



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



PERFIL BACTERIOLÓGICO EN UNA COLONIA DE COBAYOS DE BIOTERIO

SILVANA LORETO AVEZÓN CAMPOS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

PROFESOR GUÍA: DRA. MARIA LUISA SÁNCHEZ CH.

SANTIAGO, CHILE

2009



UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
 ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



PERFIL BACTERIOLÓGICO EN UNA COLONIA DE COBAYOS DE BIOTERIO

SILVANA LORETO AVEZÓN CAMPOS

Memoria para optar al Título
 Profesional de Médico Veterinario.
 Departamento de Medicina
 Preventiva Animal.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : M ^a Luisa Sánchez Ch.
PROFESOR CONSEJERO: Consuelo Borie P.
PROFESOR CONSEJERO: Sergio Romero M.

SANTIAGO, CHILE

2009

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
REVISION BIBLIOGRÁFICA	7
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIÓN	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXO 1	47
ANEXO 2	49

RESUMEN

El objetivo de los bioterios es producir y disponer de animales y sus productos para apoyar servicios y trabajos de investigación, requiere producir animales estandarizados, específicos para cada investigación, garantizando a su vez su genética y estado sanitario.

Se estudió la colonia de cobayos del Bioterio del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CPAL) del Instituto de Salud Pública de Chile, Ministerio de Salud, con el fin de conocer su condición sanitaria. De un total de 1566 animales dispuestos en tres corralillos, se muestreó un total de 43 cobayos al azar, proporcionalmente según sexo y categorías. Estos correspondieron a dos machos reproductores, 35 hembras reproductoras, dos crías machos, una cría hembra y tres lactantes. A cada animal seleccionado se le realizó un examen clínico (constantes fisiológicas de temperatura corporal, frecuencia cardíaca, perfusión periférica, condición corporal). La eutanasia se realizó con T61 intracardíaco. Luego de la necropsia se obtuvieron, muestras de torunda nasofaríngea, raspado traqueal, pulmón, hígado, bazo y contenido cecal. Se agregaron hallazgos de tejidos o secreciones alterados.

Considerando los patógenos bacterianos más frecuentes e importantes en cobayos de bioterio, se realizaron cultivos específicos para aislamientos de *Bacillus piliformis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Streptococcus pneumoniae* y *Yersinia pseudotuberculosis*. Para *Bacillus piliformis*, además, las muestras se inocularon en huevos embrionados. Todos los estudios de aislamientos fueron negativos para cada una de las bacterias consideradas. Como hallazgos en el grupo de hembras reproductoras, dos presentaron abscesos subcutáneos con aislamientos de *Bacillus* spp., no correspondiendo a *Bacillus piliformis*. Seis hembras del mismo grupo presentaron abscesos mesentéricos con aislamientos de *Streptococcus* spp., no correspondiendo a *Streptococcus pneumoniae*. Ocho presentaron lesiones hepáticas atribuibles a recorridos larvales de parásitos gastrointestinales.

Se hallaron, además, en una cría y un lactante lesiones hepáticas atribuibles a parásitos gastrointestinales. Complementariamente, las muestras de deposiciones fueron negativas a la presencia de huevos de parásitos gastrointestinales por el método de flotación que detecta altas cargas parasitarias.

Considerando que la colonia de cobayos estudiada es del tipo convencional, su calidad sanitaria es buena.

Palabras claves: Cobayo, bioterio, bacterias patógenas.

SUMMARY

The objective of the biotery to produce and provide animals and their products to support services and research investigations, require to produce standardized animals, specific for each investigation, guaranteeing, at the same time, their genetics and sanitary state.

The colony of the Guinea pigs of the Animal Production Lab Center, of the National Control Department of the Public Health Institute, Department of Health, was studied, in order to know their sanitary condition. From an overall of 1566 animals set in three animal pens, samples were taken from a total of 43 Guinea pigs, which were chosen randomly and proportionally according to sex and categories. These ones corresponded to 2 reproductive males, 35 reproductive females, 2 male offspring, 1 female offspring and 3 weaned. To each selected animal, a clinical test, which consisted of corporal temperature, heart rate, peripheral perfusion and body condition, was taken. The euthanasia was done with T61 intracardiac injection. After the necropsy, sample of nasopharyngeal swab, tracheal, lung, liver, spleen and intestines. Discoveries of tissue or altered secretions were added.

Considering the most frequent and important bacterial pathogens in the Guinea pigs of the biotery, specific culture for isolation of *Bacillus piliformis*, *Bordetella brochiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Streptococcus pneumoniae* y *Yersinia pseudotuberculosis* were made. In the case of *Bacillus piliformis*, the embryed eggs were inoculated with the sample as well. All the cases of isolation for each one of the considered bacteria were negative.

As a discovery, in the group of the reproductive female, 2 presented subcutaneous abscess with isolation of the *Bacillus* spp., not corresponding to a *Bacillus piliformis*. Another six reproductive females of the same group presented mesenteric abscess with isolation of the *Streptococcus* spp., not corresponding to *Streptococcus pneumoniae*. Eight of them presented injuries in the liver, which were likely to be attributed to larval

routes of gastrointestinal parasites. In an offspring and in an unweaned, injury in the liver were also found, due to gastrointestinal parasites most likely. To complement it, the samples of stool were negative to the presence of eggs of gastrointestinal parasites, through the flotation method, which detects high parasitic charges.

Considering that the colony of Guinea pigs researched was a convectional one, its sanitary quality is good.

Keywords: Guinea pig, biotery, pathogen bacteria.

INTRODUCCIÓN

La experimentación con animales es fundamental en las ciencias biomédicas, no sólo para comprender los mecanismos celulares que son la base de la vida, sino también para favorecer el desarrollo de mejores métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades que afectan al ser humano y a los animales. El uso en laboratorio de animales de experimentación es también indispensable para las pruebas de potencia, alcance y seguridad de sustancias biológicas utilizadas en medicina y, en estudios de toxicidad de un gran número de compuestos que se preparan por síntesis química y cuyo uso puede representar un riesgo para la salud. Para esto, los bioterios han recurrido a la estandarización de los animales, para suministrar el animal específico para cada tipo de investigación y, con total garantía de su constitución genética y estado sanitario.

Por razones éticas y etológicas, se ha restringido paulatinamente el uso de animales de laboratorio, desarrollándose modelos no animales para la investigación científica. A pesar del desarrollo cada vez más creciente de estos modelos no animales, aún es indispensable e insustituible el empleo de determinadas especies animales para investigaciones específicas. Esto último sólo es logrado con la utilización de animales que, entre otras características, sean sanitariamente estandarizados, situación que necesariamente pasa por el monitoreo de posibles patógenos. Entre las diferentes especies animales empleadas, las más frecuentes son ratas, ratones, conejos, cobayos, hámster, perros, primates no humanos y gallinas.

Los cobayos son de gran importancia y muy utilizados desde hace mucho tiempo, debido a sus características como tamaño medio, docilidad, facilidad de manejo, tamaño de camada e intervalo generacional de 63 a 73 días. Los usos de esta especie dentro de las investigaciones biomédicas son innumerables y por lo tanto, la salud del cobayo de experimentación es fundamental para la obtención de resultados confiables en los experimentos en que se emplee. Este trabajo propone iniciar un estudio bacteriológico

en la colonia de cobayos existente en el bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile, considerando las bacterias patógenas de mayor importancia y que, aparentemente, podrían influir negativamente en los resultados de las investigaciones que se realicen con estos animales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

DESARROLLO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Los animales de laboratorio son uno de los más valiosos instrumentos que se utilizan en la investigación biomédica (Infante *et al.*, 1998), y su historia corre a la par con la evolución de ella; por lo tanto, se remonta a muchos años antes de nuestra era.

Según Saíz *et al.*, (1983), los primeros intentos de utilizar los animales de laboratorio en investigaciones biológicas tuvieron relación con la denominada patología comparada. Prohibidas las autopsias en cadáveres humanos, los científicos necesitaron buscar, en los animales, el origen y las características de los procesos patológicos que aquejaban al hombre, para deducir sus semejanzas. Aristóteles (384-322 a. C.) estudió las analogías y diferencias entre los órganos de animales y hombre, desarrollo embrionario del pollo y las características del aparato reproductor de los mamíferos. Hipócrates (480-377 A.C.) realizó investigaciones en los animales para interpretar fenómenos biológicos observados en el hombre y, para aclarar la contaminación del medio ambiente. Galeno (130-201 D.C.) mencionó experiencias en toda clase de animales, que le ayudaron a conocer el funcionamiento de la médula espinal. Harvey (1578-1657) pudo abordar sus trabajos, sobre la circulación de la sangre, después de llevar a cabo experiencias en más de 40 especies animales. Claude Bernard (1813-1878) realizó vivisecciones en animales de laboratorio para el estudio de la fisiología.

