

Fundación del primer bioterio MPF funcional de Colombia

ANDRÉS F. ZULUAGA, BEATRIZ E. SALAZAR, WILSON GALVIS,
SERGIO A. LOAIZA, MARÍA AGUDELO, OMAR VESGA

CUALQUIER INVESTIGACIÓN DONDE SE EXPERIMENTE CON MODELOS ANIMALES exige que el estado microbiológico y genético de los mismos sea definido desde el principio y verificado periódicamente para garantizar la fiabilidad y certeza de los datos. Buscando producir ratones libres de patógenos murinos en Colombia, se importaron 173 reproductores no emparentados suizos albinos de la cepa ICR que se hospedaron bajo condiciones protocolizadas de aislamiento microbiológico en el Bioterio MPF de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Tras dos años de funcionamiento ininterrumpido, el control microbiológico demostró que los progenitores mantuvieron inalterada la flora con la cual fueron exportados a Colombia, que sus crías portan flora murina idéntica, y que la misma corresponde a la exigida internacionalmente. Diversas pruebas a la integridad de la barrera microbiológica condujeron a la detección y erradicación de un brote infeccioso por Parvovirus murino. El control reproductivo permitió mantener intacta la heterocigocidad de la cepa, denominada Udea:ICR(CD-1).

.....
ANDRÉS F. ZULUAGA: azuluga@medicina.udea.edu.co, Médico y Cirujano, U de A. Estudiante de Maestría CCBB; BEATRIZ E. SALAZAR: bacteziel@hotmail.com, Bacterióloga y Laboratorista Clínica, U de A.; WILSON GALVIS wdjgalvis@hotmail.com, SERGIO A. LOAIZA: seralbloa@hotmail.com, MARÍA AGUDELO: magudelo@interpla.net.co, Estudiantes de Medicina, U de A. Jóvenes Investigadores, U de A, 2001-2003; OMAR VESGA: ovesgam@medicina.udea.edu.co, Médico, Internista, Infectólogo. Coordinador GRIPE. Jefe de la Sección de Enfermedades Infecciosas. Profesor del Departamento de Medicina Interna, U de A.

GRIPE: Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Departamentos de Farmacología y Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Financiado por la Universidad de Antioquia y Colciencias

Correspondencia: Omar Vesga, MD. Carrera 51D # 62-29, oficina 365. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Teléfono: (574) 510-6020. Fax: (574) 510-6021

Parte de estos datos se presentaron en el II Congreso Nacional Investigación y Salud, Bogotá, Colombia, 24-27 de Julio de 2002 [11]. Este trabajo mereció Mención de Honor en el Premio a la Investigación Estudiantil, Universidad de Antioquia, 2002.

PALABRAS CLAVE

ANIMALES DE LABORATORIO

RATONES

ROEDORES

MURIDAE

MODELOS ANIMALES

MICROCLIMA

INTRODUCCIÓN

LOS MODELOS ANIMALES DE INFECCIÓN SON PRERREQUISITO EN EL DESARROLLO DE NUEVOS ANTIMICROBIANOS porque constituyen el único puente disponible entre los datos obtenidos *in vitro* y los resultados de los estudios clínicos (1-3). Las perspectivas futuras de la ciencia del animal de experimentación se fundamentan en restringir, reducir, y reemplazar su uso por técnicas alternativas; además, busca una mayor especialización con el propósito de obtener animales “biológicamente estandarizados” (4). Para poder tratar los animales de laboratorio como sujetos experimentales, los datos obtenidos de ellos tienen que ser fiables y reproducibles, del mismo modo que se exige de cualquier reactivo biológico. En otras palabras, su pureza debe ser comprobada y controlada de forma similar a otros reactivos (químicos o físicos), evitando que cualquier contaminación, biótica o abiótica, pueda distorsionar o invalidar los resultados del proceso experimental (5-7).

Con el fin de asegurar excelente calidad en los reactivos biológicos, la ciencia y tecnología de los animales de laboratorio ha alcanzado un alto grado

de sofisticación y se ciñen a legislación aprobada internacionalmente (8,9). El atraso de los países subdesarrollados en todos los aspectos de esta ciencia conlleva el empleo experimental de animales convencionales, lo cual genera ineficiencia técnica en la investigación e invalidación potencial de los resultados y las conclusiones (10,11). Entre los principales obstáculos que se deben superar se encuentran los exigentes requerimientos técnicos y locativos necesarios para la cría y mantenimiento de animales con condiciones microbiológicas definidas, la definición de un control genético adecuado para la cepa utilizada, la ausencia de control de la pureza microbiológica de los animales, la dificultad para obtener dietas específicas y apropiadas, la falta de entrenamiento del personal involucrado con el uso de los reactivos biológicos, y la ausencia de comités institucionales que regulen el uso eficiente de los animales (5,8,9). Todos estos aspectos implican costos muy elevados que han impedido el desarrollo de instalaciones organizadas y confiables para la producción en Colombia de animales estandarizados biológicamente.

Este artículo describe la ejecución de un proyecto tendiente a superar los obstáculos planteados para establecer un bioterio que produzca permanentemente animales libres de patógenos murinos que puedan emplearse en investigación farmacológica, microbiológica, fisiopatológica o inmunológica. Todos los procedimientos se hicieron siguiendo los lineamientos del Comité de Ética para el uso de Animales de Experimentación del Centro de Investigaciones Médicas de la Universidad de Antioquia. Se demuestra la funcionalidad y viabilidad del establecimiento de una colonia libre de patógenos murinos (o MPF, del inglés Murine Pathogen Free), bien definida microbiológicamente, y con características genéticas, patológicas, nutricionales y medioambientales controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

