad de los animales del bioterio; para lograrlo es recomendable establecer un Programa de Monitoreo que satisfaga las necesidades particulares de acuerdo a la calidad microbiológica de los animales que el bioterio contiene y produce.

En forma general, el programa deberá incluir la aplicación de pruebas parasitológicas, microbiológicas, histopatológicas y serológicas, así como la realización de necropsias. Las necropsias son sumamente útiles pues permiten observar directa o indirectamente el fruto del trabajo desempeñado en el bioterio. ( 3 )

Todos los factores que se mencionaron anteriormente ( macro y microambientales ) tienen su expresión en los animales, por esta razón deben realizarse necropsias periódicas, sistemáticas y completas. ( 3 )

Para poder aplicar los programas de control de calidad es necesario capacitar al personal que labora en el bioterio y explicarle la trascendencia que tiene este control. De acuerdo con las posibilidades particulares cada responsable de bioterio tiene la obligación ética de mejorar la calidad de los animales que produce y/o, en última instancia debe conocer lo mejor posible el estado de sus animales y ser honesto para reconocerlo.

#### **PRODUCCIÓN DE LOS DOS TIPOS DE CAMAS DE CONTACTO MÁS UTILIZADAS. CONTROL DE CALIDAD EN SU ORIGEN Y VENTA.**

##### Viruta de Madera

Se obtiene de los aserraderos de madera. Este tipo de viruta no tiene un tratamiento previo antes de llegar al usuario; en realidad posee un control de calidad. El productor puede decir que su viruta es suave, contiene el mínimo de desechos, que está libre de pesticidas o de otros contaminantes químicos, pero ninguno de ellos puede asegurar al consumidor una pureza microbiológica y/o toxicológica de la cama, excepto si recurre a un laboratorio especial para realizar un análisis al material. ( 9 )

La forma de empacar esta viruta es variable. No se necesita protegerla del medio ambiente ni de plagas. Algunos proveedores simplemente utilizan bolsas de papel; otros emplean sacos de lona. En la mayoría de los casos, la entrega del material se efectúa a granel (en camiones de carga). ( 9 )

Éste es el tipo de viruta que usan todos los bioterios de la Ciudad de México. En Estados Unidos, el Jefe del Bioterio puede pedir al proveedor que le entregue la viruta en un paquete o bolsa especial para que el material pueda someterse a esterilización. En nuestro país, generalmente los bioterios que llegan a esterilizar viruta buscan un método conveniente, es decir, sencillo, rápido y económico.

#### Astillas de Madera

El proceso por el cual se obtienen las astillas ( que son las partículas que se originan al fabricar tablas de madera, los tacones de los zapatos de mujeres, etc. ) es un método innovador. Está estipulado que sólo se utilicen leños verdes para evitar la presencia de conservadores u otros contaminantes. Esta técnica se efectúa de la siguiente manera: primero se controla el tamaño de partícula por medio de tamices; después se aplica calor ( arriba de 350°C ) para secar el material, se aspira el polvo y se somete a una atmósfera de vapor para darle a la cama una humedad entre el 6 y 9 %. Posteriormente se empaqueta en bolsas de papel de 3 capas; las bolsas están hechas a base de papel Kraft, con pegamento que resiste el proceso de esterilización. Se prefiere usar esta goma, ya que los sacos que presentan una costura pueden permitir la entrada de insectos al interior de la bolsa durante el transporte y almacenamiento del material, y la goma evita que suceda ésto. ( 9 )

Para controlar el tamaño de partícula, polvo y humedad, los proveedores en ocasiones ( no se sabe con que frecuencia ) someten a sus productos a un análisis microbiológico, toxicológico y de otros productos químicos; esta prueba la llevan a cabo laboratorios independientes. ( 9 )

#### EMBARQUE, RECEPCION Y ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL

Dependiendo de la distancia del consumidor con respecto a la del proveedor, el material de cama puede embarcarse en tren o camión hacia su destino. Durante el viaje puede originarse una fricción considerable lo cual origina que a pesar de que el material esté libre de polvo, se convierta en una cama con polvo después de que el usuario la recibe. ( 9, 13 )

Debido a que la viruta tiene un tiempo de vida en almacén prolongado, el usuario por lo general almacena este material por un largo período. Este almacén debe estar protegido de insectos y además debe tener una humedad controlada. ( 9 , 13 )

#### USO DE LA CAMA. CONTROL DE CALIDAD DEL CONSUMIDOR. COSTO

Está estipulado que toda cama de contacto debe esterilizarse antes de usarse, aunque bajo ciertas circunstancias, por ejemplo, trabajando con animales convencionales, esta labor puede o no llevarse a cabo.

Recientemente, en Estados Unidos es común utilizar una tira de papel sensible al calor y a la humedad como indicador; la tira se introduce en la bolsa o costal de la cama y sirve para monitorear si la esterilización se efectuó. Ésto es un paso adelante sobre los indicadores que tan sólo son sensibles al calor. ( 9 , 13 )

El control de calidad depende de las necesidades del usuario. Los análisis son caros y adicionan un costo extra al producto. ( 9 , 13 )

A continuación se nombran los tipos de análisis que comunmente practican los proveedores y los usuarios a las camas de animales de laboratorio.