Con la llegada de la era bacteriológica, se inicia una importante y decisiva utilización de los animales de laboratorio. Desde los primeros trabajos de Pasteur y Koch, los pequeños animales entran a formar parte del “material vivo” imprescindible para identificar los gérmenes de las enfermedades infecto-contagiosas. Pasteur destacó que “los resultados obtenidos por él, mediante experiencias en animales inferiores, eran de inapreciable valor tanto para la medicina humana como veterinaria” (Saíz *et al.*, 1983).

Hoy en día los usos de los animales de laboratorio son múltiples, pero pueden agruparse en los siguientes:

- Diagnóstico de enfermedades humanas y de animales (JALAS, 1992).
- Ensayo y producción de sustancias biológicas (JALAS, 1992).
- Ensayos toxicológicos y prácticas preventivas de la contaminación ambiental (JALAS, 1992).
- Identificación y elaboración de modelos representativos de enfermedades humanas (Infante *et al.*, 1998).
- Prácticas de enseñanzas en universidades y escuelas (JALAS, 1992).
- Reactivos biológicos para obtener y normalizar antígenos y sueros destinados a diagnósticos inmunológicos (Infante *et al.*, 1998).

LOS BIOTERIOS

Corresponden a centros de producción de animales de laboratorio, encargados de mantener líneas genéticamente puras, vigilar sus cruzamientos y abastecer a los laboratorios que no cuentan con animales propios, garantizando así su constitución genética y perfecto estado sanitario. Estos animales deben mantenerse en las condiciones ambientales y nutricionales lo más parecidas posibles a las que disfrutaban en su hábitat natural y, por supuesto, someterse a una permanente vigilancia genética, nutricional, higiénica y epidemiológica (Saíz *et al.*, 1983).

Lamentablemente, al comenzar el desarrollo de los centros de producción de animales de experimentación, su cuidado estaba encomendado a personal subalterno carente de preparación biológica; por lo tanto, los animales carecían tanto de estandarización genética, como de garantía sanitaria (Saíz *et al.*, 1983). En estas

circunstancias, es lógico pensar que los resultados obtenidos carecían de las garantías que exige la rigurosidad científica.

Fue a partir de 1940, cuando se inicia seriamente, el estudio de esta temática que llevó a la creación de la Ciencia de los Animales de Laboratorio que parece estar limitada a países con un mayor desarrollo tecnológico que en la actualidad está alcanzando niveles elevados en muchos países (Saíz *et al.*, 1983; Infante *et al.*, 1998).

Las perspectivas de futuro para el desarrollo de esta ciencia estará basada en dos aspectos: una mayor especialización en la estandarización, con el fin de poder suministrar el animal específico para cada tipo de investigación, garantizando así su constitución genética y estado sanitario (Saíz *et al.*, 1983). Por otra parte, se tiende a restringir su uso y el daño que se les inflige, ya sea por el reemplazo de ellos, reducción de su número y refinamiento de la metodología empleada (Infante *et al.*, 1998; Nicklas *et al.*, 2002; Bailey, 2005).

El rol del médico veterinario en este campo es de real importancia, ya que por su naturaleza y preparación básica, es el más idóneo para solucionar los problemas relacionados con la producción y uso de los animales de laboratorio. “Pretender que se puedan mantener colonias de animales de laboratorio, sin que un veterinario especializado se responsabilice de esta misión, es tan insensato como tratar que funcione un hospital sin contar con un médico que lo dirija” (Saíz *et al.*, 1983).

Hoy en día, para dirigir el trabajo con animales de laboratorio, se requiere haber completado una carrera universitaria en una disciplina biomédica, asistir a un curso y entrenamiento sobre la ciencia de los animales de laboratorio (Rehbinder *et al.*, 1996; Nevalainen *et al.*, 2002; Nicklas *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2007).

Estado sanitario de los animales de laboratorio

Los animales de laboratorio, en general, han sido definidos de diversas formas según sus posibles utilidades prácticas en genética, nutrición, farmacología, ecología y aspectos de salud, para que con su utilización los investigadores puedan obtener resultados efectivos, es necesario que las condiciones dentro del bioterio cumplan con mantener su constitución genética dentro de cada cepa y, sobre todo, que se controle su equilibrio biológico, fisiopatológico y sanitario (Saíz *et al.*, 1983).

Dependiente de la elección del sistema de producción y de la calidad de animales que se desee obtener, se distinguen las siguientes explotaciones de animales de laboratorio (NRC, 1991):

Mantención en aislador: Es la permanencia en una cámara estéril, en la cual es posible tener animales totalmente libres de gérmenes en forma continua, para prevenir cualquier contaminación microbiana.

Mantención de barreras: Una barrera es una cámara de alojamiento que combina aspectos de construcción, equipamiento y métodos operativos que tienden a mantener estable el entorno de los animales. Se minimiza la probabilidad de que microorganismos patógenos, y otros indeseables, tomen contacto con la población animal y su ambiente.

Sin contención: Corresponde al alojamiento sin medidas de prevención para el ingreso de contaminantes patógenos. Los animales mantenidos bajo estas condiciones son designados como convencionales.

Con la instauración de bioterios sanitariamente controlados, ha sido posible una estandarización biótica presuntiva, a través de la mantención de los animales en

condiciones higiénicas apropiadas, evitándose contaminantes procedentes del exterior; sin embargo, manteniendo el desconocimiento de la flora microbiana patógena predominante en el bioterio (Saíz *et al.*, 1983). Por lo mismo, siguen apareciendo enfermedades infecciosas y otras infecciones subclínicas que son las responsables de afectar, considerablemente, la fisiología del animal alterando los resultados de los experimentos en que participan. Por esta razón, es necesario que se establezcan programas de monitoreo de salud animal, con el fin de facilitar a los investigadores datos sobre las variables que puedan influir en los resultados de un experimento (Nicklas *et al.*, 2002).

Clasificación de los animales de laboratorio según su estado microbiológico

La terminología para definir el estado microbiológico en los animales de laboratorio varía mucho, en cuanto a precisión y sentido.

En general, según la flora microbiana que portan y presencia de patógenos, se mencionan los siguientes tipos de animales (NRC, 1997):

"Germ free" o Animales Axénicos: Derivados por histerectomía, criados y mantenidos en aislamiento por técnicas libres de gérmenes, y demostrablemente libres de formas asociadas de vida que incluyen a virus, bacterias, hongos, protozoos y otras formas parásitas saprofitas.

Gnotobióticos: Animales derivados por histerectomía, criados y mantenidos en aislamiento por técnicas libres de gérmenes, y asociados a uno o más agentes no patogénicos, los cuales son conocidos.

Con flora definida: Son animales "Germ free" que han sido intencionalmente asociados con uno o más microorganismos y mantenidos continuamente en aislamiento para prevenir su contaminación por otros agentes.

Libres de patógenos o PF: Animales libres de todos los patógenos demostrables. Para poder usar este término, es necesario que la sub población de animales tenga monitoreos regulares para la detección de los patógenos en cuestión. En la actualidad en una lista de patógenos, estos deben ser especificados.

Libres de patógenos específicos o SPF: Animales libres de una lista específica de patógenos, para esto se requiere la ausencia certificada de los patógenos específicos, soportada en frecuentes pruebas para la detección de los patógenos en cuestión.

Libres de anticuerpos a virus: Animales libres de anticuerpos a virus patógenos; para esto se requiere la ausencia de los virus en cuestión dentro de la sub población de animales, sostenida en un monitoreo regular para estos virus determinados.

Convencionalmente limpios, Heteroxénicos o Monitoreados: Animales alojados con barreras de baja seguridad y demostradamente libres de los mayores patógenos a través de un monitoreo de secuencias.

Convencionales u Holoxénicos: Animales cuya flora microbiana es desconocida y no controlada, que se alojan generalmente en recintos abiertos con acceso irrestringido.

EL COBAYO COMO ANIMAL DE LABORATORIO

El cobayo (*Cavia cobaya*, Pallas = *Mus porcellus* Linnaeus), roedor originario de Sudamérica, ha sido considerado por muchos como sinónimo de animal experimental, aunque en realidad ratones y ratas han sido, lejos, los más utilizados (Zuñiga *et al.*, 2001). Algunas de las propiedades por las cuales se utiliza esta especie animal son:

- Por su largo período de gestación, de 63 a 73 días, permite la oportunidad de separar los efectos tóxicos o teratogénicos en el embrión desde el comienzo del desarrollo fetal, hasta que madura su sistema nervioso central (Hoar, 1976).
- La sensibilidad de su sistema respiratorio, provee la base para estudios de fenómenos de inhalación incluyendo bronco espasmos, asma y de polución ambiental (Ricciardolo *et al.*, 2008).
- Se han utilizado en estudios de anafilaxis, debido a su particular susceptibilidad a ésta y a otras manifestaciones alérgicas (Gutermuth *et al.*, 2005).
- La anatomía de su oído interno ha permitido realizar estudios en el órgano, debido a su fácil disección y exposición.
- Por sus características bioquímicas y metabólicas (Navia *et al.*, 1976), al ser incapaces de sintetizar la vitamina C requieren de una fuente dietaria externa de Vitamina C o ácido ascórbico (Ediger, 1976) han sido utilizados como modelo de experimentación animal en nutrición estudiando: El colágeno, su biosíntesis, formación y transformación; la actividad normal del hueso, extracción de dientes y su cicatrización, fracturas, calcificación temprana del tejido osteoide, y otros; la aterosclerosis, especialmente el rol de la vitamina C y el colesterol, y su depósito en tejidos (West y Fernández, 2004; Ginter, 2007).
- Sus altos requerimientos dietarios de ácido fólico, tiamina, arginina y potasio hace que sean usados en estudios nutricionales.
- Por su susceptibilidad a enfermedades infecciosas son usados como animales centinelas y modelos de enfermedades infecciosas.