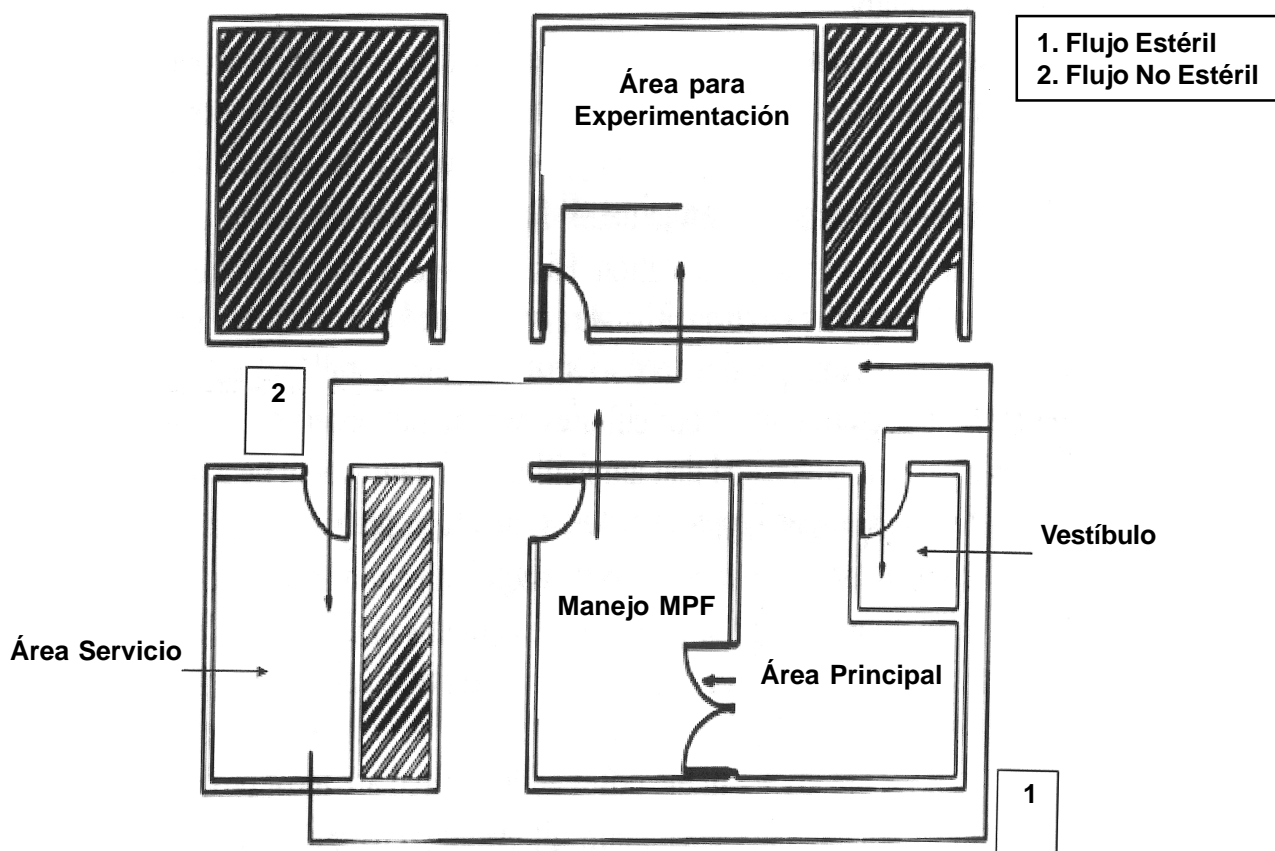
Planeación y diseño

A FINALES DE 1997 se decidió desarrollar un bioterio que permitiera producir y mantener ratones de óptima calidad para experimentación con diversos modelos animales de infección humana. Para ello se consultó a expertos en Estados Unidos y Canadá y se revisó la información disponible en la literatura especializada. En los 24 meses subsiguientes se ubicaron y organizaron las instalaciones según dichos requerimientos, imitando la división funcional utilizada por la mayoría de los centros académicos de referencia en la materia. Para el mantenimiento de los animales se seleccionó un método práctico y eficiente, consistente en un equipo de microaislamiento que permite reducir significativamente los costos en comparación con la construcción de un macroambiente filtrado. Se diseñaron las estrategias para asegurar los requerimientos macroambientales (temperatura, ruido, intensidad de luz, regulación de ciclos de luz-oscuridad) mediante la instalación de equipos de aire acondicionado, aislamiento sonoro, fotosensores, interruptores manuales de flujo eléctrico, y barreras para controlar el acceso de animales y humanos. Durante los últimos 6 meses se determinaron el origen y la calidad de los requerimientos microambientales (cama, agua y alimentación), el proceso óptimo de esterilización de cada elemento de contacto entre los animales y el medio ambiente, y los protocolos para control microbiológico, reproductivo y genético. La adquisición, el funcionamiento y la aplicabilidad de cada sistema fueron verificados antes de importar los animales.

Preparación del macroambiente

EL BIOTERIO DE ANIMALES LIBRES DE PATÓGENOS MURINOS se encuentra en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia en el norte de Medellín, Colombia. Se divide en tres áreas separadas: una con barrera microbiológica para apareamiento, cría y levante (área principal); otra sin barrera microbiológica para procedimientos experimentales con los animales MPF (área para experimentación), y otra para lavado y esterilización (área de servicio). El área principal se subdivide en: a) un vestíbulo para lavado de manos con jabón yodado seguido de frotación con alcohol glicerinado al 70% y cambio de ropa de calle por guantes, mascarilla, gorro, polainas y pijama, todas prendas de uso exclusivo de esta área; b) un salón para cría y levante de animales libres de patógenos murinos, el cual está aislado del ambiente externo por muros de ladrillo hasta el techo, puertas de madera de flujo unidireccional y acceso restringido, e icopor como aislante sonoro; está equipado con luz halogenada regulable y aire acondicionado prefiltrado que retiene macropartículas y mantiene la temperatura ambiente en $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$; y c) un salón para la manipulación no experimental de animales libres de patógenos, donde se ejecutan bajo condiciones de esterilidad los cambios diarios del microambiente, esto es, cajas, cama, agua, alimento y vitaminas, y se determinan el sexo y número de las crías, la selección de animales para uso experimental, y el retiro e instalación de nuevas tríadas reproductoras. Cada una de las tres áreas del bioterio tiene su propia organización funcional y la circulación por los pasillos de las instalaciones sigue un sistema de flujos separados que demarca las zonas limpias de las sucias para disminuir el riesgo de contaminación cruzada (figura N° 1).

Figura 1
DISTRIBUCIÓN FUNCIONAL Y SISTEMA DE FLUJOS
DEL BIOTERIO MPF DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA



Equipos para el mantenimiento animal bajo condiciones controladas

EN EL SALÓN DE CRÍA Y LEVANTE se ubicó un sistema habitacional de microaislamiento (One Cage™ Micro-Isolator™ High Density Housing System, Lab Products Inc, Seaford, DE, USA) que constituye la barrera microbiológica entre los animales y el ambiente (12). El equipo tiene sistemas de ventilación y extracción de aire protegidos con prefiltros de poliéster y filtros HEPA que retienen el 99.99% de las partículas de 0.3 µm o mayor diámetro. Un sistema entrega y el otro retira el

aire simultáneamente, manteniendo constantes la temperatura, la humedad y las concentraciones gaseosas de cada uno de los 98 cubículos del microaislador, los cuales están conectados de manera independiente a los ductos de ingreso y egreso de aire. La individualización del microambiente de cada cubículo elimina el riesgo de diseminación aérea de agentes infecciosos entre uno y otro, o entre grupos de los mismos (12,13).

El salón para la manipulación no experimental de animales MPF ubicado dentro del área principal está equipado con una cámara de flujo laminar diseñada

para garantizar la esterilidad en el manejo de los animales alojados en el microaislador (Stay Clean L/F Worbench B[®], Lab Products Inc, Seaford, DE, USA). Su uso requiere vestir guantes y ropa quirúrgica estériles, además de la desinfección física de cada material que ingrese al equipo. Para este fin se emplea una solución de yodo polietoxipolipropoxipolietoxietanol al 13.2% (Rapydine[®], Electroquímica West SA, Medellín, Colombia) y alcohol metílico al 70%.

Los equipos se someten a mantenimiento periódico que incluye el cambio de los prefiltros y la evaluación técnica de su funcionamiento mecánico según las recomendaciones del fabricante.

Preparación del microambiente

PREVIO A SU UTILIZACIÓN EL MICROAISLADOR se lavó con agua y jabón neutro y se sometió a esterilización química mediante vaporización con tabletas de formaldehído (14), dispuestas a razón de una cada 20 cm, a lo largo de 14 varillas metálicas de 194 cm. Cada varilla va dispuesta en el interior de uno de los 14 conductos del sistema impulsor y extractor de aire, de manera que una tableta de formaldehído esteriliza dos cajas, una a cada lado del equipo. Al cabo de 12 horas de exposición, se verificó el proceso de esterilización por medio de 14 platos de agar chocolate (Becton Dickinson & Company, Cockeysville, USA), uno para cada conducto interno. Al completarse 24 horas de exposición se retiraron los artefactos con las tabletas de formaldehído y se incubaron los medios de cultivo a 37°C en CO₂ durante 72 horas. Se cerró herméticamente el sistema habitacional de microaislamiento y se dejó en modo de aireación durante 48 horas. Tras verificar el éxito del proceso, se llenó con 98 cubículos estériles, 49 a cada lado (One cage[™], Labs Products Inc, Seaford, DE, USA).