PROPIEDADES QUIMICAS	PROPIEDADES FISICAS	PROPIEDADES MICROBIOLOGICAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pesticidas</li> <li>• Aflatoxinas</li> <li>• Residuos de detergentes</li> <li>• Eter y/o derivados</li> <li>• Metales pesados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uniformidad de partícula</li> <li>• Capacidad de absorción</li> <li>• Daños físicos visibles</li> <li>• Irritación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conteo en placa</li> <li>• Levaduras y mohos</li> <li>• Coliformes y <i>Salmonella spp</i></li> <li><i>Pseudomona spp</i></li> </ul>

En nuestros días, el reciclaje de materiales se ha convertido en una tarea importante; es por ello que se han estado buscando opciones que ayuden a controlar la emisión de desechos y se encontró que existe un método para reducir los costos de materiales de cama a la mitad. Ésto se puede llevar a cabo adicionando un volumen igual de papel picado a la viruta de madera. Con ésto se provee al animal de material para hacer su nido, se incrementa la absorción de agua y se tiene un mejor control de olores. Además, las cajas son más fáciles de limpiar que aquéllas cajas que sólo contienen viruta. ( 9, 13 )

### **DESTINO DEL MATERIAL DE CAMA UTILIZADO**

La incineración es el método más económico para destruir tanto la cama como los contaminantes microbiológicos y toxicológicos (excepto desechos radiactivos) que pueda tener una cama utilizada. ( 9, 13 )

En ocasiones, la cama usada puede reutilizarse como fertilizante. Sin embargo, en el Acta de Conservación y Recuperación de Recursos, PL 94-580, publicada en 1978, se encuentra un oficio ( que tiene también la intervención de la Agencia de Protección al Ambiente ) para los desechos sólidos. ( 9 )

En el subtítulo C define a un 'desecho peligroso' como aquél que es inflamable, corrosivo, reactivo, tóxico, radiactivo, teratogénico o mutagénico. ( 9 )

Es difícil probar que la cama de desecho, aunque haya sido esterilizada después de usarse, no entre en alguna de las categorías antes mencionadas.

### **CAMAS NOVEDOSAS ( IMPORTADAS )**

#### **\* CARE FRESH**

Material aceptado en varias Universidades de Estados Unidos, debido a que desde que se empezó a utilizar en esos bioterios, hubo una reducción de el número de veces que se cambian las cajas de los animales por semana, que comunmente es de 3 veces, a una sólo vez por semana.

Este material ofrece protección al trabajador del bioterio, calidad para el animal y protección al ambiente, ya que es biodegradable, porque no contiene ningún aditivo y es 100% natural.

Es un producto de desecho de la Industria del papel, ya que está constituido por fibras cortas que no sirven para fabricar papel.

**\* GENTLE TOUCH**

Producto obtenido de la corteza del álamo, completamente natural y biodegradable, puede usarse como fertilizante o ser usado como combustible sin que se corra el riesgo de tener efectos dañinos. Es muy absorbente.

**\* CELLU-DRI**

Fibra virgen de celulosa peletizada, con gran poder de absorción, biodegradable. Al estar peletizada elimina los problemas de polvo. Se empaqueta en bolsas que resisten el proceso de esterilización.

**\* ALPHA-DRI**

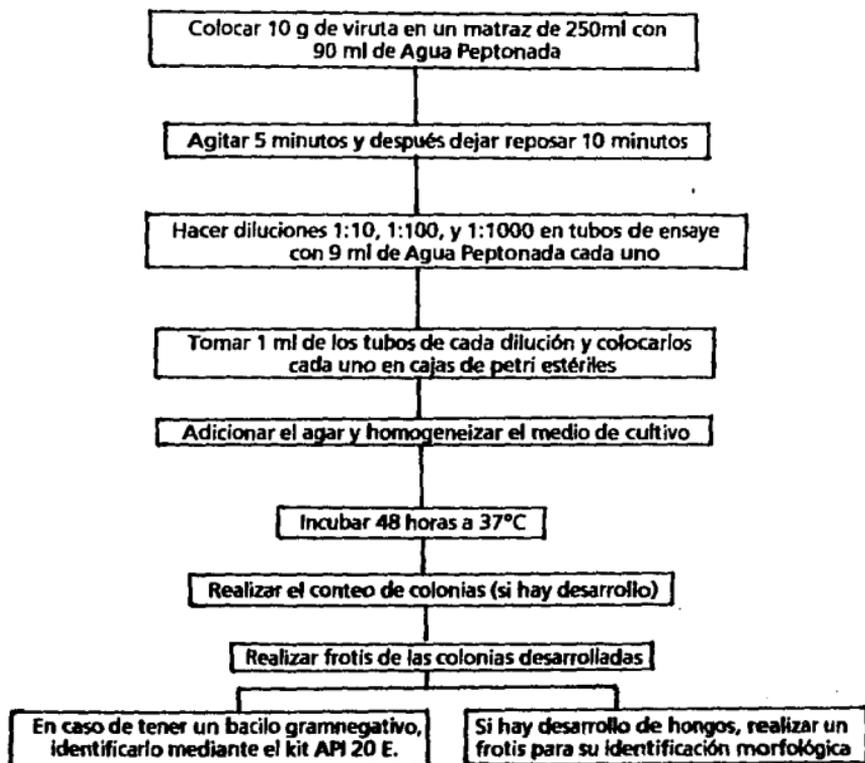
Presenta la ventaja de tener alta absorción, pero además evapora rápidamente la humedad, por lo que se mantiene seca por más tiempo.

