

## EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE AISLADORES FLEXIBLES PARA EL MANTENIMIENTO DE RATONES INMUNODEFICIENTES

F Maschi, G Principi, S Milocco, JM Laborde,  
M Carriquiriborde, M Ayala, P Cagliada, Carbone C.

Cátedra de Animales de Laboratorio.  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Nacional de La Plata

**Resumen:** *En las últimas décadas los ratones inmunodeficientes se han convertido en un modelo indispensable para la investigación del cáncer. Estos animales tienen requerimientos especiales para su mantenimiento, por lo que se han desarrollado nuevas tecnologías para controlar su macro y microambiente. Una de ellas es el aislador flexible; éste es un receptáculo de PVC cerrado, en el cual pueden mantenerse los animales separados del ambiente general a través de la filtración absoluta del aire. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de un modelo de aislador armado en el Bioterio de la FCV – UNLP para el mantenimiento de ratones inmunodeficientes. Se montaron dos aisladores flexibles, ensamblando las cinco partes que componen cada uno. Se controlaron la hermeticidad y la esterilidad, se introdujeron los insumos necesarios y luego se incorporaron 12 ratones inmunodeficientes N:NIH(S)-nu libres de patógenos específicos. Se realizaron controles microbiológicos del ambiente y de los animales de acuerdo con un cronograma establecido. Los resultados demostraron que este sistema para mantener animales con necesidades ambientales especiales es eficiente.*

**Palabras clave:** Aislador, esterilización, ratón inmunodeficiente.

## VALIDATION AND ASSESSMENT OF A FLEXIBLE FILM ISOLATOR SYSTEM FOR THE MAINTENANCE OF IMMUNODEFICIENT MICE

**Abstract:** *In the last decades immunodeficient mice have become an indispensable animal model for cancer research. These animals have special housing requirements, for this reason new technologies that allow controlling their macro and microenvironment have been developed. One of these technologies is the flexible film isolator; this is a closed PVC chamber, in which the animals are able to live isolated from the outside environment by an absolute air filtration. The objective of this work was to evaluate the efficiency of an isolator built in the FCV – UNLP animal facility for the maintenance of immunodeficient mice. Two flexible isolators were set up by assembling their five main components. After leak proof and sterility were assured, the materials and twelve N:NIH(S)-nu SPF mice were introduced into the unit. A microbiological monitoring schedule was followed in order to control the animals and the isolator environment. The results have shown the efficiency of this equipment for the maintenance of animals with special environmental requirements.*

**Key words:** Flexible isolator, sterilization, immunodeficient mouse.

Fecha de recepción: 29/01/07

Fecha de aprobación: 20/08/07

---

**Dirección para correspondencia:** F. Maschi, Cátedra de Animales de Laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

**E-mail:** [fmaschi@fcv.unlp.edu.ar](mailto:fmaschi@fcv.unlp.edu.ar)

---

## INTRODUCCIÓN

En las tres últimas décadas los ratones inmunodeficientes se han convertido en un modelo indispensable para la investigación, fundamentalmente del cáncer, ya que admiten el transplante de tumores humanos, pudiéndose investigar especialmente nuevos tratamientos (1, 2).

Estos animales, debido a las características de su sistema inmune, tienen requerimientos especiales para su mantenimiento, por lo que se han desarrollado distintas tecnologías para poder controlar su macro y microambiente de forma más segura y eficiente (1, 3, 4, 5). Una de estas alternativas es el uso de las denominadas unidades aisladoras flexibles. Un aislador flexible es, básicamente, un receptáculo de cloruro de polivinilo (PVC) cerrado, en el cual se pueden mantener los animales separados del ambiente general a través de la filtración absoluta del aire de entrada y de salida (6, 7).

Las primeras informaciones sobre el uso de aisladores se remontan a la década de 1940, pero recién a fines de los años 50, cuando se descubre la actividad esporocida del ácido peracético, comienza a tener desarrollo. Estos equipos no sólo sirven para alojar animales de experimentación inmunodeficientes sino también para mantener aquellos de condición microbiológica definida, transgénicos, libres de gérmenes, inoculados con microorganismos patógenos, los destinados a terapias medicinales; o cuando es necesario manipular sustancias radioactivas. En todos los casos el aislamiento, la esterilidad, el control de tóxicos y del ambiente son requisitos fundamentales para el desarrollo de estas investigaciones (7, 8). Actualmente en nuestro país no existen instituciones que utilicen este sistema.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de un modelo de aislador armado en el Bioterio de la FCV – UNLP para el mantenimiento de ratones inmunocomprometidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se recibieron 2 cuerpos de aisladores flexibles donados por el CEMIB UNICAMP - Universidad Estadual de Campinas, Brasil. Cada cuerpo tiene un volumen interior de 0,54 m<sup>3</sup>, en el cual se pueden alojar 4 cajas de ratas de 20 x 30 x 45 cm ó 6 cajas de ratones de 13 x 13 x 30 cm.