Importación, transporte y manipulación de los reproductores

SE IMPORTARON 115 HEMBRAS VÍRGENES Y 58 MACHOS ADULTOS, no emparentados, suizos albinos, de la cepa Hsd:ICR(CD-1)[®] (Harlan-Sprague Dawley Company, Indianapolis, IN, USA). Ingresaron a Medellín, Colombia, por vía aérea, transportados en 5 contenedores especiales equipados con filtros de fibra de poliéster y con capacidad para 40 ratones cada uno (Filtered Shipping Container[®], Harlan Sprague Dawley Company, Indianápolis, IN, USA). Los contenedores arribaron sin ser abiertos a las instalaciones del Bioterio MPF de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia 12 horas después de abandonar su planta de origen. Empezando por los que contenían hembras y en sucesión individual, los 5 contenedores fueron desinfectados con alcohol metílico al 70% antes de su ingreso al área principal y esterilizados con glutaraldehído al 2.4% (Cidex[®], Advanced Sterilization Products, Irvine, CA, USA) antes de introducirlos en la cámara de flujo laminar. Allí dos operarios con vestimenta quirúrgica estéril abrieron la tapa superior del contenedor evitando obstaculizar el flujo de la cámara, examinaron —sin tocarlos con las manos— el estado de salud de los ratones y, utilizando pinzas estériles, trasladaron grupos de 5 ratones del mismo sexo por cada cubículo del microaislador (9).

Control del microambiente

EL MICROAMBIENTE DE LOS ANIMALES MPF consiste en el interior del cubículo donde se aloja cada grupo de 5 adultos, el aire filtrado y renovado ininterrumpidamente 24 horas al día, el agua, el alimento y la cama. La producción de desechos orgánicos de los animales obliga a verificar y reemplazar cada 12 horas cualquier microambiente no ideal por otro estéril. Inicialmente se utilizó una dieta balanceada autoclavable específica para roedores (Rodentina[®], Purina Co, Mosquera, Cundinamarca, Colombia),

la cual fue cambiada a los 12 meses por una dieta importada (NIH-31 Rodent Auto[®], Zeigler, Gardeners, PA, USA) debido a la discontinuación del primer producto en el país. El agua se esterilizó por autoclave antes de suplementarla con bisulfito sódico de menadiona, 0.4 mg/ml (MSB, Sigma, St. Louis, MO, USA). Como cama para los animales se empleó viruta de madera virgen previamente cernida y autoclavada. Cada paquete de esterilización incluía un cubículo del microaislador con un centímetro de espesor de cama, un sistema de alimentación e hidratación debidamente surtido (Modular Diet Delivery System[®], Lab Products Inc, Seaford, DE, USA), y doble envoltura de tela para autoclave. Cada ciclo del autoclave a vapor se programó para durar 20 minutos a una presión de 1.2 kg/cm² y temperatura máxima de 121°C (Estericol QG-620S[®], Trident Medical Corporation, Taipei, Taiwan, China). Este proceso tiene lugar antes de introducir los paquetes al área principal.

El control microbiológico del autoclave se realiza bisemanalmente utilizando esporas de *Bacillus stearothermophilus* (Attest[™] Biological Indicador, 3M Health Care, St Paul, MN, USA). El control microbiológico del microaislador se realiza después de cada esterilización semestral, como se describió arriba. Además del control bisemanal de la calidad del proceso de autoclavado, el agua, el alimento y la cama se someten anualmente al mismo control, tomando muestras al azar del 10% de los cubículos una vez destapado el paquete estéril dentro de la cámara de flujo laminar e inmediatamente antes de exponer los animales al nuevo microambiente. Los especímenes se tomaron y procesaron así: a) dos muestras de 50 mL de agua, tomadas directamente del surtidor estéril, se pasaron por sendos filtros de membrana de 0.2 µm tipo jeringa (Nalgene, Rochester, NY, USA), cada filtro se inoculó en 10 mL de Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, UK) y se incubó 18 horas a 37°C en aire ambiente; b) un pellet del alimento se tomó de cada cubículo, se diluyó en 10 mL de agua estéril, y se inoculó 1 mL

en un plato de agar sangre que se incubó 18 horas a 37°C en aire ambiente; c) 100 mg de viruta se tomaron de cada cubículo y se procesaron igual que el alimento.

Control reproductivo y genético

LA AUSENCIA DE CONSANGUINIDAD DE LA CEPA Hsd:ICR(CD-1)[®] elimina la necesidad de genotipificarla. La heterocigocidad se mantuvo implementando un método sistemático de control reproductivo para colonias exocriadas pequeñas, adaptado del propuesto por Poley (15,16). El primer componente es un sistema de cruce por tríadas, en el que un macho se aparea con dos hembras, y la parentela más la descendencia ocupan un cubículo en el microaislador hasta el destete de la camada. Los reproductores importados constituyeron la colonia fundadora (FO) y de ellos descendieron los reproductores de las colonias de expansión, las cuales se identifican según la tríada de procedencia (16). El segundo componente es un sistema de identificación mediante el cual se dividió la colonia de expansión en dos grupos: animales reproductores y animales para experimentación. El primer grupo se subdividió en reproductores activos —conformando tríadas— y reproductores en reposo; estos últimos se marcaron con muescas en las orejas cuya disposición permite identificar 99 reproductores diferentes (6). Cada tríada recibió una registro alfanumérico que permitió identificar y trazar las relaciones ancestrales de cada animal. Dicho registro está codificado de manera que para cada tríada el número total de caracteres involucrados es siempre par, de manera que la primera mitad de estos símbolos indica el origen del macho y la mitad restante señala el de las dos hembras (hermanas). La endogamia (inbreeding) es evidente cuando la identificación de la tríada presenta una secuencia consecutiva de símbolos iguales en ambas mitades. En este sistema, la constitución genética se controla básicamente por los machos de cada

tríada (17). El conjunto de 7 tríadas reproductoras constituye una septotriada, cada una se identifica con el nombre de un municipio del Departamento de Antioquia asignado en orden alfabético en la medida en que se van formando nuevas septotriadas. El segundo grupo (animales para experimentación) se ubicó según la edad de los animales en las hileras sobrantes del microaislador mientras cumplían la edad requerida para su aprovechamiento experimental. El tercer componente es un sistema de producción que permite determinar la velocidad de crecimiento de la colonia aplicando la siguiente fórmula, modificada de (18)

$$\text{Número de madres necesarias} = [(3+W) \times n] / [F \times A],$$

donde W (weeks) es el número máximo de semanas requerido para la producción de una camada; n (number) es el número de animales que se busca producir por semana; F (females) es el número de hembras en cada grupo de cría, por ejemplo, hay dos hembras por grupo en el sistema de tríadas; A (average) es el promedio de crías por camada para la cepa en reproducción; 3 es una constante dada por la duración máxima del estro en las hembras.

Para mantener la tasa anual de producción los animales de cría son reemplazados periódicamente, permitiendo un máximo de 9 meses de vida reproductiva (19).