Por su tamaño reduce espacios de almacén. Se vende en bolsas que pueden ser esterilizadas. No origina polvo.

## CAPÍTULO III

## PARTE EXPERIMENTAL

## 3.1 DIAGRAMA GENERAL



## **3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO**

### **3.2.1. MATERIAL DE LABORATORIO**

Algodón

Asa bacteriológica

Aplicadores de madera estériles

Cajas de Petri

Cinta testigo 3M Scotch

Cubreobjetos

Gasa

Gradilla para tubos

Matraces Erlenmeyer de 75, 250 y 500 ml

Mechero de Bunsen

Pipetas estériles graduadas de 1, 2 y 10 ml

Portaobjetos

Tubos de vidrio Pyrex de 13x100

Tubos de vidrio Pyrex de 13x165

### **3.2.2. REACTIVOS**

Agar de Soya y Tripticaseína ( Bioxon )

Agar Nutritivo ( Bioxon )

Agar Papa Dextrosa ( Oxoid )

Cicloheximida 0.002g/L

Medio de Peptona y Caseína ( Merck )

Sistema de identificación API 20E

Suero fisiológico

### 3.2.3. EQUIPO

Autoclave Cyclomatic Control

Agitador automático Maxi Mix I Type 16700

Balanza analítica OHAUS Analytical Plus

Balanza granataria OHAUS Harvard Trip Balance

Incubadora Precision Mechanical Convection Incubator

Parrilla eléctrica y giratoria Thermolyne

## 3.3 METODOLOGÍA

### 3.3.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

#### a) Agar Nutritivo

Pesar 23 g de Agar Nutritivo y disolverlos en 1000 ml de agua destilada fría y calentar hasta punto de ebullición para disolver el medio por completo. Adicionar 10 ml del inhibidor cicloheximida 0.002g/l. Esterilizar. ( 8 )

#### b) Agar de Soya y Trypticaseína

Pesar 40 g de Agar de Soya y Trypticaseína y disolverlos en 1000 ml de agua destilada fría y calentar hasta el punto de ebullición para disolver el medio por completo. Adicionar 10 ml del inhibidor cicloheximida 0.002g/l. Esterilizar. ( 8 )

#### c) Agar Papa Dextrosa.

Pesar 39 g de Agar Papa Dextrosa y disolverlos en 1000 ml de agua destilada fría y calentar hasta el punto de ebullición para disolver el medio por completo. Esterilizar. ( 8 )

#### d) Cicloheximida (Inhibidor de hongos)

Pesar 0.002 g de cicloheximida, con precaución por ser una sustancia tóxica, y disolverlos en 1000 ml de agua destilada fría.

#### e) Medio de Peptona y Caseína 1%

Pesar 1 g del Medio de Peptona y Caseína y disolverlo en 100 ml de agua destilada fría. (8)

**3.3.2 TÉCNICAS****A) Preparación de diluciones ( 6 )**

1. Tomar 9 ml de la solución diluyente con una pipeta y colocarlos en tubos de ensayo provistos de tapones de algodón. (Blancos de dilución)
2. Esterilizarlos luego en autoclave.
3. Mezclar la muestra por agitación y con una pipeta recta, hundir en la muestra 2.5 cm tan sólo, y tomar 1 ml.
4. Se deja caer en el primer blanco de dilución.
5. Eliminar la pipeta
6. Con una pipeta limpia, introducirla en el líquido unos 2.5 cm, mezclar el contenido del primer tubo aspirando y dejando caer diez veces el líquido, sin producir burbujas.
7. Elevar la pipeta y soplar.
8. Tomar 1 ml que se transfiere al siguiente blanco de dilución.
9. Eliminar la pipeta
10. Proceder de la misma forma para todas las diluciones que se requieran.
11. Cuando se cuentan las bacterias en medios sólidos o semisólidos se pesan 10 g y se colocan en una batidora. Añadir 90 ml del diluyente, cerrar y homogenizar.
12. Las diluciones resultantes serán:

Tubo núm.	1	2	3	4
Dilución	1:10	1:100	1:1000	1:10000

En cada caso se obtienen diluciones 1/10, es decir, 1 ml contiene o representa 0.1 g del material analizado.