Cada unidad aisladora tiene cinco componentes principales que se ensamblan: un cuerpo de PVC flexible transparente de 0,4 µm de espesor, dentro del cual se alojan los animales; un túnel de acceso de PVC rígido con dos tapas de cierre que delimitan el espacio que permite realizar la decontaminación y el ingreso de insumos y de animales; un par de guantes de goma o neopreno de mangas largas a través de los cuales se manejan los animales desde el exterior; un

motor eléctrico de 1/10 HP, 220 V que provee ventilación y presurización positiva a la unidad; y dos portafiltros cilíndricos de acero inoxidable con dos estructuras filtrantes absolutas (HEPA) a través de los cuales ingresa y egresa el aire (9). Esta unidad se montó sobre una base metálica a una altura de 80 cm.

Foto I - Aislador Flexible

Para el armado de los filtros de entrada y salida de aire se utilizó un cilindro metálico cribado envuelto con material filtrante, cuyas aberturas se sellaron con papel celofán para su esterilización por autoclave.

Foto II Sistema de filtros

Foto III Lana de vidrio (material filtrante)

Para ensamblar la unidad aisladora se conectó el motor de insuflación mediante mangueras al filtro y éste al cuerpo del aislador; el túnel de acceso también al cuerpo; y luego el filtro de salida. Una vez completado el armado se presurizó y se verificó la hermeticidad de la unidad. Para ello se pulverizó la superficie interna con una solución de amonio cuaternario con el objeto de detectar fugas a través de la observación de burbujas (7, 9, 10). Verificada la hermeticidad, se ingresaron las cajas y las rejillas para ratones, una plancha de goma para protección del piso del aislador y una pinza.

## ESTERILIZACIÓN

Utilizando una pistola eléctrica modelo CANE se pulverizó la parte interna del aislador y los insumos que se encontraban dentro, con una solución de ácido peracético (Oxidial) al 2% en agua destilada dejándolo actuar durante 24 horas. Luego se procedió a romper con la pinza el celofán protector de los filtros para comenzar a ventilar el aislador durante un día con el objeto de eliminar los residuos del ácido (7, 11, 12).

## VERIFICACIÓN DE LA ESTERILIDAD DEL AISLADOR

Luego de la pulverización con ácido peracético se verificó la esterilidad del aislador realizando un control microbiológico del interior del mismo. Se utilizaron los métodos de placa abierta y de hisopado de paredes para evaluar la presencia de mesófilos, coliformes, pseudomonas y hongos (13, 14).

En el caso del primero se colocaron en el interior del aislador durante 15 minutos tres juegos de placas, compuestos por: agar sangre base con la adición de 5 % de sangre de oveja desfibrinada (Britania), agar McConkey (Britania), agar cetrimide (Britania) y agar Sabouraud (Britania). Dos juegos sobre el piso en cada extremo y un tercer juego de placas en el piso del túnel de acceso. Todas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, excepto el agar Sabouraud el cual se incubó de 5 a 7 días a temperatura ambiente (15, 16).

En el segundo método se tomaron las muestras de las superficies internas con hisopos estériles previamente humedecidos con PBS estéril. Los hisopos luego se sembraron en placas con los medios mencionados anteriormente, y se incubaron para su posterior recuento.

**REGULACIÓN DE PARÁMETROS MACROAMBIENTALES:**

**Flujo de aire:** La presión interna óptima de 10 mm de columna de agua, se estableció midiendo la diferencia entre el interior y el exterior del equipo a través de un manómetro.

**Temperatura:** La misma se reguló dentro de la sala de aisladores en un rango entre 22 y 25 °C controlándola con termómetros.

**Iluminación:** Se programó un ciclo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad mediante interruptores horarios.

Una vez confirmada la esterilidad de la unidad se introdujeron dentro de bolsas de PVC, a través de la doble puerta del túnel de acceso, los insumos autoclavados necesarios para el mantenimiento de los animales (alimento, agua, instrumental quirúrgico, viruta para lecho, tarjetas, lápices y bolsas para los desechos). Den-

tro del túnel se pulverizaron con la solución de ácido peracético, dejándolo actuar durante 24 horas, luego de las cuales ingresaron al interior del aislador.

Para comprobar la esterilidad de los insumos se utilizó un bioindicador (medio enriquecido de esporas del bacilo *G. stearotermophilus* 3M) que se colocó durante el proceso de autoclavado y luego se incubó a 37° C durante 24 - 48 horas (17).

Por último, se introdujeron 6 ratones inmunodeficientes N:NIH(S)- *nu/nu*, hembras de 4 semanas de edad, y 6 ratones inmunocompetentes N:NIH(S)- *+/nu*, hembras de 4 semanas de edad libres de patógenos específicos (SPF), en cuatro cajas dentro de una doble bolsa de PVC autoclavada. En el túnel se pulverizó la superficie externa de la bolsa con la solución de ácido peracético dejándola actuar durante 2 horas. Luego se retiró la bolsa externa e ingresaron al aislador

A los 30 días posteriores al ingreso se tomó una muestra compuesta por 4 ratones: 2 *nu/nu* y 2 *+/nu* para realizar el primer control microbiológico de acuerdo con el protocolo de rutina (18).