Manejo de la colonia de animales libres de patógenos murinos

SE DISEÑÓ UN FORMULARIO PARA REGISTRO DIARIO DEL ESTADO DE LOS ANIMALES, la fecha y hora de la observación, el cual incluye el nombre del responsable, la temperatura del cuarto, el número y la condición general de los animales, y el estado del microambiente de cada cubículo. Dicho registro se pasó cada 24 horas todos los días del primer año, y cada

12 horas a partir del segundo año de funcionamiento del bioterio. El ciclo de luz y oscuridad se ajustó para proporcionar a los animales 11 horas de luz por 13 horas de oscuridad. Cada cubículo posee una tarjeta de identificación en la cual se registran el código de la tríada, la edad de los reproductores, la fecha de cruce, el número de nacimientos, el número de destetes discriminados por sexo, y el número de animales muertos discriminando el canibalismo de las demás causas de muerte. En caso de muerte por razones diferentes a trauma, se estableció un protocolo de necropsias que incluye la evaluación macroscópica de todos los órganos del animal y la toma apropiada de muestras para estudio histopatológico y microbiológico. Los datos de la curva de peso contra edad se obtuvieron pesando toda la producción del bioterio (conjuntos de 5 animales del grupo para experimentación) en una balanza mecánica de tres brazos especial para roedores (Ohaus 700, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA).

Equipo para alojamiento temporal de los animales para experimentación

CUANDO LAS CRÍAS MANTENIDAS EN EL SISTEMA HABITACIONAL DE MICROAISLAMIENTO alcanzan 6 semanas de edad y un peso de 25 ± 2 gramos, se trasladan al área para experimentación, la cual está separada del área principal por muros de ladrillo hasta el techo, corredores y puertas. Aquí sólo se permite el ingreso de animales MPF y de personal que manipula exclusivamente este tipo de animales; la estadía máxima en el área de experimentación antes del sacrificio de cualquier animal es 6 días. Esta área está equipada con un sistema modular vertical que contiene 60 cubículos sin filtros, diseñado para mantener los animales durante los experimentos en condiciones de alojamiento idénticas a las empleadas para la cría y levante de los ratones, pero sin barrera microbiológica (See Through™ Suspended, Lab Products Inc, Seaford, DE, USA).

Control microbiológico practicado a los animales

PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ANIMALES se elaboró un programa para la detección de parásitos, hongos, bacterias y virus, basado en protocolos industriales ya probados para ratones MPF (20). Para el cálculo del tamaño de la muestra se empleó la siguiente fórmula (21)

Número de animales en la muestra = $\log 0.05 / \log n$, donde n representa el porcentaje de animales normales, según la prevalencia de la enfermedad que se va a detectar. Este número se repartió equitativamente según el género y el porcentaje de cada subgrupo poblacional dentro de la colonia, incluyendo recién nacidos, destetes, reproductores activos y reproductores inactivos. Los animales, escogidos al azar, fueron llevados uno a uno a la cámara de flujo laminar para inducción de anestesia con halothane (Fluothane®, Zeneca, Runcorn, Cheshire, UK).

Los especímenes de pelo necesarios para identificación de ectoparásitos y hongos se obtuvieron cepillando la piel del cuello, la cabeza, la región perianal y la región abdominal del ratón mientras se le suspendía de la cola sobre un plato de Petri. Los especímenes fueron observados directamente bajo el estereoscopio y teñidos con hidróxido de potasio al 10% (KOH) para visualización microscópica; el cultivo para hongos se hizo en platos con agar Sabouraud y Mycosel sellados y protegidos de la luz durante 2 semanas a temperatura ambiente (22-27°C) (Becton Dickinson & Company, Cockeysville, MD, USA). Para la búsqueda de endoparásitos en materia fecal se visualizaron los especímenes en lugol y en solución salina al 0.85%.

Para el control bacteriológico se tomaron con hisopo muestras de la piel cubierta de pelo, el conducto auditivo externo, el tracto respiratorio superior y el ano. Los especímenes fueron visualizados microscópicamente bajo tinciones de Gram,

KOH y Ziehl Neelsen (ZN), e incubados durante 48 horas a 37°C en aire ambiente después de inoculados en agar Columbia suplementado con sangre de cordero al 5%, agar chocolate, agar MacConkey y agar Salmonella-Shigella (Becton Dickinson & Company, Cockeysville, MD, USA). Adicionalmente, los mismos especímenes fueron depositados en tioglicolato inmediatamente después de tomados, y se cultivaron en un sistema de anaerobiosis una vez inoculados en agar Columbia suplementado con sangre de cordero al 5% (GENbag anaer, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), incubando durante 7 días a 37°C en atmósfera con CO₂ al 10%. Un espécimen adicional del tracto respiratorio superior se inoculó en agar sangre y se incubó a 37°C en atmósfera con CO₂ al 5% para detectar *Streptococcus pneumoniae*. Los aislamientos aerobios fueron subcultivados para identificación primero por género (pruebas bioquímicas) y luego por especie, utilizando identificación automatizada (Vitek Systems®, BioMérieux, Hazelwood, MO, USA) o sistemas API para aerobios (API BioMérieux, Inc., La Balme Les Grottes, Francia) y anaerobios (Rapid ID32A, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Las muestras de sangre para serología viral se obtuvieron por punción cardíaca o retroorbital según el volumen requerido para el análisis, se diluyeron en PBS 0.1 M pH 7.0, se dispusieron en un contenedor a -20°C, y se enviaron a un centro especializado en diagnóstico viral para animales de laboratorio (Taconic Anmed, Rockville, MD, USA). La toma de muestras se realizó siguiendo protocolos descritos en la literatura (22,23).

Derivación por histerectomía

SE ESTADARIZÓ ESTA TÉCNICA con el objetivo de ejecutarla con éxito en caso de emergencia por contaminación de la colonia. Se formaron dos cruces de un macho por tres hembras vírgenes cuyo estro se sincronizó al exponerlas al macho según el efecto descrito por Whitten, el cual permite

igualar la fecha probable de parto de las tres hembras muy cerca de 21 días después de la monta (24-26). Con base en dicho efecto, se dejó avanzar la gravidez de las tres hembras hasta el día del parto de la primera (nodriza) y acto seguido se sacrificó por luxación cervical una de las dos hembras grávidas restantes (la que mostrara signos de preñez más avanzada). De inmediato se introdujo el cadáver durante 30 segundos en 500 mL de alcohol al 70% y, utilizando técnica estéril, se disecó la piel adyacente al abdomen, se expuso el contenido de la cavidad abdominal, se pinzaron los cuernos uterinos, y se disecó el cuerpo uterino sobre la unión útero-vaginal. Finalmente, se disecaron las membranas ovulares, se extrajeron los fetos uno por uno, y se reanimaron mediante masaje corporal cuidadoso con gasa estéril. Las placentas fueron separadas para control microbiológico. Previamente se había separado orina de la nodriza en un recipiente estéril, la cual se empleó para impregnar las crías obtenidas mediante rederivación. El último paso consistió en sustituir las crías biológicas de la hembra nodriza por las crías rederivadas. La última de las tres hembras se empleó de igual modo el mismo día si su preñez estaba a término; en caso contrario se descartaba del programa de rederivación.