13. Se funde el agar nutritivo u otro medio adecuado. Enfriar a 45°C en baño maría.
14. En cajas de Petri estériles y rotuladas, vertir 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la placa correspondiente. Para cada dilución se usa una pipeta limpia. No descubrir la placa más que el tiempo justamente preciso para la operación.
15. Añadir a cada placa el contenido necesario de agar, girando la placa de la siguiente forma: mover la placa suavemente seis veces describiendo círculos en el sentido de las manecillas de un reloj. Repetir el mismo número de veces en el sentido contrario. Mover la placa de atrás hacia adelante seis veces. Repetir los mismos movimientos laterales. Dejar que solidifique, invertir e incubar durante 24 - 48 horas.

**B) Recuento de colonias ( 6 )**

1. Escoger placas que presenten entre 30 y 300 colonias.
2. Poner la placa abierta sobre la pantalla iluminada
3. Contar las colonias mediante una lupa de 75 mm y un contador de mano.
4. Calcular las colonias o el recuento de organismos vivos/ml multiplicando el número medio de colonias por placa contable por el recíproco de la dilución. Se da el informe como "unidades formadoras de colonias/ml" o como "bacterias/g o ml".

**3.3.3. MÉTODO**

1. Pesar 10 g de viruta y colocarlos en un sobre de papel. En caso de estar realizando la prueba para viruta estéril, marcar la posición de el sobre en el ciclo de esterilización.
2. En un matraz con 90 ml de agua peptonada 1% estéril, agitar los 10 g de viruta pesados durante 5 minutos en un agitador automático.
3. Dejar reposar la mezcla durante 10 minutos
4. En una gradilla se colocan 3 o 4 tubos de 13x165 con 9 ml de agua peptonada 1% estéril al cada uno. Con una pipeta estéril, tomar 1 ml de la mezcla de viruta y transferirlos al primer tubo de dilución. Agitar la solución en agitador automático por espacio de 15 segundos. Proceder como se indica en la técnica de diluciones.
5. Para llevar a cabo el llenado de placas, marcar perfectamente la dilución y el medio de cultivo que se va a adicionar (Agar Nutritivo, Agar de Soya y Tripticaseína o Agar Papa Dextrosa)
6. Incubar 48 horas y revisar las placas
7. Para bacterias realizar una Tinción de Gram. Si se obtienen bacilos gramnegativos puros, realizar la identificación de la bacteria utilizando el kit de identificación para Enterobacterias API 20E
8. Para hongos, realizar un frotis para identificar las estructuras microscópicas.
9. Realizar este procedimiento las veces que sea necesario hasta obtener un resultado constante.
10. El monitoreo se practicará tanto para viruta estéril como para viruta no estéril y en cada uno de los bioterios elegidos.

## CAPÍTULO IV

**4.1 RESULTADOS**

Los resultados fueron ordenados de la siguiente forma:

- 1) A cada bioterio se le asignó una letra; no se incluyó el nombre de la Institución para proteger su identidad y evitar que el resultado de este trabajo pueda perjudicar su prestigio
- 2) Los datos están contenidos en tablas en donde se especifica la dilución de la muestra y el resultado que se obtuvo en cada medio de cultivo, después de haber efectuado la técnica para cada bioterio varias veces, hasta que el resultado fue constante.
- 3) En cada bioterio se especifica cómo se manejaron las muestras, el tipo de autoclave, tiempo de esterilización, etc.

**Abreviaturas**

BG+ Bacilo grampositivo

BG- Bacilo gramnegativo

CG+ Coco grampositivo

CG- Coco gramnegativo

- No hubo desarrollo / prueba negativa

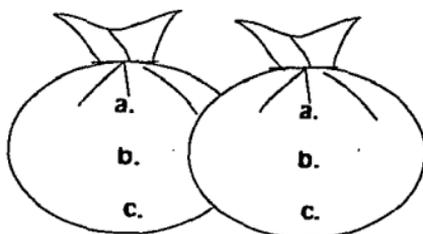
+ Prueba positiva

BMD Bacterias que se mueven por desplazamiento ( específicas de la madera )

## Bioterio A

## Método 1

Diagrama de posición de muestras



Tipo de autoclave:

Horizontal ( marca Arevalo )

Tiempo de esterilización:

1 hora

Muestras colocadas en sobres de papel manila ( con 10 g de viruta)

Forma de esterilizar la viruta:

En un costal de lona; se esterilizaron 2 costales por ciclo.**VIRUTA ESTERILIZADA****a. Muestras Superiores**

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
$1 \times 10$	-	-	-
$1 \times 10^2$	-	-	-
$1 \times 10^3$	-	-	-

**b. Muestras Centrales**

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
$1 \times 10$	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomona spp</i>	-
$1 \times 10^2$	-	-	Levaduras
$1 \times 10^3$	-	-	-

## c. Muestras Inferiores

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10 <sup>1</sup>	-	-	-
1 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-
1 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-