- Su sistema inmune posee una respuesta, antígeno-macrófago, responsable de la reacción cutánea de hipersensibilidad, similar a la del hombre.
- Su suero, posee un complemento con alta actividad, mayor que en otros animales de laboratorio, lo que lo hace ser muy utilizado en pruebas de diagnóstico serológico y como fuente de origen de complemento.
- Crías precoces los hace buenos para obtener animales "germ free".
- Debido a su disposición quieta, calmada, permite realizar estudios de entomología en pruebas de repelentes e insecticidas.

Características que limitan el uso del cobayo en ciertas áreas de la investigación.

- Su flora microbiana Gram positiva del intestino es fácilmente alterada por antibióticos, por lo cual estos animales no son utilizados en estudios de sistemas antibacterianos (Navia *et al.*, 1976).
- Su comportamiento digestivo, tempranamente fijado, no tolera cambios bruscos de dietas, por lo cual no pueden ser utilizados en estudios nutricionales que requieran cambiar la formulación del alimento (Navia *et al.*, 1976).
- El largo período fetal del cobayo, responsable de su grado de desarrollo al nacer, lo hace menos usado que otros roedores en estudios de crecimiento y desarrollo post natal.
- Carece de acceso a venas periféricas para inyecciones y recolección de sangre (Holmes, 1984).
- El costo de un animal, respecto de otros roedores, resulta aún alto (Navia *et al.*, 1976).

Salud ocupacional y riesgos

Los cobayos raramente muerden o provocan alguna injuria durante su manipulación, no son asociados significativamente a enfermedades zoonóticas; sin embargo, el mayor

potencial de enfermedad es el provocar cuadros de alergia. El contacto directo del trabajador con la orina, pelo y piel en forma frecuente, ha sido asociado a asma ocupacional. Según Autenried (2002) alrededor del 10% de la actividad alérgica se encuentra en pequeñas partículas que penetran el aparato respiratorio bajo, siendo la orina el componente más significativo como alérgeno (Autenried, 2002).

El riesgo para los manipuladores de cobayos, según “University Police and Safety Office” (2007) se presenta en el cuadro N° 1.

CUADRO N° 1	
NIVEL DE RIESGO PARA PERSONAL DE BIOTERIO FRENTE A EXPOSICIÓN O HERIDA PROVOCADA POR COBAYOS	
HERIDA POR MORDIDA	2
HERIDA POR RAZGUÑO (a)	2
EXPOSICIÓN A FLORA MICROBIANA (b)	1
DESARROLLO DE ALERGIA	3

Clave:

1. No se conoce riesgo
2. Riesgo menor
3. Riesgo moderado
4. Riesgo significativo
5. Alto riesgo

(a) potencial contaminación microbiológica y trauma físico. Profilaxis por tétano.

(b) riesgo de inhalación o exposición oral a microbios o agentes parasitarios desde animales adquiridos a través de instituciones aprobadas.

Importancia del estado sanitario del cobayo, según recomendación Nicklas *et al.*, (2002):

Esta organización entrega un listado de los patógenos más importantes para el monitoreo de cobayos. Con el fin de estandarizar su calidad microbiológica, destacan bacterias como:

Bacillus piliformis (Clostridium piliformis)

Bacilo filamentoso, Gram negativo, formador de esporas, intracelular obligado, no prolifera en medios de cultivo artificiales; se propaga en huevos embrionados o en cultivos primarios de hepatocitos de embriones de pollo o ratón (Fujiwara y Ganaway, 1986). Causal de la enfermedad de Tyzzer's, afecta a gran variedad de especies animales incluso los domésticos; en animales de laboratorio la enfermedad ha sido encontrada en ratas, ratones, hámster, jerbos, cobayos y monos Rhesus. Presenta amplia distribución geográfica y, probablemente, es un habitante benigno común en el intestino de estos (Harkness y Wagner, 1989; Riley *et al.*, 1999); se elimina vía fecal (Saíz *et al.*, 1983). Se transmite por el consumo de esporas, las que pueden sobrevivir a temperatura ambiente por un año o más, y es posible que las dietas de animales de laboratorio puedan contener esporas de *B. piliformis* cuando han sido elaboradas con granos contaminados con heces de roedores u otros animales; por lo tanto, el autoclavar las comidas y bebidas de estos animales, es una buena práctica (Fujiwara y Ganaway, 1986; NRC, 1991; NRC, 1997). El período de incubación es de 6 a 8 días (Saíz *et al.*, 1983). El curso de la enfermedad es agudo o crónico, pero la forma más común de infección es la subclínica, y cuando el animal sufre algún grado de estrés como el térmico, hacinamiento, transporte, destete, manipulación experimental o enfermedades concurrentes, ocurre la enfermedad clínica (Harkness y Wagner, 1989). Síntomas frecuentes de la forma latente son dilatación del hígado, enteritis con diarrea sanguinolenta, anorexia y pérdida de peso. A la necropsia los animales afectados presentan focos necróticos en ciego, colon e hígado; aumento de tamaño de nódulos

linfáticos mesentéricos y del colon (Waggie *et al.*, 1986; Bunte, 1994). Las lesiones macroscópicas se consideran típicas, pero no patognomónicas; el hígado se encuentra aumentado de tamaño y con numerosos focos blancos puntiformes, que también pueden presentarse en el intestino y miocardio. El aislamiento se realiza a partir de los focos necróticos del hígado, por inoculación de saco vitelino en huevos embrionados de pollo. También puede inocularse la muestra hepática en un ratón destetado, previamente tratado con cortisona durante 7 días, si el *B. piliformis* está presente, el ratón presentará la enfermedad aguda en 3 a 4 días (Fujiwara y Ganaway, 1986).

Bordetella bronchiseptica

Coco bacilo, Gram negativo, aerobio estricto (Pittman, 1984) que causa importantes enfermedades en el tracto respiratorio superior de varias especies animales, con transmisión entre ellas y al hombre (Pittman, 1984; Bunte, 1994; Hanes, 2005). Afecta a cobayos de todas las edades, sin embargo, en invierno afecta de preferencia a los más jóvenes, con morbilidad de 70% y mortalidad de 30 a 40%, favoreciéndose por factores estresantes (Bunte, 1994). La infección en la colonia es mantenida por portadores sanos, que pueden exceder el 20% de los animales (Ganaway, 1976). El período de incubación es de 5 a 7 días (Ganaway, 1976). Los signos clínicos evidenciados son anorexia, pérdida de peso, distres respiratorio con descarga nasal serosa a purulenta (Trahan *et al.*, 1987). En hembras preñadas produce aborto, crías débiles o muertas. A la necropsia de los animales infectados, la piel y pelos alrededor de los orificios nasales pueden verse con exudados muco sanguinolento o muco purulento, la tráquea puede contener exudado sanguinolento, y en la cavidad torácica un fluido seroso de color amarillo; se observan varios grados de consolidación pulmonar. También puede afectar la bulla timpánica con exudado mucopurulento. El diagnóstico se realiza por aislamiento e identificación de la bacteria desde nasofaringe, tráquea, pulmones, bulla timpánica y útero afectado (Schoeb, 1990; Bunte, 1994; Hanes, 2005).

Corynebacterium kutscheri

Bacilo Gram positivo, aeróbico facultativo, inmóvil, rara vez produce enfermedad septicémica (Bunte, 1994). Si bien las especies más afectadas son ratón y rata (Saíz *et al.*, 1983) ha sido aislado también en cobayos (Weisbroth, 1986). La patogenicidad en animales sanos es baja, pero la resistencia a la infección se ve alterada frente a condiciones de estrés (Collins y Cummins, 1984). Muchos animales son portadores. Se transmite por vía oral a través de los alimentos y el agua. El curso de la enfermedad, usualmente crónico, tiene un período de incubación de 5 a 10 días. Los síntomas de la enfermedad son adelgazamiento, disnea, rinitis, anorexia e inflamación de las articulaciones, presentando como lesiones pequeños pseudotuberculomas en pulmón, hígado y riñones. El organismo puede ser aislado desde oro y nasofaringe, árbol traqueo bronquial o de la cavidad timpánica. El diagnóstico también puede ser establecido mediante la demostración de típicas formas de “letra china” (Weisbroth, 1986) en frotis teñidos.