RESULTADOS

Integridad del macroambiente y costos de funcionamiento

TRAS DOS AÑOS de funcionamiento, se documentó un evento de ruptura de la barrera microbiológica primaria en el Bioterio MPF, el cual fue resuelto sin necesidad de sacrificar la colonia entera gracias a la eficacia de los equipos de microaislamiento (ver abajo). Otro evento riesgoso de contaminación sucedió al emplear 7 cajas del microaislador cuya fecha de esterilización superaba por dos días el límite permitido de 14 días; aunque no hubo con-

taminación detectable, el incidente obligó a sacrificar una septotriada completa con sus crías. El costo de funcionamiento del bioterio para 173 reproductores activos ascendió a US\$39.000 en el primer año y a US\$15.928 en el segundo, sin incluir el costo de los equipos especiales para el alojamiento y el mantenimiento de los animales.

Eficiencia de los equipos para mantenimiento animal bajo condiciones controladas y resultado de los controles microbiológicos

NO SE PRESENTARON ALTERACIONES MECÁNICAS durante todo el tiempo de funcionamiento del microaislador y la cámara de flujo laminar. Los controles microbiológicos efectuados cada dos semanas al equipo de esterilización confirmaron consistentemente la eficacia del proceso de esterilización. El control microbiológico realizado al microaislador tras su esterilización química semestral con formaldehído no detectó crecimiento de bacterias.

Integridad del microambiente

EL ANÁLISIS DEL CONTENIDO DIETÉTICO del alimento proporcionado a los animales mostró ceniza máximo 8%, fibra 4%, grasa 5% y proteína 22% (análisis realizado por el fabricante). El control microbiológico realizado al agua suplementada con vitamina K, al alimento y a la viruta de la cama confirmó la esterilidad del microambiente.

Control reproductivo y genético

NO HUBO INCIDENTES DE CONTAMINACIÓN GENÉTICA; el sistema establecido permitió mantener una producción de 130 ratones / semana con 70 hembras reproductoras en promedio. Durante el primer año de funcionamiento se formaron 9 septotriadas.

Manejo de la colonia

LA TABLA 1 resume las variables de producción de las triadas del Bioterio MPF comparadas con las cifras de una compañía norteamericana líder en tecnología de animales de laboratorio (19,20). La producción demostrada es óptima para la cepa murina que compone la colonia del Bioterio MPF de la Universidad de Antioquia. La tabla 2 muestra las características reproductivas de la colonia, también óptimas. El aprovechamiento experimental de hembras y machos fue de 100 y 10%, respectivamente, permitiendo la ejecución de 76 experimentos, en promedio 50 ± 18 ratones por experimento. El peso promedio y la desviación estándar a las 6 semanas de edad fueron 23.1 ± 0.98 gramos. Las figuras 2A y 2B ilustran las curvas de crecimiento para machos y hembras, respectivamente, comparándolas con los resultados presentados por otros autores (19). Durante el primer año de funcionamiento 13 reproductores fallecieron inesperadamente. La principal causa de muerte fue la complicación obstétrica (38%), ninguna de etiología infecciosa. La figura 3 ilustra todas las causas de muerte distribuidas por frecuencia.

Figura 2A
CURVA DE CRECIMIENTO PARA MACHOS
DE LA CEPA UDEA:ICR(CD-1)

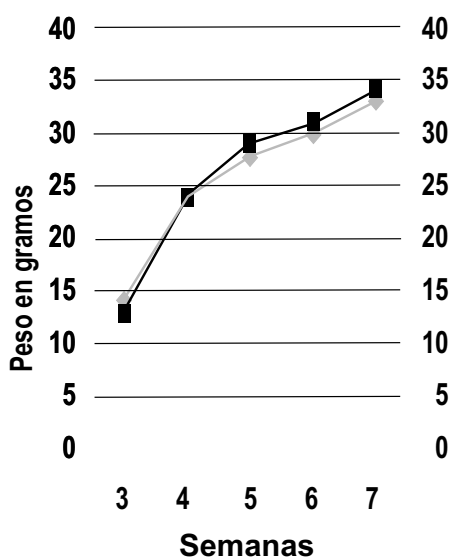
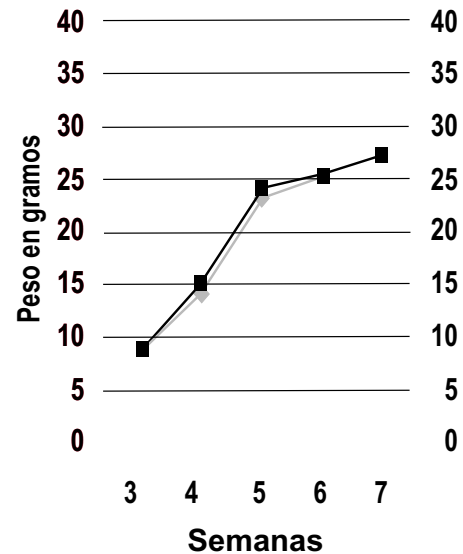


Figura 2B
CURVA DE CRECIMIENTO PARA HEMBRAS
DE LA CEPA UDEA:ICR(CD-1)



◆ Undea:ICR(CD-1)
■ Tac:Icr:Ha(ICR)

Figura 3
DISTRIBUCIÓN DE CAUSAS DE MUERTE
INESPERADA DE 13 REPRODUCTORES

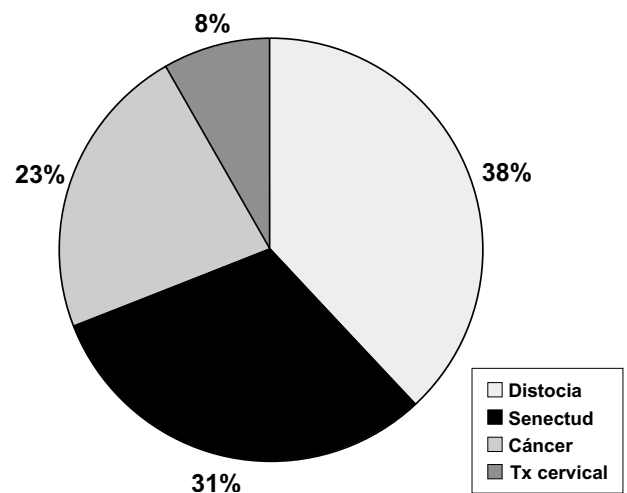


Tabla N° 1
PRODUCTIVIDAD DE LOS RATONES DEL BIOTERIO MPF DE LA UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA COMPARADA CON LA DE UN LÍDER COMERCIAL DE ESTADOS UNIDOS
(TACONIC FARMS INC.)