## VIRUTA SIN ESTERILIZAR

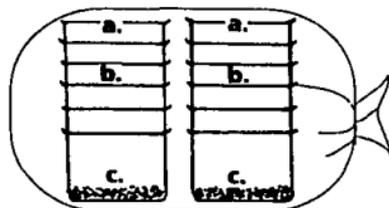
Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10 <sup>1</sup>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces spp</i> <i>Fusarium spp</i> <i>Penicillium spp</i> <i>Trichoderma spp</i>
1 x 10 <sup>2</sup>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Fusarium spp</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Aspergillus spp</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Trichoderma spp</i>	
1 x 10 <sup>3</sup>	<i>Pseudomona puttica</i>	Levaduras	

TESTIGOS	Sin Crecimiento	Crecimiento
Agar Nutritivo	+	-
Agar Soya Tripticas.	+	-
Agar Papa Dextrosa	+	-

## Bioterio A

## Método 2

## Diagrama de posición de muestras



Tipo de autoclave:

Horizontal ( marca Arevalo )

Tiempo de esterilización:

15 minutos

Muestras colocadas en sobres de papel manila ( con 10 g de viruta)

Forma de esterilizar la viruta:

En cajas de policarbonato (jaulas de animales)  
con la viruta y la botella del roedor, apilando  
6 cajas entre sí e introduciendo 12 cajas  
apiladas en un costal de lona.

**VIRUTA ESTERILIZADA****a. Muestras Superiores**

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	<i>Penicillium spp.</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-
1 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-
1 x 10 <sup>3</sup>	-	-	<i>Fusarium spp</i>

**b. Muestras Centrales**

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
1 x 10 <sup>2</sup>	-	<i>Pseudomona spp</i>	-
1 x 10 <sup>3</sup>	-	<i>Bacillus subtilis</i>	-

## c. Muestras Inferiores

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	Levaduras	-	BMD <i>Aspergillus fumigatus</i>
1 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-
1 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-

## VIRUTA SIN ESTERILIZAR

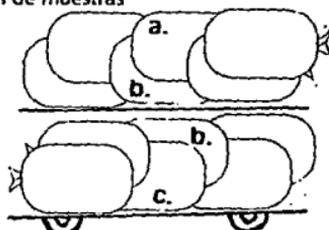
Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i>	<i>Fusarium spp</i>	-
1 x 10 <sup>2</sup>	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma spp</i>	-
1 x 10 <sup>3</sup>	-	<i>Enterobacter spp</i>	-

Nota: En este caso, el bioterio utiliza una malla metálica para tamizar la viruta antes de colocarla en la caja de policarbonato, con el fin de eliminar basura y trozos de madera de mayor tamaño.

TESTIGOS	Sin Crecimiento	Crecimiento
Agar Nutritivo	+	-
Agar Soya Tripticas.	+	-
Agar Papa Dextrosa	+	-

## Bioterio B

Diagrama de posición de muestras

Tipo de autoclave: Horizontal (marca Cyclomatic Control American Sterilizer)Dimensiones (Capacidad de carga): 2.10 m x 1.10 m x 1.0 m ≈ 2.3mTiempo de esterilización: 40 minutosTiempo de secado: 2 horasMétodo de secado: Vacío (- 4.5 kg de presión)

Muestras colocadas en sobres de papel manila ( con 10 g de viruta)

Forma de esterilizar la viruta: En costales de lona ( 20 kg ); en cada ciclo de esterilización entran 12 costales.**VIRUTA ESTERILIZADA****a. Muestras Superiores**

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	-	<i>Pseud. paucimobilis</i>	-
1 x 10 <sup>1</sup>	-	Levaduras	-
1 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-

**b. Muestras Centrales**

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	-	<i>Bacillus subtilis</i>	-
1 x 10 <sup>1</sup>	-	<i>Bacillus subtilis</i>	-
1 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-

## c. Muestras Inferiores

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10 <sup>1</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
1 x 10 <sup>2</sup>	<i>Pseudomona spp.</i>	-	-
1 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-

## VIRUTA SIN ESTERILIZAR

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10 <sup>1</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium spp</i> <i>Aspergillus niger</i>	BMD
1 x 10 <sup>2</sup>	Moho		BMD
1 x 10 <sup>3</sup>	<i>Shigella sonnei</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>
1 x 10 <sup>4</sup>	BMD		BG- y CG+

TESTIGOS	Sin Crecimiento	Crecimiento
Agar Nutritivo	+	-
Agar Soya Tripticas.	+	-
Agar Papa Dextrosa	+	-

## Bioterio C

## Método 1

## Diagrama de posición de muestras

NOTA: NO SE PERMITIO ENTRAR A COLOCAR MUESTRAS EN AUTOCLAVE, POR LO QUE NO SE TIENEN LOS DATOS DE LA POSICION DE MUESTRAS NI DE EL TIPO DE AUTOCLAVE.