Chlamydia psittaci

Microorganismo intracelular obligado, presenta predilección por las células epiteliales de las mucosas, pero pueden infectar otros tejidos en localizaciones diversas (Carter, 1989). Se transmite por inhalación de polvo y gotitas infecciosas, produciendo conjuntivitis (Flecknell, 1998) y neumonía en cobayos (Carter, 1989; Nicklas *et al.*, 2002). La infección es usualmente persistente y subclínica. Los jóvenes entre cuatro y ocho semanas de edad son los más susceptibles (Hanes, 2005). Sus cuerpos elementales pueden ser demostrados por tinción Giemsa en células epiteliales de la conjuntiva ocular (Schoeb, 1990; Bunte, 1994, Hanes, 2005).

Klebsiella pneumoniae

Enterobacteria capsulada, Gram negativa, inmóvil, normalmente se encuentra en el tracto intestinal del hombre y animales, pero en bajo número comparada con *Escherichia coli* (Ørskov, 1984). Las especies de laboratorio más afectadas son cobayos, ratones y

monos (Cuba, 1982). Se ha reportado en cobayos septicemia epizootica y neumonía con pleuritis, pericarditis e hiperplasia esplénica (Hanes, 2005). A la necropsia es posible encontrar peritonitis seropurulenta y enfisema gaseoso de hígado, bazo y riñones (Ganaway, 1976). El diagnóstico se realiza por aislamiento a partir de muestras de sangre, hígado, bazo y exudados peritoneales (Ganaway, 1976).

Pasteurella multocida

Cocobacilo, Gram negativo, pequeño, inmóvil, la mayoría presenta coloración bipolar con tinción Giemsa; es un habitante del aparato respiratorio superior en muchos animales, incluyendo al hombre (Ganaway, 1976). Todas las especies de laboratorio se ven afectadas (Saíz *et al.*, 1983), sin embargo la enfermedad no parece ser común en los cobayos (Ganaway, 1976). El período de incubación es de 5 a 10 días. El curso de la enfermedad es septicémico, crónico o latente. Se describen neumonía, rinitis, conjuntivitis, hiperemia ocular, abscesos cutáneos, mastitis, torticólis y orquitis. Abundan las formas septicémicas con descarga nasal y vaginal (Saíz *et al.*, 1983).

La necropsia registra lesiones de congestión visceral, foco neumónico y bronco neumónico de color rojizo grisáceo, en ocasiones supurados. El diagnóstico es por aislamiento e identificación. Crece en agar Mc Conkey y se recomienda la realización de antibiogramas (Saíz *et al.*, 1983).

Salmonella spp.

De la familia Enterobacteriaceae, Gram negativa, móvil; afecta a muchas especies animales y al hombre; es lejos, la enfermedad bacteriana más reportada en los cobayos (Ganaway, 1976) debido a su gran susceptibilidad, afectando por igual a todas las edades y sexos (Kagiyama y Wagner, 1986). La mortalidad en cobayos es alta, describiéndose hasta el 100% (Shoeb, 1990; Hanes, 2005). Los serotipos más aislados en cobayos son *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium y *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (Ganaway, 1976; Le Minor, 1984). Se elimina

en las heces de portadores sanos y animales clínicamente enfermos, contaminando la comida, agua, cama y jaula (Ganaway, 1976). Se transmite vía oral y en los cobayos también por vía conjuntival (Ganaway, 1976; Hanes, 2005), la morbilidad puede alcanzar hasta un 75%. *Salmonella* es relativamente resistente a las condiciones ambientales, y puede sobrevivir por más de un año a temperatura ambiente (Kagiyama y Wagner, 1986). El período de incubación es 2 a 6 días (NRC, 1991). En una colonia, el primer signo clínico es usualmente un aumento en la mortalidad (Ganaway, 1976; Hanes, 2005). La forma aguda se presenta con depresión, letargia, disnea y en casos crónicos puede verse anorexia, pérdida de peso, conjuntivitis, abortos y muertes esporádicas (Hanes, 2005). En casos agudos a la necropsia las lesiones pueden estar ausentes; en casos subagudos o crónicos puede observarse esplenomegalia, lesiones necróticas y nódulos en bazo, hígado, en pulmón, pleura, peritoneo y en paredes del útero (Ganaway, 1976; Holmes, 1984; Hanes, 2005); la ruptura de nódulos pueden causar pleuritis purulenta, peritonitis, y pericarditis (Ganaway, 1976). El diagnóstico se realiza por aislamiento, identificación y serotipificación del agente desde nódulos linfáticos mesentéricos, intestino grueso, hígado y bazo en el examen post mortem (Bunte, 1994).

El aislamiento de *Salmonella* es necesario para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Tizzer's o corynebacteriosis (Kagiyama y Wagner, 1986).

Streptobacillus moniliformis

Bacilo aerobio, Gram negativo, altamente pleomórfico, es huésped habitual del tracto respiratorio superior de animales salvajes, así como de ratas de laboratorio y otros roedores (Carter, 1989). La enfermedad ha sido detectada en las últimas décadas en colonias de ratones, ratas y cobayos (Nicklas *et al.*, 2002). Ha sido aislada en cobayos con adenitis cervical y abscesos localizados crónicos (Ganaway, 1976). El período de incubación es de 3 a 5 días. Los síntomas son linfadenitis en ganglios cervicales, con supuración, adelgazamiento y caquexia.

La incidencia de la enfermedad es poco frecuente, de curso crónico, la mayoría de los animales resultan portadores. El diagnóstico es microscópico y mediante cultivos apropiados de muestras de pus de los ganglios o de exudado faríngeo (Saíz *et al.*, 1983).

Streptococcus pneumoniae

Cocácea, Gram positiva, capsulada, crece en agar sangre produciendo hemólisis tipo α o viridans (Nakagawa, 1986), los cobayos son altamente susceptibles a la infección, que está asociada a factores estresantes (cambios de temperatura ambiental, procedimientos experimentales, inadecuada nutrición). Se transmite por contacto directo desde animales infectados y portadores; en su mayor parte durante los meses de invierno, presentando un mayor riesgo cobayos jóvenes y hembras preñadas. El estado portador en las colonias infectadas puede ser alto, alcanzando el 50% (Hanes, 2005). Los animales afectados pueden presentar una muerte aguda o bien descarga nasal, disnea, y otros signos no específicos como anorexia, decaimiento (Holmes, 1984). A la necropsia puede observarse una variedad de procesos piógenos como pleuritis fibrinopurulenta, pericarditis, peritonitis, consolidación pulmonar con abscesos, otitis media, endometritis y meningitis supurativa (Schoeb, 1990). Según Ganaway (1976), la pleuritis sero o fibrinopurulenta, pericarditis y peritonitis, son características de la infección por *Streptococcus pneumoniae*. Cobayos con deficiencia de vitamina C pueden desarrollar neumonía asociada a artritis supurativa y osteomielitis (Hanes, 2005). El diagnóstico es por cultivo e identificación del agente desde tracto respiratorio, lo que diagnostica la infección, pero no la enfermedad (NRC, 1997). Los portadores pueden detectarse mediante la siembra de un hisopado nasal; con este método es posible detectarlos en un 80 a 90% (Nakagawa, 1986).

Yersinia pseudotuberculosis

Bacilo, Gram negativo, pleomórfico, móvil a 25°C, inmóvil a 37°C (Bercovier y Mollaret, 1984), conocido también como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. La yersiniosis es una enfermedad crónica debilitante, que afecta a numerosas especies

animales, incluyendo al hombre; sin embargo, los cobayos de ambos sexos y de todas las edades son los más afectados.

Este bacilo se contrae por ingestión de alimento contaminado o lesiones en la piel (Ganaway, 1976). El período de incubación es de 5 a 10 días (Saíz *et al.*, 1983). La forma aguda es septicémica con muerte en 24 a 48 hrs.; la forma crónica se presenta con diarrea, emaciación y muerte a las 3 a 4 semanas. El estado portador presenta lesiones que se localizan en los nódulos linfáticos de cabeza y cuello (Ganaway, 1976). Produce enteritis necropurulenta multifocal, linfadenitis mesentérica, esplenomegalia, nefritis y neumonía (Shoeb, 1990).