CRITERIO	Cepa Udea:ICR(CD-1)			Cepa 129S6/SvEvTac		
	Promedio±DE	Rango	Número Evaluado	Promedio±DE	Rango	Número Evaluado
Tamaño camada al nacimiento	9.0 ± 3.8	1 - 19	201 camadas	6.3 ± 0.9	1 - 11	112
Tamaño camada al destete	8.0 ± 2.7	1 - 13	183 camadas	6.4 ± 0.9	2 - 11	107
Semanas entre el apareamiento y la primera camada	3.4 ± 0.9	2 - 6	24 triadas	3.7 ± 0.5	3 - 4	25
Semanas entre cada camada	4.2 ± 1.2	2 - 8	40 camadas	-	-	-
Semanas de productividad de reproductores	21.9 ± 10	7 - 37	24 triadas	23 ± 8	5 - 34	25

Tabla N° 2
CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LOS RATONES
DEL BIOTERIO MPF DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Característica	%	Número evaluado
Triadas reproductoras estériles	4.0	25 triadas
Fracción de lactantes hembras al momento del destete	58.7	1488 destetados
Canibalismo de toda la camada	8.8	204 camadas
Canibalismo que afecta ≥ 1 recién nacido en la primera camada	8.0	50 camadas
Mortalidad recién nacidos, excluido canibalismo	8.1	1628 recién nacidos
Mortalidad recién nacidos primera camada, excluido canibalismo	2.3	311 recién nacidos

Control microbiológico practicado a los animales

EL TAMAÑO DE LA POBLACIÓN en el momento de realizar el control microbiológico era de 475 animales, distribuidos así: 22% reproductores activos, 40% destetes, 27% crías lactantes, y 11% reproductores inactivos. El tamaño de la muestra necesario para detectar cualquier microorganismo no tolerado presente en el 30% de la población fue de 8 animales, los cuales fueron sacrificados con el fin de obtener un volumen de suero suficiente para la detección de anticuerpos virales en el panel ampliado, que incluye todos los virus prohi-

bidos en colonias MPF. Los animales empleados fueron 2 reproductores activos (1 macho y 1 hembra), 3 destetes (2 hembras y 1 macho), 2 lactantes (1 hembra y 1 macho), y 1 reproductor inactivo (1 macho).

En ningún caso se detectó la presencia de hongos, endoparásitos ni ectoparásitos. Los estudios microbiológicos permitieron analizar 99 cepas bacterianas, todas toleradas en animales libres de patógenos murinos. Se logró identificar el 96% de las cepas hasta especie. El 4% restante correspondió a cocos Gram positivos de crecimiento disgónico que no se pudieron aislar luego del ter-

cer subcultivo, y que no correspondían a *Streptococcus pneumoniae*, el único miembro de familia Streptococcaceae que no es tolerado en animales libres de patógenos murinos. Ni este patógeno, ni ninguna especie de bacteria no tolerada fueron aislados en los controles microbiológicos. La tabla 3 muestra los aislamientos bacterianos distribuidos según el género y la región anatómica de donde se obtuvieron.

Las muestras para serología viral fueron enviadas a Rockville la primera semana de abril de 2003. Siete de los 8 ratones fueron negativos por ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) e IFA (indirect fluorescent antibody) para las 17 especies virales descritas en la tabla 4, pero el ratón número 3, un macho reproductor asintomático y sano, mostró anticuerpos por ELISA contra Parvovirus Murino (MPV). La exposición del ratón 3 a MPV fue confirmada mediante IFA, a la vez que fue descartada su exposición al Virus Diminuto Murino (MVM) mediante HAI (haemagglutination inhibi-

tion). Todos los animales reproductores que habían estado en contacto directo (compañeros de cubículo en el microaislador) o indirecto (compañeros de contactos directos) con los ratones de la primera generación (F0) y generaciones posteriores (F1 a F3) de los cuales se derivó el ratón 3 fueron sangrados y puestos en cuarentena, y toda su descendencia fue sacrificada. Esto representó el 40% de la colonia Udea:ICR(CD-1). Se sangró el 10% de los animales que no tuvieron contacto alguno con el caso índice, sus progenitores, ni su descendencia. Todos los contactos (24 ratones reproductores) y no contactos (16 ratones reproductores) del caso índice fueron negativos para MPV por ELISA. Del grupo de contactos directos, el ratón número 24 reveló positividad para MPV por ELISA, pero se demostró su falsa positividad mediante IFA. La positividad del ratón 3 para MPV provocó que, en total, el 10% de los animales de la colonia y el 44% de los reproductores fuesen estudiados por serología viral.

Tabla N° 3
DISTRIBUCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS DE ESPECÍMENES DE LA PIEL, EL CONDUCTO AUDITIVO EXTERNO, EL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR Y EL ANO DE 8 RATONES SELECCIONADOS AL AZAR PARA LOS CONTROLES MICROBIOLÓGICOS

Género y especie (n = 8 ratones)	PIEL	CAE *	TRS †	ANO	Aislamientos por especie (%)	MPF Tolerado
<i>Enterococcus</i> spp.	3	3	2	3	11 (12)	SI
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	1	1	3 (3)	SI
<i>Staphylococcus</i> coag. neg.	9	7	10	4	30 (30)	SI
<i>Streptococcus</i> β-hemolyticus	3	0	9	2	14 (14)	SI
<i>Escherichia coli</i>	2	0	6	8	16 (16)	SI
<i>Proteus</i> spp.	0	0	1	1	2 (2)	SI
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0	0	1	0	1 (1)	SI
<i>Corynebacterium striatum</i>	4	2	7	5	18 (18)	SI
CGP** crecimiento disgónico	1	1	0	2	4 (4)	SI
Cultivo aerobio estéril	1	1	0	0	-	-
Anaerobios	0	0	0	0	-	SI
TOTAL AISLAMIENTOS	23	13	37	26	99 (100)	

* CAE = Conducto Auditivo Externo

† TRS = Tracto Respiratorio Superior

**CGP = Cocos Gram Positivos

Tabla N° 4
RESULTADOS DEL PANEL SEROLÓGICO AMPLIADO REALIZADO A 8 RATONES DEL BIOTERIO MPF DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA. EVALUADOR: TACONIC ANMED

AGENTE	MÉTODO	RESULTADOS DE CADA RATÓN [n = 8]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
MVM	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
MVM	HAI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI
MPV	ELISA	-	-	+	-	-	-	-	-
MPV	IFA	NI	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI
PVM	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
REO3	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
MHV	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
KV	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
GDVII	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
SEN	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
LCM	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
MAV	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
ECTR	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
POLY	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
EDIM	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
MYCO	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
MCMV	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
MTV	IFA	-	-	-	-	-	-	-	-
HAN	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-

MVM: Minute Virus of Mice; **MPV:** Mouse Parvoviruses; **PVM:** Pneumonia Virus of Mice; **REO3:** Reovirus Type 3; **MHV:** Mouse Hepatitis Virus; **KV:** K virus; **GD-VII:** GD-VII; **SEN:** Sendai; **LCM:** Lymphocytic Choriomeningitis; **MAV:** Mouse Adenovirus; **ECTR:** Ectromelia; **POLY:** Polyoma; **EDIM:** Epizootic Diarrhea of Infant Mice; **MYCO:** Mycoplasma pulmonis; **MCMV:** Mouse Cytomegalovirus; **MTV:** Mouse Thymic Virus; **HAN:** Hantaan; **NI:** No Indicado; -: Serología Negativa; +: Serología Positiva.

Derivación por histerectomía

PARA LA DERIVACIÓN POR HISTERECTOMÍA se emplearon dos cruces (1 macho por cada 3 hembras). Se obtuvo una nodriza por cada cruce, y 3 de las 4

hembras restantes presentaban madurez gestacional al momento del parto de las nodrizas. De ellas se obtuvieron 23 crías vivas mediante derivación por histerectomía cuya supervivencia desde el nacimiento hasta el destete fue del 100%.

Discusión

HISTÓRICAMENTE, LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA ha preferido roedores sobre otras especies de animales de laboratorio. Desde 1970 existe en la comunidad científica un interés continuo por el manejo, producción y mantenimiento de los animales de laboratorio (21,27). Dicho interés implica un mejor entendimiento de la naturaleza y dinámica de las enfermedades endémicas en los roedores de laboratorio y la utilización de instalaciones adecuadas para mantener los animales bajo condiciones óptimas pero estrictamente controladas, buscando identificar toda posible contaminación de la colonia con el objetivo de garantizar la calidad y reproducibilidad de los resultados (5, 28).