Tiempo de esterilización: 15 minutos  
 Muestras colocadas en sobres de papel manila ( con 10 g de viruta)  
 Forma de esterilizar la viruta: En costales de lona

## VIRUTA ESTERILIZADA

## a. Muestras Superiores

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	-	-	-
1 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-
1 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-

## b. Muestras Centrales

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
1 x 10 <sup>2</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i> Levaduras	-
1 x 10 <sup>3</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-

## c. Muestras Inferiores

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10 <sup>1</sup>	-	Levaduras	-
1 x 10 <sup>2</sup>	BG+ con "swarming"	Levaduras y BG-	Levaduras
1 x 10 <sup>3</sup>	-	Levaduras y BG-	-

## VIRUTA SIN ESTERILIZAR

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10 <sup>1</sup>	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i> CG+ y BG-	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i> Levaduras	<i>Fusarium spp</i>
1 x 10 <sup>2</sup>	<i>Enterobacter agglomerans</i> Levaduras	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i> CG+	<i>Trichoderma spp</i>
1 x 10 <sup>3</sup>	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i> CG+ y BG-	<i>Trichoderma spp</i>	<i>Trichoderma spp</i>

TESTIGOS	Sin Crecimiento	Crecimiento
Agar Nutritivo	+	-
Agar Soya Tripticas.	+	-
Agar Papa Dextrosa	+	-

"swarming": característica de algunas colonias bacterianas de desplazarse sobre el medio de cultivo formando círculos a su alrededor.

CAPÍTULO IV RESULTADOS

Bioterio C

Método 2

Comparación de 3 tipos de viruta sin esterilizar

a) Muestras Viruta Importada 'Bluebonnet'

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10 <sup>1</sup>	Cocos grampositivos	Cocos grampositivos	Levaduras
1 x 10 <sup>2</sup>	Levaduras	-	Levaduras
1 x 10 <sup>3</sup>	-	Cocos grampositivos	Levaduras

b) Muestras Viruta de Madera (obtenida de maderera de Ciudad de México)

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10 <sup>1</sup>	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i> CG+ y BG-	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i> Levaduras	<i>Fusarium spp</i>
1 x 10 <sup>2</sup>	<i>Enterobacter agglomerans</i> Levaduras	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i> CG+	<i>Trichoderma spp</i>
1 x 10 <sup>3</sup>	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i> CG+ y BG-	<i>Trichoderma spp</i>	<i>Trichoderma spp</i>

## c) Muestras de Viruta Importada 'Beta Chip'

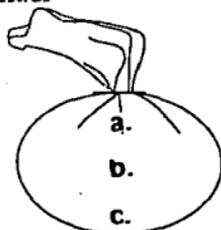
Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10 <sup>1</sup>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	BG+ con "swarming" <i>Trichoderma spp</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> BMD
1 x 10 <sup>2</sup>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Levaduras <i>Aspergillus fumigatus</i> BMD	<i>Trichoderma spp</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> BMD
1 x 10 <sup>3</sup>	Levaduras	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>

TESTIGOS	Sin Crecimiento	Crecimiento
Agar Nutritivo	+	-
Agar Soya Tripticas.	+	-
Agar Papa Dextrosa	+	-

"swarming": característica de algunas colonias bacterianas de desplazarse sobre el medio de cultivo formando círculos a su alrededor.

## Bioterio D

## Diagrama de posición de muestras



Tipo de autoclave: Horizontal (marca AMSCO American Sterilizer)

Dimensiones (Capacidad de carga): 50 cm x 50 cm x 50 cm

Tiempo de esterilización: 20 minutos

Muestras colocadas en sobres de papel manila ( con 10 g de viruta)

Forma de esterilizar la viruta: En costales de lona ( 25 kg ); en cada ciclo se esterilizaba la mitad del costal ya que era lo que cabía en el autoclave

**VIRUTA ESTERILIZADA****a. Muestras Superiores**

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	-	-	-
1 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-
1 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-

**b. Muestras Centrales**

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	-	-	-
1 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-
1 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-

## c. Muestras Inferiores

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	-	-	-
1 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-
1 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-

## VIRUTA SIN ESTERILIZAR

Dilución	Agar Nutritivo	Agar Soya Tripticas.	Agar Papa Dextrosa
1 x 10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
1 x 10 <sup>2</sup>	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichoderma spp</i>	-	-
1 x 10 <sup>3</sup>	<i>Streptomyces spp</i> <i>Fusarium spp</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Fusarium spp</i>
1 x 10 <sup>4</sup>	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-

TESTIGOS	Sin Crecimiento	Crecimiento
Agar Nutritivo	+	-
Agar Soya Tripticas.	+	-
Agar Papa Dextrosa	+	-

## 4.2 DISCUSION

De acuerdo con lo obtenido, se tiene que:

· Bioterio A.

Método 1: se observó que tiene un proceso de esterilización regular, ya que en la parte central de los costales no se alcanza la temperatura suficiente para eliminar a toda forma viviente, y esto se traduce en la presencia de *Pseudomona spp.*, *Bacillus subtilis* y Levaduras.

Se observa también la reducción de una gran carga microbiana, sin embargo, no es total.