Experimentalmente la enfermedad puede ser producida en cobayos mediante la ingestión de alimento o inhalación del bacilo, la muerte ocurre entre los 15 a 45 días y a la necropsia revela nódulos por todo el cuerpo incluyendo nódulos linfáticos regionales, bazo, hígado, pulmón, médula ósea. Cuando el bacilo es ingerido los nódulos se presentan en las paredes del íleon, ciego, nódulos linfáticos mesentéricos y peritoneo (Ganaway, 1976). El útero y glándula mamaria son ocasionalmente afectados (Bunte, 1994). El diagnóstico es mediante el aislamiento e identificación a partir del pus o de los exudados faríngeos (Saíz *et al.*, 1983) y, en casos de septicemia aguda, desde abscesos y sangre (Ganaway, 1976).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Detectar los principales patógenos bacterianos que se encuentran en la colonia de cobayos del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CPAL) del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), Ministerio de Salud.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la presencia o ausencia de los siguientes agentes bacterianos:

- *Bacillus piliformis*
- *Bordetella bronchiseptica*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Salmonella spp.*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Yersinia pseudotuberculosis*

MATERIAL Y MÉTODOS

Los análisis microbiológicos se realizaron en los Laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Animales

Se trabajó la colonia de cobayos del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CPAL) del Instituto de Salud Pública (ISP); Ministerio de Salud, ubicado en el Fundo Chena, Santa Ana de Chena. Las características reproductivas de dicha colonia se presentan en el anexo N° 1.

Determinación de la muestra:

De una población total de 1566 cobayos (1290 reproductoras hembras, 45 reproductores machos, 44 crías hembras, 82 crías machos, 105 lactantes) se determinó el tamaño muestral, según Cochran (1963). Se asumió un $p = 0,55$ con un error de 0,15 y una confianza de 95%. El tamaño muestral correspondió a 43 animales, que se distribuyeron según sexo y categoría, (Cuadro N° 2), los que fueron seleccionados al azar, desde cada corralillo por personal del ISP. La selección de los reproductores se realizó numerando los corralillos del 1 al 16; se sortearon dos corralillos para obtener un macho en cada uno (2); para las 35 hembras, se obtuvieron sorteando dos por cada uno de los corralillos (32) y, además, una por cada 5 corralillos (3). La selección de las crías, una población flotante con mayor número de machos debido a la mayor demanda por hembras se obtuvo sorteando dos machos, uno desde un corralillo para crías de pesos entre 150 a 300 g. y el otro desde aquellos de pesos 301 a 500g. Para la selección de los tres lactantes, se sorteó un animal de cada 5 de los corralillos de reproductoras

(Reproductores, crías y lactantes). El número total de muestras, considerando razones de bioética e infraestructura, correspondió al menor posible.

La distribución de los animales muestreados se presenta en el cuadro N° 2.

CUADRO N° 2	
ANIMALES MUESTREADOS SEGÚN CATEGORÍAS.	
CATEGORÍAS	N°
Reproductores Machos	2
Reproductores Hembras	35
Crías machos	2
Crías hembras	1
Lactantes	3
Total	43

Traslado y procesamiento de cobayos seleccionados:

El número de animales que se trabajó por vez correspondió a un máximo de 2 individuos. El traslado de los animales vivos desde el bioterio al laboratorio para su posterior procesamiento, se realizó en una jaula especial de transporte para pequeños animales.

Inmediatamente a su llegada al laboratorio se procedió a trabajar cada animal, iniciándose con un examen clínico general, con el fin de evidenciar anomalías visibles como heridas, abscesos, aumentos de volumen o cualquier lesión de la cual pudiera obtenerse muestra de interés para el estudio.

Al examen clínico general se consideraron como parámetros normales temperatura rectal de 37, 2 a 39, 5°C; frecuencia cardíaca de 240 a 310 latidos por minuto (Hillyer *et*

al., 1997); perfusión periférica midiendo el tiempo de llenado capilar de 1 segundo y, valoración del color de las mucosas sea coloración rosado como normal (Kirk *et al.*, 1994). Otras signologías correspondieron a correcta o incorrecta oclusión dentaria; presencia o no de fluidos en aberturas naturales; estado de la cubierta corporal (Hillyer *et al.*, 1997) y, condición corporal utilizando una escala del 1 al 5 según Case *et al.*, 1997 y Donoghue, 2002 (Anexo 2).

La eutanasia se realizó por inyección intracardíaca de 0,1ml de T-61®, droga con efecto de analgesia local, general y, paralizante (JAVMA, 2000).

Cada animal se fijó en una bandeja metálica y se le realizó una desinfección externa de tórax y abdomen con alcohol yodado.

Para la correcta toma de muestras, en la necropsia se abordó en un inicio el tórax y luego la cavidad abdominal. Las muestras fueron obtenidas inmediatamente *post mortem*, en forma aséptica; las secreciones y contenidos intestinales con torunda y los órganos en placas Petri estériles, en el siguiente orden secuencial:

- Torunda de muestra nasofaríngea.
- Raspado traqueal y árbol bronquial con asa de cultivo; tejido pulmonar.
- Tejidos hepático y esplénico.
- Contenido cecal.

Se agregó a estos, cualquier otro tejido o secreción macroscópicamente alterada.

Otra muestra por cada animal, correspondió a material fecal de ciego para examen parasitológico (Von Heinz *et al.*, 1986; Soulsby, 1987).

Trabajo microbiológico

Se utilizaron materiales y procedimientos asépticos. Todos los medios de cultivo utilizados, tanto sólidos como líquidos una vez sembrados, fueron incubados a 37° C. Las placas de agar sangre hasta las 72hrs; las placas de agares selectivos, sólo por 24hrs. Los huevos embrionados inoculados, tanto de muestras como sus controles, fueron incubados a 37° C y se observaron diariamente entre el día 1 y 7 post inoculación (PI).

Bacillus piliformis.

Para el diagnóstico de este bacilo intracelular, se realizó una tinción Gram de una impronta de tejido hepático en portaobjeto, para su posterior examen microscópico. Por otra parte una porción de tejido hepático, equivalente a 2 gr., fue triturado y suspendido en 10 ml de caldo infusión cerebro corazón (Difco®), el cual fue inmediatamente centrifugado a 2000X g durante 10 minutos; 0,2 ml de su sobrenadante se inoculó en cada uno de 6 huevos embrionados de 7 días, vía saco vitelino. Los huevos provenían de gallinas convencionales. La técnica de inoculación comprendió: desinfección externa de la cámara de aire con etanol 70°, perforación de la cáscara sin dañar la membrana interna e inoculación vía saco vitelino con sellado de esmalte final. Cuatro huevos embrionados, correspondientes al grupo control, fueron igualmente procesados e inoculados pero con solución salina estéril. Los 10 huevos por muestra, se incubaron en estufa a 37° C durante 7 días; durante este período fueron examinados diariamente con ovoscopio para observar y registrar sus viabilidades.

En el frote hepático teñido con Gram, se considera como muestra positiva a *Bacillus piliformis*, la presencia de bacilos Gram negativos en agrupaciones intracitoplasmáticas dentro de los hepatocitos.

La inoculación de huevos embrionados considera como muestra positiva a *Bacillus piliformis* cuando ocurre la muerte de los 6 huevos embrionados inoculados con la

muestra, pero con sobrevivencia de los 4 huevos de su grupo control. La certeza de un diagnóstico positivo implica la muerte de otros huevos embrionados cuando son inoculados con el vitelo de los embriones muertos como sospechosos. Se descarta como muerte específica, la ocurrida dentro de las primeras 24 horas post inoculación.

El número de huevos embrionados utilizados para el diagnóstico de esta bacteria se presenta en el cuadro N° 3

CUADRO N° 3	
NÚMERO DE HUEVOS UTILIZADOS POR CATEGORÍAS.	
CATEGORÍAS	N°
Reproductores Machos	20
Reproductores Hembras	350
Crías machos	20
Crías hembras	10
Lactantes	30
Total	430

Bordetella bronchiseptica.

Para el diagnóstico se analizaron muestras de torunda con raspado de las mucosas traqueal y bronquial, además del sobrenadante de muestra de tejido pulmonar triturado y suspendido en solución salina. Ambas muestras fueron sembradas, separadamente, en placas de agar sangre, incubadas a 37°C y las colonias sospechosas estudiadas según sus propiedades de afinidad tintorial al Gram, morfología, de desarrollo y propiedades bioquímicas según Pittman (1984).

Klebsiella pneumoniae.

Para el aislamiento se procesaron conjuntamente, en un mortero, aproximadamente 2 g. cada uno tanto de tejidos hepático como esplénico; la muestra se trituró con arena y solución salina. La siembra del sobrenadante se realizó en placa de agar Mc Conkey (Difco®), que se incubó a 37°C. Las colonias sospechosas se identificaron según sus características de afinidad tintorial al Gram, morfología, de desarrollo y propiedades bioquímicas de acuerdo a Ørskov (1984).

Salmonella spp.

Para su diagnóstico, el contenido de intestino grueso se sembró, simultáneamente, en caldo tetratonato (2g/10ml) y en agares selectivos Mc Conkey y XLD (Difco®). A las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C, el caldo con la muestra fue sembrado, sucesivamente, en agar Mc Conkey (Difco®). La identificación de colonias sospechosas continuó con estudio de las propiedades bioquímicas y serología con antisueros de Grupo específico de *Salmonella*, según Le Minor (1984).