La esterilización del microaislador con vapores químicos fue necesaria para suplir la carencia de un autoclave especialmente diseñado para este equipo. Aunque dispendioso y de ejecución difícil, el uso de formaldehído en tabletas es aceptado para esterilizar aisladores de animales gnotobióticos (14), los cuales por definición requieren condiciones de esterilidad absoluta.

La vitamina K es fundamental para los procesos de coagulación. La forma de la vitamina más adecuada desde el punto de vista de su biodisponibilidad es la filoquinona (vitamina K₁), sólo encontrada en las plantas verdes (29). Las menaquinonas (vitamina K₂) son sintetizadas por las bacterias intestinales, y los animales coprófagos cubren de esta manera parte de sus necesidades de vitamina K. La deficiencia de vitamina K es una causa bien identificada de trastornos hemorrágicos en animales MPF, y sucede porque el ambiente libre de patógenos restringe la flora intestinal al punto que algunas especies bacterianas productoras de vitamina K no están presentes en animales MPF (29,30). La menadiona (vitamina K₃) es un derivado sintético cuya hidrosolubilidad se logra mediante adición de bisulfito, lo cual permite su utilización en el agua

de consumo y su transformación hepática a menaquinona. Adicionalmente, el bisulfito iguala la disponibilidad de la menadiona respecto a la filoquinona. El riesgo de hipervitaminosis es improbable porque los requerimientos diarios son 1.000 veces inferiores a los niveles tóxicos de menadiona (29,30).

Las cepas exocriadas son de gran utilidad en experimentación farmacológica (1,3), y el mantenimiento de la diversidad genética dentro de cada colonia contrasta con la uniformidad genética propia de las cepas endocriadas. Este hecho obliga a constituir una colonia fundadora cuyos descendientes mantengan la heterocigocidad, fin para el cual se aplican métodos sistemáticos de cruces no aleatorizados que aseguran que no se producirán apareamientos entre hermanos o entre padres e hijos (15,16,31). Una de las formas más simples consiste en establecer pares monógamos a cuyas jaulas de apareamiento se asigna una numeración corrida y, para obtener una generación dada, se cruza un macho de una unidad con hembras hermanas de la unidad vecina; el número de hembras por cada macho varía entre una y cuatro, según las necesidades del bioterio. En los casos en que se cruzan varias hembras con un macho, el cruce es considerado monógamo desde el punto de vista genético, porque las hembras empleadas siempre son hermanas de camada. La limitante más importante de este sistema de cruce para animales exocriados es el tamaño de la población que pueda ser mantenida en las instalaciones, debido a que se presentará una tasa decreciente de heterocigocidad proporcional al tamaño de la colonia (16). Sin embargo, el número actual de reproductores de nuestro bioterio asegura que machos y hembras con antepasados procedentes de una misma unidad sólo llegarían a cruzarse después de 10 generaciones. Dado su origen y uso experimental, las líneas no consanguíneas —como la empleada en el Bioterio MPF de la Universidad de Antioquia— se caracterizan por un alto grado de heterocigosis que hace innecesaria y difícil la definición del perfil genético de la colonia (31).

Los roedores son susceptibles a patógenos específicos incluyendo virus, bacterias, hongos, endoparásitos y ectoparásitos. Todos estos microorganismos pueden inducir enfermedad aguda, crónica o latente, dependiendo en gran parte del estado inmunológico de la colonia. Debido a la confusión que genera el término SPF (sigla del inglés Specific Pathogen Free, libre de patógenos específicos), algunos líderes de la producción de animales de laboratorio como Taconic Farms abandonaron esta expresión y registraron nuevos términos que definen con más precisión el estado microbiológico de sus roedores: animales libres de patógenos murinos (Murine Pathogen Free, MPF), animales con flora restringida (Restricted Flora, RF) y animales con flora definida (Defined Flora, DF) (19). Los animales MPF están definidos por los microorganismos que no pueden tener, esto es, microorganismos que causan enfermedad en los murinos, como *Helicobacter* spp., *Pasteurella pneumotropica*, *Parvovirus*, entre muchos otros claramente identificados, todos los cuales se buscan activamente en controles microbiológicos diseñados específicamente para aislarlos en caso que estén presentes en la colonia. Los animales MPF pueden tener los siguientes microorganismos: *Pneumocystis carinii*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus* β -hemolítico, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (20,22).

Por el contrario, los animales RF no pueden tener estos microorganismos, oportunistas potenciales para el ratón inmunocomprometido. Los animales DF sólo tienen ocho especies de bacterias anaerobias ureasa-negativas en toda su flora (10,32).

Los resultados de los controles microbiológicos permitieron detectar a tiempo y erradicar de la colonia un brote infeccioso por MPV, un problema muy serio y costoso para cualquier bioterio MPF. Dado que la cepa fundadora importada era libre

de este patógeno por certificación del criador, el origen de la contaminación tuvo que ser la cepa murina convencional que rodea la colonia MPF en nuestro bioterio, a pesar de las medidas extremas que se tomaron para evitarlo. Este hecho demuestra que aun cuando se disponga de barreras microbiológicas óptimas, es imperativo separar los animales convencionales de los animales MPF o superiores mediante una distribución arquitectónica diseñada para garantizar que quienes manipulan los primeros nunca pisén o habiten las mismas estructuras que quienes manipulan los segundos, una meta que se alcanzará a finales de 2003, cuando las instalaciones del Bioterio MPF serán trasladadas a la Sede de Investigación Universitaria del Alma Máter.

En todos los aspectos, el protocolo empleado permitió constatar la integridad de las barreras y asegurar la producción de animales de calidad microbiológica definida por la ausencia de ectoparásitos, endoparásitos, hongos, virus, y bacterias patógenas tanto aerobias como anaerobias. Exceptuando el caso de MPV, los microorganismos aislados representan la flora normal de este tipo de roedores en sus diferentes zonas anatómicas, junto con microorganismos oportunistas tolerados, pero claramente definidos, en los animales MPF. Durante los dos primeros años de funcionamiento, el Bioterio MPF de la Universidad de Antioquia ha provisto suficientes roedores para ejecutar 76 experimentos empleando el modelo de infección del muslo y del sistema nervioso central en ratón neutropénico (3,33). Estos modelos requieren la inducción de neutropenia severa ($< 100/\mu\text{l}$), lo cual expone los animales a infecciones piógenas agudas cuyo desenlace es generalmente fatal (14). La calidad de los animales generados en el bioterio ha permitido obtener resultados experimentales con mínima variación y con cero muertes inesperadas o por causa infecciosa no inducida en los animales de experimentación, y con una curva de crecimiento similar a la reportada por los líderes mundiales en la producción de esta cepa (19,34).

Aunque el costo de producción del Bioterio MPF es elevado, no hay alternativas baratas o más económicas. El alto costo se ve muy bien compensado en la indiscutible calidad de los datos, en el uso de menos animales por experimento gracias a la menor variabilidad de los resultados, y en la disminución del sufrimiento animal asociada a condiciones óptimas de reproducción, cría, lactancia y levante exigidas por un bioterio de estas características (14). En conclusión, se demostró la funcionalidad de la colonia murina Udea:ICR(CD-1) mediante una producción ininterrumpida de ratones exocriados de óptima calidad para investigación biomédica, y con un estado microbiológico especificado, controlado y verificado.