Método 2: utiliza cajas de policarbonato, que resisten altas temperaturas; se puede ver cómo el vapor no penetra lo suficiente, ya que hubo crecimiento microbiano en las tres posiciones del cargamento a esterilizar. Esto posiblemente se debe a que al estar las cajas apiladas, no se alcanza en el interior de ellas la temperatura ideal (121°C), debido a que queda un espacio muy pequeño entre cada caja. Además, aunque resisten altas temperaturas, esta no se pueden prolongar por mucho tiempo, ya que las cajas comienzan a doblarse de las paredes, por lo que resulta cada vez más difícil tapparlas con la reja correspondiente. Es por ello que el método no es muy adecuado, ya que, además, deteriora el material del bioterio.

· Bioterio B.

En este caso, a pesar de que el tiempo de esterilización es de 40 minutos, debido a la gran cantidad de viruta que se mete a esterilizar, no se eliminan todas las formas vivientes, sólo se reduce la carga microbiana. Cada costal es de 20 kilogramos y se introducen en el cuarto de autoclave 12 costales en un carro metálico. Aquí se encontró que la viruta estaba almacenada en un cuarto en donde existía mucha basura sobre la viruta (envolturas de plástico, platos sucios desechables, etc.); queda demostrado de esta manera el control deficiente del almacén del bioterio por haber encontrado en la viruta no estéril la *Shigella sonnei*.

Lo peligroso de tan sólo reducir la carga microbiana, es que en ocasiones, una bacteria peligrosa para el animal, como en este caso, puede llegar a estar en contacto con el roedor, al no ser eliminada durante la esterilización.

#### • Bioterio C.

En este bioterio no se permitió observar cómo se colocan las muestras en el autoclave. Sin embargo también hubo una disminución en la población microbiana inicial (no estéril).

En éste bioterio además se realizan pruebas con materiales de cama importados, y por ello se realizó un estudio comparativo entre dos camas importadas y la que se usa por lo general en el bioterio C (viruta de madera). El 'Bluebonnet' es una viruta peletizada, esto es madera finamente molida y comprimida, formando pequeños cilindros que al entrar en contacto con el agua se expanden y absorben hasta en un 80-85% la humedad que hay a su alrededor. Aquí, sería conveniente estudiar si las resinas que se utilizan para comprimir y pegar la madera no afecta en algo al animal. Presentó gran cantidad de cocos grampositivos y levaduras. No hubo desarrollo de hongos.

Por otro lado, el 'Beta Chip' posee gran cantidad de hongos y algunas bacterias dañinas para el roedor como lo es la *Pseudomonas aeruginosa*.

Con lo anterior se deduce que el mejor tipo de viruta es el 'Bluebonnet', pero se debe estudiar si origina algún efecto secundario en el animal por las resinas que contiene.

#### • Bioterio D.

Inicialmente, el bioterio utilizaba una caja de cartón para esterilizar la viruta. Cuando se comenzó a realizar este trabajo, sólo se habían practicado dos pruebas con ésta caja de cartón, y la persona que estaba utilizando la viruta decidió cambiar a costal de lona en vez de la caja. Por ello, el resultado se muestra sólo con el costal de lona, ya que éste dió mejor resultado que la caja, al ser más poroso que el cartón. Esto se pudo observar por la reducción de carga microbiana entre una y otra prueba.

Aquí se demuestra que al ser menor el volumen de viruta a esterilizar, se logra el objetivo de eliminar a cualquier ser vivo del material.

Al estar realizando las pruebas para estandarizar el método, se optó por emplear un inhibidor de hongos (cicloheximida) debido a que la presencia de estos en medios como el agar nutritivo y agar de soya y tripticaseína, que no son específicos para hongos, inhibía el crecimiento de bacterias, por lo que no se podía determinar con exactitud la carga bacteriana presente en cada muestra.

## **CAPÍTULO V**

## 5.1 CONCLUSIONES

Sólo en algunos de los bioterios estudiados fue satisfactorio el método de esterilización que utilizan, ya que se detectó la presencia de *Enterobacter spp*, *Pseudomona spp*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, cocos grampositivos y de varios hongos en la viruta ya esterilizada.

La *Pseudomona spp* y *Shigella sonnei* originan en los animales diarreas que son difíciles de controlar.

La presencia de *Enterobacter spp* en la viruta, es un indicador de que la viruta estuvo en contacto con materia fecal animal o humana.

Se concluyó que este resultado se debe a que ninguno de los bioterios ha validado su autoclave. A reserva de realizar la validación, se sugiere por el momento utilizar costales de lona, que son porosos; que estos sean de baja capacidad para lograr que el vapor penetre hasta el centro del mismo y así lograr esterilizar el material.

Si se tienen autoclaves de gran tamaño en donde se esterilizan a la vez varios costales, hay que realizar una modificación al ciclo de esterilización, prolongando el tiempo en que la viruta permanece dentro del autoclave hasta lograr que el material del centro sea estéril.