Se interpretó como colonia sospechosa cuando sus características de fermentación y coloración, junto a su afinidad tintorial al Gram y otras pruebas bioquímicas, correspondió a características de *Salmonella* (Fenilalanina (-); Citrato (+); Kligler (H₂S (+), Glucosa (+), Lactosa (-)). Los cultivos sospechosos se enfrentaron a antisuero específico somático *Salmonella* O poly A-I & Vi (Difco®) identificándose de esta forma a *Salmonella spp.* La serogrupificación se realizó frente a antisueros específicos de grupo. La serotipificación se realizó en el laboratorio de referencia de enterobacterias del ISP.

Streptococcus pneumoniae.

Las muestras para su aislamiento correspondieron a una torunda nasofaríngea y otra de raspado traqueal; ambas muestras fueron sembradas en diferentes placas de agar sangre, incubadas a 37°C. Las colonias sospechosas fueron estudiadas según sus características de afinidad tintorial (Gram), morfología, de desarrollo y propiedades bioquímicas según Rotta (1984).

Yersinia pseudotuberculosis.

Para el aislamiento se procesaron conjuntamente, en un mortero, aproximadamente 2 g. cada uno de tejido pulmonar, hepático y esplénico. La muestra se trituró con arena y solución salina. El cultivo del sobrenadante se realizó sobre placa de agar sangre, que se incubó a 37°C. Las colonias sospechosas se identificaron según sus características de afinidad tintorial al Gram, morfología, de desarrollo y propiedades bioquímicas de acuerdo a Collins y Cummins (1984).

RESULTADOS

Todos los animales muestreados resultaron negativos a la presencia, por cultivo, de *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Streptococcus pneumoniae* y *Yersinia pseudotuberculosis*.

Por microscopia de frotos de hígado teñidos con Gram e inoculaciones en huevos embrionados respectivos, también resultaron negativos a *Bacillus piliformis*.

Hallazgos complementarios

Los exámenes clínicos y de necropsia complementarios obtuvieron los siguientes resultados:

El examen clínico, realizado a todos los animales, previo a la eutanasia, permitió constatar que todos ellos presentaron los parámetros fisiológicos medibles dentro de los rangos normales para la especie: temperatura corporal, frecuencia cardíaca y perfusión periférica valorando color de mucosas y tiempo de llenado capilar. No se observó presencia de fluidos anormales en aberturas naturales ni mal oclusión dental; condición corporal grado 3 equivalente a normal y, ausencia de anomalía en cubiertas.

Dos hembras reproductoras presentaron a la palpación externa un absceso subcutáneo; en una fue de 0,5cm y de ubicación peri labial y en la otra de 1cm. y de ubicación submandibular. El cultivo microbiológico de ambos abscesos correspondió a *Bacillus* spp. (no *B. piliformis*). Ambos animales, a pesar de estos procesos, presentaron normalidad clínica.

En cuanto a los exámenes de necropsia estos permitieron determinar, en el grupo de reproductoras hembras, una con *Ascarididae* spp. en contenido cecal y, en ocho de ellas, lesiones hepáticas atribuibles a recorridos de formas larvales de parásitos

gastrointestinales. Una cría y un lactante presentaron, ambos, lesiones hepáticas atribuibles a parásitos gastrointestinales.

En el grupo de reproductoras, presencia de un absceso de ubicación mesentérica en seis animales. El análisis microbiano de cada uno de estos abscesos, por tinción microscópica directa y cultivo microbiológico, fue negativo a alguna de las bacterias en búsqueda.

Los exámenes de flotación fecal, para cada uno de todos los animales analizados, resultaron negativos a la presencia de huevos de parásitos gastrointestinales.

DISCUSIÓN

Según la "Federation of European Laboratory Animal Science Associations" (Nicklas *et al.*, 2002) y el "National Research Council" (NRC, 1997), el examen clínico en animales de laboratorio carece de valor diagnóstico debido a que la mayor parte de las enfermedades se presentan en ausencia de signología clínica. En este estudio todos los animales muestreados, al ser examinados clínicamente, presentaron normalidad a los parámetros clínicos dados por Kirk *et al.*, (1994); por lo tanto un aislamiento positivo de alguno de los patógenos buscados, habría sido tan posible en estos animales normales como en individuos con signología clínica. A pesar de esta afirmación, se consideró como complementario a la búsqueda de los patógenos, el realizarles un estudio clínico. Se debe señalar además que la presencia de animales lesionados, en una población como la aquí estudiada, agrupada en corralillos colectivos, es difícil de detectar visualmente. La presencia de abscesos subcutáneos en dos ejemplares al examen clínico, se puede considerar como hallazgos dados por el azar, por cuanto esos animales no son detectados con dichas lesiones a la inspección visual general.

En relación a las necropsias, por regla general en un bioterio este procedimiento debe practicarse a todo animal que muere o es eutanasiado. El resultado de una necropsia, en relación al examen clínico, sin duda refleja más adecuadamente la existencia de alguna patología. Los hallazgos patológicos en las necropsias, en general, podrían sugerir un aumento del tamaño del número de animales a muestrear y, la frecuencia de esos monitoreos sanitarios en una colonia animal bajo estudio (Nicklas *et al.*, 2002). Por otra parte un solo muestreo señala, puntualmente, una situación en un momento determinado, lo que frente a resultados negativos en la búsqueda activa de bacterias, haría necesario también aumentar la frecuencia de los muestreos en el tiempo.

En el Bioterio del ISP es, por norma establecida, una práctica habitual realizar necropsia a todo animal que muere o es eutanasiado, e incluso se le realiza este examen

a los cobayos que mueren durante las experiencias de control de vacunas que realiza el ISP a productos biológicos, donde se utilizan animales de esta colonia.

El hallazgo de parásitos gastrointestinales y sus consecuencias, como cicatrices por recorridos hepáticos, se explica porque en la alimentación general a todos los animales, además de los pellets que son sanitariamente aprobados, se les suministra heno y soiling de alfalfa en los corralillos desde su etapa de nacimiento; el soiling es el más probable portador de las formas parasitarias. Este último, es obtenido en el mismo predio donde se cría la colonia de cobayos y es regado con aguas de pozo; sin embargo, es observable la presencia constante de perros y gatos de libre circulación por el recinto. Llama la atención que un animal lactante resultara positivo a cicatrices hepáticas; esto se explicaría por los hábitos y precocidad de esta especie animal, que desde el primer día de edad toma leche y consume pasto.

La presencia de abscesos mesentéricos en seis animales adultos reproductores podrían también ser atribuidos a parásitos; sin embargo los cultivos microbiológicos de ellos fueron positivos a especies bacterianas de los Géneros *Bacillus* (no *B. piliformis*) y *Streptococcus* (no *St. pneumoniae*).

El hallazgo de parásitos y sus lesiones, se contradice con la negatividad de todas las muestras de contenido cecal al examen parasitológico de flotación; sin embargo, esto se explicaría, porque los animales pueden haber tenido una baja carga parasitaria. Habitualmente el examen de flotación se realiza en animales con sospecha clínica de parasitismo gastrointestinal, por lo que generalmente detecta altas cargas de huevos de parásitos. Los cobayos muestreados al presentar buena condición externa corroborarían una muy baja carga parasitaria.

La búsqueda activa de las bacterias objeto de este estudio, utilizando metodologías con todos los materiales y procedimientos adecuados, hacen que los resultados obtenidos sean confiables para el diagnóstico de cada una de ellas en los animales muestreados.

Los cobayos del Bioterio del ISP, por su manejo, corresponden a animales convencionales controlados. Sin duda, el resultado negativo a la presencia de *Bacillus piliformis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Streptococcus pneumoniae* y *Yersinia pseudotuberculosis*, siguiendo los procedimientos antes señalados, permite considerar que esta colonia de cobayos mantiene un adecuado manejo sanitario.

Un resultado positivo a las bacterias en búsqueda, puede estar influenciado por no solo la presencia de ellas, sino también por situaciones estresantes del hospedero que permiten exteriorizar su presencia; esto ocurriría en animales infectados portadores aparentemente sanos, de esta forma algunos investigadores deprimen farmacológicamente el sistema inmune para de esta forma exteriorizar la presencia de bacterias patógenas y con ello evitar que ellas interfieran en los resultados de experiencias biológicas donde se utiliza este tipo de animales.

Para evitar que alguna situación de estrés pudiera interferir la normalidad de la flora microbiana portada por estos animales, su traslado desde el bioterio al laboratorio de procesamiento se realizó con el mayor cuidado, utilizando continentes que son habitualmente empleados en el traslado de mascotas para viajes por vías aérea o terrestre. Este manejo, por lo tanto, minimizó la posible detección de bacterias si los animales eran portadores sanos de ellas.