SUMMARY

FOUNDATION OF A FUNCTIONAL MURINE PATHOGEN FREE ANIMAL FACILITY IN COLOMBIA

IN ORDER TO GUARANTEE the accuracy of the data, experimentation with animal models requires well defined microbiological and genetic statuses with periodical verification. To produce murine pathogen free mice, an outbreeding program was set up by importing 173 non-related Swiss albino ICR breeders that were hosted under strict conditions of microbiological isolation in the animal facilities of the University of Antioquia Medical Faculty. After two years of uninterrupted reproduction, microbiological control demonstrated unaltered murine flora for both parents and offspring, the same with which original breeders were dispatched to Colombia, complying with current international standards. An outbreak of Murine Parvovirus (MPV) was timely detected and eradicated thanks to strict testing of microbiological barriers. The breeding program allowed the production of animals free of genetic contamination.

Key words: Animals, Laboratory / Mice / Rodentia / Muridae / Models, Animal / Microclimate

REFERENCIAS

1. ZAK O, O'REILLY T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1.527-1.531.
2. BEAM TR JR, GILBERT DN, KUNIN CM. General guidelines for the clinical evaluation of anti-infective drug products. *Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration. Clin Infect Dis* 1992; 15 (Suppl 1): S5-S32.
3. O'REILLY T, CLEELAND R, SQUIRES EL. Evaluation of antimicrobials in experimental animal infections. En: LORIAN V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996: 604-765.
4. DÁVILA AG, ZÚÑIGA JM. La ciencia del animal de laboratorio y el procedimiento experimental. En: ZÚÑIGA JM, TUR MARÍ JA, MILOCCO SN, PIÑERO R, eds. *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*, 1ª ed. Madrid: McGraw Hill; 2001: 3-22.
5. THIBERT P. Control of microbial contamination in the use of laboratory rodents. *Lab Anim Sci* 1980; 30 (Pt 2): 339-351.
6. CABOS NS. Biología general del reactivo biológico. En: ZÚÑIGA JM, TUR MARÍ JA, MILOCCO SN, PIÑERO R, eds. *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*, 1ª ed. Madrid: McGraw Hill; 2001: 23-82.
7. BAKER DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 231-266.
8. MRAD DE OSORIO A, CARDOZO DE MARTINEZ CA. El uso de los animales de laboratorio en la investigación biológica y biomédica: credibilidad y competitividad. *Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia*. 1998: 2-7.
9. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. *Institute of Laboratory Animal Resources. Washington: National Academy Press; 1996*.
10. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Objectives, terminology, and overview of pathogen status. En: *Institute of Laboratory Animal Resources. Infectious diseases of mice and rats*. 3ª ed. Washington: National Academy Press; 1998: 3-12.

11. ZULUAGA AF, SALAZAR BE, RESTREPO JG, GALVIS W, AGUDELO M, VESGA O. Fundación del primer bioterio MPF funcional de Colombia [abstract]. *Biomédica (Bogota)* 2002; 22 (Supl 1): 82.
12. MARTONELL JC, URQUIJO JP. Instalaciones y condiciones ambientales. En: ZÚÑIGA JM, TUR MARÍ JA, MILOCCO SN, PIÑERO R, eds. *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. 1ª ed. Madrid: McGraw Hill; 2001: 153-178.
13. CLOUGH G, WALLACE J, GAMBLE MR, MERRYWEATHER ER, BAILEY E. A positive, individually ventilated caging system: a local barrier system to protect both animals and personnel. *Lab Anim* 1995; 29: 139-151.
14. FERNANDEZ M, FEINSTEIN R, SÁNCHEZ S. Estado sanitario I, Patología: control y prevención en roedores. En: ZÚÑIGA JM, TUR MARÍ JA, MILOCCO SN, PIÑERO R, eds. *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. 1ª ed. Madrid: McGraw Hill; 2001: 203-240.
15. POLEY SM. A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory animals colonies. *Proc Anim Care Panel* 1960; 10: 159.
16. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Genetic MANAGEMENT of Breeding Colonies. En: *Institute of Laboratory Animal Resources. Rodents: Laboratory Animal Management*, 1ª ed. Washington: National Academy Press; 1996: 35-43.
17. SMITH AW. El Ratón. Temas seleccionados sobre medicina de animales de laboratorio. Serie de Monografías # 3. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. 3ª ed. Río de Janeiro: OPS/OMS; 1988: 1-95.
18. UFAW. Animal production and breeding methods. En: *Handbook on the care and management of laboratory animals*, 6ª ed. Longman Scientific & Technical, Longman Group UK Limited; 1987: 18-35.
19. TACONIC FARMS, Inc. Available from: URL: <http://www.taconic.com>
20. TACONIC FARMS, Inc. Taconic animal's microbial status defined. *Research Animal Review* 2000; 2: 4-8.
21. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Long-term holding of laboratory rodents: a report of Committee on Long-term Holding of Laboratory Rodents. *Institute of Laboratory Animal Resources. ILAR News* 1976; 19: L1-L25.
22. ALLEN AM, NOMURA T, eds. *Manual of microbiologic monitoring of laboratory animals*, 2ª ed. Washington: U.S Department of Health and Human Services, Public Health Service; 1994. p.5.
23. WEISBROTH SH, PETERS R, RILEY LK, SHEK W. Microbiological Assessment of Laboratory Rats and Mice. *ILAR J* 1998; 39: 272-290.
24. WHITTEN WK. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J Clin Endocrinol* 1956; 13: 399-404.
25. WHITTEN WK. Effect of exteroceptive factors on the oestrus cycle of mice [letter]. *Nature* 1957; 180: 1.436.
26. WHITTEN WK. Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *J Clin Endocrinol* 1959; 18: 102-107.
27. BOSCH PG. Criteria for producing high quality animals for research. *Lab Anim Sci* 1976; 26: 334-338.
28. MARTORELL JC, URQUIJO JP. Instalaciones y Condiciones Ambientales. En: ZÚÑIGA JM, TUR MARÍ JA, MILOCCO SN, PIÑERO R, eds. *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*, 1ª ed. Madrid: McGraw Hill; 2001: 153-178.
29. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Vitamin tolerance of animals. Committee on Animal Nutrition. Washington: National Academy Press; 1987: 31-38.
30. MARTÍNEZ DE LA VICTORIA E, MAÑAS M, ZÚÑIGA JM. Nutrición y alimentación. En: ZÚÑIGA JM, TUR MARÍ JA, MILOCCO SN, PIÑERO R, eds. *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*, 1ª ed. Madrid: McGraw Hill; 2001: 109-151.
31. MEDINA RJ. Estandarización genética, transgenización y clonación. En: ZÚÑIGA JM, TUR MARÍ JA, MILOCCO SN, PIÑERO R, eds. *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*, 1ª ed. Madrid: McGraw Hill; 2001: 153-178.
32. DEWHIRST FE, CHIEN CC, PASTER B, ET AL. Phylogeny of the defined murine microbiota: altered Schaedler flora. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3.287-3.292.
33. VOGELMAN B, GUDMUNDSSON S, TURNIDGE J, LEGGET J, CRAIG WA. In vivo postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. *J Infect Dis* 1988; 157: 287-298.
34. HARLAN SPRAGUE DAWLEY. Webpage. Available from URL: <http://www.harlan.com>