La viruta de madera usada en los bioterios constituye un problema de contaminación ambiental, por lo que se estudia la posibilidad de reciclarla, como la mayoría de los materiales de desecho. De los bioterios estudiados, se sabe que sólo uno de ellos envía la cama usada a un Departamento de Jardines, el cual se encarga de secar la viruta y usarla como fertilizante.

En Estados Unidos se permite que algunos bioterios incineren la cama usada. En México, debido a la contaminación ambiental, éste método no está permitido.

Es importante estudiar más a fondo este problema de desechos para así colaborar con el mejoramiento del medio ambiente.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Bergey, D., Buchanan, R. **BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY**. 8a. edición. Waverly Press. USA (1974)
2. Besch, E. Environmental Quality Within Animal Facilities. Laboratory Animal Science 30(2): 385-399. 1980
3. Castillo, R. **ANIMALES DE LABORATORIO EN LAS INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**. 2a. edición. Editorial Ciencias Médicas. Cuba. (1985)
4. Clough, G. **LABORATORY ANIMAL HOUSING**. Alanan Consultancy Services. Inglaterra (1989)
5. Clough, G. **LABORATORY ANIMAL HOUSING**. Medical Research Council. Serie No. 4 Inglaterra (1979)
6. Collins, C.H. **MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**. 1a. edición. Editorial Acribia. España (1989)
7. Contreras, Jesús. Proyecto de planeación, organización y manejo para el bioterio de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Unidad Académica Zaragoza. D.F. Facultad de Veterinaria y Zootecnia. UNAM México 1979
8. DIFCO **MANUAL DE BACTERIOLOGÍA**. Difco Laboratories Inc. Editorial Mirasa. España (1978)
9. Ewing, L. **AN INTRODUCTION TO BEDDING MATERIALS**. Compiled by the Department of Laboratory Animal Medicine. University of the Health Sciences. USA (1988)
10. Green, E. **BIOLOGY OF THE LABORATORY MOUSE**. Editorial McGraw-Hill. USA (1966)
11. Goodman, L, Gilman, A. **LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPÉUTICA**. 6a edición. Editorial Panamericana. Argentina (1982)
12. Henfrey, K.M. **THE DESIGN AND FUNCTION OF LABORATORY ANIMAL HOUSES**. Laboratory Animal Symposia. March. USA (1968)
13. Kraft, L. **THE MANUFACTURE, SHIPPING AND RECEIVING AND QUALITY CONTROL OF RODENT BEDDING MATERIALS**. Laboratory Animal Science. 30(2):366-376. 1980
14. Laliberte, P. **EFFECT OF PELLETTED CELLULOSE BEDDING ON AMMONIA PRODUCTION IN RAT CAGES**. Veterans Administration Medical Center. USA
15. Lane-Petter, W. **THE LABORATORY ANIMALS: PRINCIPLES AND PRACTICE**. Academic Press. Inglaterra (1971)

16. Lennette, E. **MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**. 4a. edición. American Society of Microbiology. USA (1985)
17. Martínez, M. **CONTROL DE CALIDAD DE LOS ANIMALES PARA LABORATORIO**. Bioterio del Laboratorio Nacional de Salud Pública. Secretaría de Salud
18. Medical Research Council Laboratory Animal Center. **The Accreditation and Recognition Scheme for Suppliers of Laboratory Animals**. 2ª edición. Inglaterra. (1974)
19. Myers, D. **CONTROL OF MICROBIAL AND PARASITIC CONTAMINATION IN THE PRODUCTION OF LABORATORY RODENTS**. Laboratory Animal Science. 30(2):330-338. 1980
20. Pakes, S. **GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS**. U.S. Department of Health and Human Services. National Institute of Health. USA (1985)
21. Pelczar, M. **ELEMENTOS DE MICROBIOLOGÍA**. Editorial McGraw-Hill. México (1984)
22. Roswell, Harry. **CUADRO BÁSICO DE LOS ANIMALES EXPERIMENTALES**. Welfare Institute. (1967)
23. Saiz, L. **ANIMALES DE LABORATORIO (PRODUCCIÓN, MANEJO Y CONTROL SANITARIO)**. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. España (1983)
24. Schilling, P. **EL RATÓN**. Temas seleccionados sobre la Medicina de los Animales de Laboratorio. Escuela de Medicina Aeroespacial de la Fuerza Aérea de los Estados Unidos. OPS. (1974)
25. Simmons, M.L. **THE LABORATORY MOUSE**. Prentice Hall Inc. USA (1970)
26. Thibert, P. **CONTROL OF MICROBIAL CONTAMINATION IN THE USE OF LABORATORY RODENTS**. Laboratory Animal Science. 30(2): 339-351. 1980
27. Van Hoosier, G.L. **ENFERMEDADES DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO COMO COMPLICACIONES DE LA INVESTIGACIÓN MÉDICA** (Audiovisual)
28. Van Hoosier, G.L. **MEDICINA Y CIENCIA DE LOS ANIMALES** (Audiovisual)
29. Villalobos, E. **Descripción y Funciones del bioterio de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Nacional del IMSS**. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México (1980)