Una negatividad a bacterias patógenas también podría estar influenciada por una presencia de ellas en pocos animales infectados. Para ello, un muestreo que considere un mayor número de animales sin duda entregará resultados de mayor confiabilidad; sin

embargo, esto último podría no ser factible frente a poblaciones de bajo número de animales por colonia. Al respecto, el muestreo aquí realizado correspondió al de una población en que se estimó que un gran número de individuos se encontraban infectados, esto por cuanto corresponden a animales convencionales y no los obtenidos de manejos con barreras sanitarias ya que estos últimos suponen una portación menor de especies bacterianas. Para obtener una significancia no sería posible, en una colonia pequeña como la estudiada y con los resultados obtenidos, realizar el sacrificio de un mayor número de animales. Si se supone una prevalencia baja, de encontrar al menos un animal positivo por patógeno, con 0,1% de error, se debería tomar una muestra de 1.102 individuos, lo que habría requerido muestrear sobre el 70% de la población total de 1.566 (Thrusfield, 1990), lo que a su vez no es posible éticamente.

Según el "Nacional Research Council" (NRC, 1997) los animales convencionales son mantenidos sin medidas de prevención para el ingreso de contaminantes patógenos, por lo cual era esperable la presencia de alguna de las bacterias en estudio, basado en las recomendaciones de Nicklas *et al.*, (2002). Sin embargo, debido a los cuidadosos manejos realizados en el plantel se han obtenido animales de buena calidad microbiológica.

El aislamiento e identificación bacteriana, mediante el uso de pruebas bioquímicas, resulta ser concluyente en la mayoría de los casos; sin embargo, realizando una búsqueda activa de patógenos específicos, el apoyo de otros métodos diagnósticos como los directos de Histopatología y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), o indirectos como Inmunofluorescencia, podrían sugerir un número más creciente de cobayos infectados, obteniéndose de esa forma otros resultados sobre tasas de infección. Los exámenes complementarios señalados, por su complejidad y costo, no fueron posibles de efectuarse en la colonia estudiada.

Se tiene como antecedente que en dos poblaciones de cobayos convencionales en Korea (Park *et al.*, 2006) siguiendo las recomendaciones de Nicklas *et al.*, (2002), se realizó el monitoreo de cobayos de dos criaderos, con un intervalo de 3 meses; en el primer muestreo no se detectaron patógenos bacterianos, en tanto que en el segundo muestreo en dos ejemplares de 10 semanas de edad se aisló desde pulmón *Bordetella bronchiseptica*. Este resultado refleja la importancia de realizar, en colonias que resultan negativas a patógenos en los muestreos, una mayor frecuencia de ellos al monitoreo.

Cabe señalar que existe el antecedente de no presentación de algún foco infeccioso en esta colonia de cobayos desde su inicio en el bioterio. Ejemplares sometidos a estrés por desafíos biológicos sí han manifestado en algunas ocasiones cuadros entéricos de infección clostridial hemorrágica y diagnóstico positivo al parásito gastrointestinal *Passalurus sp.*; este último propio de lagomorfos.

Se puede concluir por los resultados obtenidos que, sanitariamente, la colonia de cobayos es mejor de lo esperado por su naturaleza convencional.

Los hallazgos de este trabajo solo son válidos para el bioterio muestreado y en el tiempo en que se realizó dicho estudio.

Este estudio que abarcó la búsqueda de seis especies bacterianas patógenas, es el primero realizado para tan gran cantidad de especies microbianas en esta colonia. Los resultados obtenidos permiten:

1. Proyectar un buen futuro en la calidad sanitaria de los cobayos ofrecidos para experiencias biológicas.
2. Ser la base referencial para el futuro monitoreo de esta colonia.

3. Ser una guía metodológica en el trabajo que determine el número y frecuencia de muestreos, con posibilidad de perfeccionamiento incorporando métodos diagnósticos complementarios más rápidos y sensibles.

A la luz de los resultados sanitarios se sugiere:

El control y desparasitación permanente de perros y gatos que circulan libremente tanto en los cultivos de alfalfa como en las construcciones que albergan a los animales.

Complementariamente sería adecuada la desinfección, entre cada ciclo reproductivo, de los corralillos de cruce y destete.

CONCLUSIÓN

La colonia de cobayos del Centro de Producción de Animales de Laboratorio del Instituto de Salud Pública de Chile, resultó negativa a los aislamientos de las bacterias *Bacillus piliformis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Streptococcus pneumoniae* y *Yersinia pseudotuberculosis*, a través de los cultivos microbiológicos específicos e inoculación en huevos embrionados.

La calidad sanitaria bacteriana de la colonia estudiada se considera buena, tratándose de una colonia convencional de cobayos de bioterio.

BIBLIOGRAFÍA

AUTENRIED, P. 2002. Guinea-Pig Specific Occupational Health & Safety Risks. [en línea]

<[http://clacc.uhc.edu/Species Guinea Pigs/Health Risks.htm](http://clacc.uhc.edu/Species%20Guinea%20Pigs/Health%20Risks.htm)> [consulta: 11-06-2009].

BAILEY, M. 2005. Ethics and Animal Use in Research.

<http://www.pirweb.org/pir07c_ethics.htm> [consulta: 11-06-2009].

BERCOVIER, H.; MOLLARET, H. 1984. Genus XIV *Yersinia*. In: Krieg, N. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. V.1. Baltimore. Williams and Wilkins. pp. 498-303.

BUNTE, R. 1994. Diseases of Guinea Pigs. [en línea]

<http://www.afip.org/vetpath/POLA/guinea_pig.Bunte.94>[consulta: 15-01-2009].

CARTER, G. 1989. Fundamentos de Bacteriología y Micología Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 305p.

CASE, L.; CAREY, D.; HIRAKAWA, D. 1997. Desarrollo y tratamiento de la obesidad. In: Nutrición canina y felina. Harcourt Brace. Barcelona, España. pp. 247-268.

COCHRAN, W. 1963. Sampling Techniques. John Wiley and Sons, Inc. New York, U.S.A. 413 p.

COLLINS, M.D. Y CUMMINS C. S. 1984. Genus *Corynebacterium*. In: Krieg, N. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.2. Baltimore. Williams and Wilkins. pp. 1266-1283.

CUBA, A. 1982. Manual de Patología de Animales de Laboratorio. Washington D.C. E.U.A. Organización Panamericana de la Salud (OPS) 265p. (Publicación Científica N°423).

DONOGHUE; S. 2002. El Paciente de Peso Reducido. *In:* Noel, K.; Wills, J. Manual de Nutrición y Alimentación en Pequeños Animales. British Small Animal Veterinary Association (BSAVA)369p.

EDIGER, R. 1976. Care y Management. *In:* Wagner, J.; Manning, P.. The Biology of the Guinea Pig. Academic Press. New York, United States. pp. 5-12.

FLECKNELL, P. 1998. Cobayos. *In:* Beynon, P.; Cooper, J. 1989. Manual de animales exóticos. Harcourt Brace, Madrid, España. pp. 59-71.

FUJIWARA, K.; GANAWAY, J. 1986. *Bacillus. Piliiformis*. *In:* Allen, M.A.; Nomura, T. Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals. . U.S. Department of Health and Human services. pp. II. A. 1 - II. A.3.

GANAWAY, J. 1976. Bacterial, Mycoplasma, and Rickettsial Diseases. *In:* Wagner, J. ; Manning, P. The Biology of the Guinea Pig. Academic Press. New York, United States. pp. 121-131.

GINTER, E. 2007. Chronic vitamin C deficiency increases the risk of cardiovascular diseases. Bratisl lek listy. 108(9):417-421.

GUTERMUTH, I.; BEHRENDT, H.; RING, J.; JAKOB, D. 2005. Models of contact dermatitis and atopic eczema.

<http://www.science direct.com_science_ob> [consulta: 21-01-2009].

HANES, M. 2005. Diseases of Guinea Pigs. [en línea]
<<http://www.afip.org/consultation/vetpath/pdf/POLA2005.pdf>> [consulta: 21-01-2009].

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. 1989. The Biology and Medicine of Rabbit and Rodents. 3th. Ed. Philadelphia. Lea and Febiger. pp. 117-203.

HILLYER, E. V.; QUENSEMBERRY, K.E.; DONNELLY, T. M. 1997. Biology, Husbandry, and Clinical Techniques. *In: Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery.* 1st Ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania. pp. 243-259.

HOAR, R. 1976. Toxicology and Teratology. *In: Wagner, J.; Manning, P.. The Biology of the Guinea Pig.* Academic Press. New York, United States. pp. 269-276.

HOLMES, D. 1984. Clinical Laboratory Animal Medicine. The Iowa State University Press. Ames, Iowa. 127 p.

INFANTE, J. F.; SIFONTES, S.; SIERRA, G.; CAMPA, C.; FARIÑAS, M.; OLIVA, R.; PEREZ, V.; ACOSTA, A.; SARMIENTO, M.E.; GUTIÉRREZ, M.; CARO, E.; CADIZ, A.; BALBOA, J.; GONZÁLES, P.; NUÑEZ, J.F.; RIVERON, F.; GONZÁLES, M.; MUÑOZ, E.; GARCÍA, L.; TORRES, V.; CABRERA, O.; PEREZ, O. 1998. Los biomodelos aplicados al desarrollo de vacunas y sueros del Instituto Finlay. *Rev. Hisp. Anim. Exp.* 3 (3):30-40.

JALAS WORKING GROUP FOR LABORATORY ANIMAL DATA BANK, TOKYO AND LIFE SCIENCE RESEARCH INFORMATION SECTION, THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH, SAITAMA. 1992. Number of animals used in experiments in 1990. *Jikken Dobutsu.* 41(1):101-106.

JAVMA, 2000. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. JAVMA 218 (5): 669-692.

<http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf> [consulta: 11-06-2009].

KAGIYAMA, N.; WAGNER, J.E. 1986. *Salmonella spp.* In: Allen, M. A.; Nomura, T. Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals. U.S. Department of Health and Human Services. pp. II. F. 1 – II. F. 3

KIRK, R.; BISTNER, S.; FORD, R. 1994. Manual de Procedimientos & Tratamientos de Urgencia en Animales Pequeños. 5ª ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. 867 p.

LE MINOR, L. 1984. Genus III *Salmonella*. In: Krieg, N. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.1. Baltimore. Williams and Wilkins. pp. 427-458.

NAKAGAWA, M. 1986. *Streptococcus pneumoniae* In: Allen, M. A.; Nomura, T. Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory animals. U.S. Department of Health and Human services. pp. II. G. 1 – II. G. 3.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 1991. Infectious Diseases of Mice and Rats. Washington, D.C. Institute of Laboratory Animal Resources. National Academy Press. pp. 3-141.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 1997. Infectious Diseases of Mice and Rats. Washington, D.C. Institute of Laboratory Animal Resources. National Academy Press. pp. 21-139.

NAVIA, J.; HUNT, CH. 1976. Nutrition, Nutritional Diseases, and Nutrition Research Applications. *In*: Wagner, J.; Manning, P. The Biology of the Guinea Pig. Academic Press. New York, United States. pp. 235-261.

NEVALAINEN, T.; BLOM, H.J.M.; GUAITANI, P.; HARDY, P.; HOWARD, B.R.; VERGARA, P. 2002. FELASA Recommendations for the accreditation of laboratory animal science education and training. *Lab. Anim.* 36: 373-377.

NICKLAS, W. ; BANEUX, P. ; BOOT, R. ; DECELLE, T. ; DEENY, A. A.; FUMANELLI, M. ; ILLGEN-WILCKE, B. 2002. Recomendations for the Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies in Breeding and Experimental Units. *Lab. Anim.* 36:20-42.

ØRSKOV, I. 1984. Genus *V Klebsiella*. *In*: Krieg, N. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.1. Baltimore. Williams and Wilkins. pp. 461-465.

PARK, J.H. ; SEOK, S.H. ; BAEK, M.W. ; LEE, H.Y. ; KIM, D.J. ; CHO, J.S. ; HWANG, D. Y. ; PARK, J.H. 2006. Microbiological Monitoring of Guinea Pigs Reared Conventionally at Two Breeding Facilities in Korea. *Exp. Anim.* 55 (5): 427-432.

PITTMAN, M. 1984. Genus *Bordetella*. *In*: Krieg, N. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.1. Baltimore. Williams and Wilkins. pp. 388-393.

REHBINDER, C.; BANEUX, P.; FORBES, D.; VAN HERK, H.; NICKLAS, W.; RUGAYA, Z.; WINKLER, G. 1996. FELASA Recomendations for the Health Monitoring of Mouse, Rat, Hamster, Gerbil, Guinea Pig and Rabbit Experimental Units. *Lab. Anim.* 30:193-208.

RICCIARDOLO, F.L.; NIJKAMP, F.; DE ROSE, V.; FOLKERTS, G. 2008. The Guinea pig as an animal model for asthma. *Curr. Drug Targets.* 9(6): 452-465.

RILEY, L.; FRANKLIN, C.; HOOK, R.; BESCH-WILLIFORD, C. 1999. Tyzzer's disease: An update of current information
<http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_tyzzers_disease.pdf>
[consulta: 11-06-2009].

ROTTA, J. 1984. *Streptococcus pneumoniae* In: Krieg, N. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.2. Baltimore. Williams and Wilkins. pp. 1052-1054.

SAIZ, L.; GARCÍA, J.; COMPAIRE, C. 1983. La Ciencia de los Animales de Laboratorio. In: Animales de Laboratorio. INIAE. Madrid, España. 596p.

SCHOEB, T. 1990. Diseases of Guinea Pigs PAT 707, Diseases of Laboratory Animals II. Department of Comparative Medicine University of Alabama at Birmingham. [en línea] <http://netvet.wustl.edu/species/guinea_pigs.txt> [consulta: 15-01-2009].

SMITH, J.A.; VAN DEN BROEK, F.A.R.; CANTÓ, J.; HACKBARTH, H.; RUKSENAS, O.; ZELLER, W. 2007. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of a FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Lab. Anim.* 2007. 41: 143-160.

SOULSBY, E. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª ed. Interamericana. México, D. F., México. 823p.

THRUSFIELD, M. 1990. Encuestas. In: Epidemiología veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 191-205.

TRAHAN, C.; STEPHENSON, E.; EZZELL, J.; MITCHELL, W. 1987. Air bone-induced experimental *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in Strain 13 guinea pigs. Lab. Anim. 21 (3): 226-232.

UNIVERSITY POLICE AND SAFETY OFFICE, 2007. Guidelines for Occupational Health and Safety in the Care and Use of vertebrate Animals. [en línea] <http://www.ndsu.nodak.edu/ndsu/police_safety/safety/OccupationalSafetyandEnvironmentalHealth.pdf> [consulta: 15-07-2009].

VON HEINZ, M.; DIETER, D.; WOLFGANG, R., 1986. Diagnose und Therapie der Parasiten von Haus-, Nutz- und Heimtieren. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart, New York. 454p.

WAGGIE, K.; WARNER, J.; KELLEY, S. 1986. Naturally occurring *Bacillus piliformis* infection (Tyzzer's disease) in guinea pigs. Lab. Anim. Sci. 36 (5): 504-506.

WEISBROTH, S. 1986. *Corynebacterium kutscheri* In: Allen, M. A.; Nomura, T. 1986. Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory animals. U.S. Department of Health and Human services. pp. II. C. 1 – II. C. 4.

WEST, K.L.; FERNANDEZ, M. 2004. Guinea pigs as models to study the hypocholesterolemic effects of drugs. Cardiovasc. Drug Rev. 22(1): 55-70.

ZUÑIGA, J.; TUR MARI, J.; MILOCCO, S.; PIÑEIRO, R. 2001. Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal. Ed. Interamericana. Mc Graw – Hill. Madrid, España. 682p.

ANEXO 1

Manejo Sanitario de los Cobayos del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CPAL) del Bioterio del Instituto de Salud Pública (*).

Manejo reproductivo

La colonia de cobayos se encuentra ubicada en el fundo Chena, Santa Ana de Chena, Región Metropolitana.

Los cobayos pertenecen a una colonia cerrada, de la cepa PIRBRIGH, con ejemplares muy dóciles. La población se obtiene utilizando el sistema reproductivo Poiley que consiste en cruzar diferentes ejemplares de igual cepa, a través de un sistema que siendo rotativo impide cruces entre hermanos o primos hermanos, de tal manera que se evite consanguinidad. Esta colonia se reproduce acorde a las necesidades con calendario fijado con antelación, para abastecer al Departamento de Control Nacional del Instituto de Salud Pública, Unidad de Pruebas Biológicas principalmente en control de vacunas.

La producción se realiza en piso con un sistema de Harem (1 macho con 10 hembras) el macho se transporta en forma cíclica cada 5 días por un total de 16 corralillos con el fin de montar a todas las hembras y aprovechar el celo post parto.

Los cobayos nacen y a los 21 días son trasladados a un corralillo de destete, separados por sexo y peso según demanda (150 a 300grs, 301a 500gr).

No se realiza manejo de enfermos a los que se aplica eutanasia por administración de T61® o dislocación cervical. Los animales sacrificados se almacenan junto a los

fallecidos naturalmente, en una bolsa roja y, como material biológico son trasladados al ISP donde son retirados por una empresa externa idónea.

(*) Dr. Marcelo Mezzano, Jefe Sección Bioterio Santiago, ISP.

ANEXO 2

Interpretación de Condición Corporal (Case *et al.*, 1997; Donoghue, 2002).

Puntuación	Condición
1	Caquéctico, vértebras lumbares y huesos de la pelvis visible a simple vista. Ausencia de grasa palpable.
2	Delgado, costillas fácilmente palpables y cubiertas por muy poca grasa.
3	Óptimo, musculatura de las costillas y lumbar palpadas con facilidad, pero sin observarse a simple vista.
4	Sobrepeso, costillas palpables con discreto exceso de grasa subcutánea.
5	Obeso, costillas no palpables, gran cantidad de grasa subcutánea. Depósito de grasa visible en la región lumbar. Curvatura abdominal ausente.