Durante la experiencia, el sistema se controló a través del siguiente cronograma de acuerdo con los métodos de rutina:

Tabla I. Control microbiológico por placa abierta.

Control microbiológico por placa abierta	Sangre		McConkey		Cetrimide		Sabouraud	
	IA	TA	IA	TA	IA	TA	IA	TA
Día 0 s/animales								
Día 10 s/animales								
Día 35 c/animales								
Día 65 c/animales								
Día 95 c/animales								
Día 125 c/animales								

IA: interior del aislador TA: túnel de acceso

Tabla II - Control microbiológico por hisopado

Control microbiológico Ambiente por hisopado	Hisopado piso	Hisopado techo	Hisopado pared
Día 0 s/animales			
Día 10 s/animales			
Día 35 c/animales			
Día 65 c/animales			
Día 95 c/animales			
Día 125 c/animales			

Tabla III. Control microbiológico animales

Control microbiológico animales	4 ratones por muestra
Día 0 ingreso animales	
Día 30	
Día 60	
Día 90	

Tabla IV. Resultados del control microbiológico por placa abierta

Control microbiológico por placa abierta	Sangre		McConkey		Cetrimide		Sabouraud	
	IA	TA	IA	TA	IA	TA	IA	TA
Día 0 s/animales	0	0	0	0	0	0	0	0
Día 10 s/animales	0	0	0	0	0	0	0	0
Día 35 c/animales	0	0	0	0	0	0	0	0
Día 65 c/animales	0	0	0	0	0	0	0	0
Día 95 c/animales	0	0	0	0	0	0	0	0
Día 125 c/animales	0	0	0	0	0	0	0	0

IA: interior del aislador TA: túnel de acceso

Tabla V. Resultados del control microbiológico por hisopado

Control microbiológico ambiente por hisopado	Hisopado piso	Hisopado techo	Hisopado pared
Día 0 s/animales	0	0	0
Día 10 s/animales	0	0	0
Día 35 c/animales	0	0	0
Día 65 c/animales	0	0	0
Día 95 c/animales	0	0	0
Día 125 c/animales	0	0	0



Foto I Aislador flexible.



Foto II. Sistema de Filtros



Foto III. Lana de vidrio. Material filtrante

Tabla I. Control microbiológico por placa abierta

Tabla II. Control microbiológico por hisopado

Tabla III. Control microbiológico animales

## RESULTADOS

Los controles microbiológicos de la unidad aisladora, tanto en el método de placa abierta como en el de hisopado fueron negativos. No se observó crecimiento de microorganismos mesófi-

Tabla VI. Resultados del control microbiológico de animales.

<b>Diagnóstico Bacteriológico</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 30</b>	<b>Día 60</b>	<b>Día 90</b>
<i>Salmonella</i> spp.	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Escherichia coli</i> 0115a.c:K(B)	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Pasteurella multocida</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Mycoplasma</i> spp.	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4

  

<b>Diagnóstico Serológico</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 30</b>	<b>Día 60</b>	<b>Día 90</b>
<i>Virus Sendai (HVJ)</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Virus hepatitis murina (MHV)</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Mycoplasma</i> spp.	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Sialodacryoadenitis (SDA)</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Clostridium piliformis (Tizzer)</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Virus diminuto del ratón (MVM)</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Virus de la encefalomiелitis murina</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4

  

<b>Diagnóstico parasitológico</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 30</b>	<b>Día 60</b>	<b>Día 90</b>
<i>Eimeria</i> spp.	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Giardia muris</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Spiroucleus muris</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Syphacia obvelata</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Syphacia muris</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Myobia musculi</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
<i>Aspicularis tetraptera</i>	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4

los en agar sangre, ni de coliformes totales en agar McConkey, *Pseudomonas* spp en agar cetrímide, ni hongos en agar Sabouraud.

En el caso de los controles microbiológicos de rutina realizados en los animales fueron todos negativos para los siguientes microorganismos:

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demostraron que los animales mantuvieron su condición microbiológica inicial y no se contaminaron a lo largo de la experiencia (13, 14). Esto se debió a que

tanto el armado, montaje y controles de la unidad aisladora como el manejo de los animales y equipo por parte del personal fueron adecuados (8, 9, 11).

Se concluyó que las unidades aisladoras son un sistema eficiente para el mantenimiento de ratones inmunodeficientes. En nuestro país es posible contar con este tipo de tecnología. Asimismo es imprescindible que el personal esté bien entrenado para ejecutar en forma metódica y eficiente los procedimientos de trabajo (7, 9, 10).

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos la colaboración de la Lic. Estela Rogers, Juan Cook y al personal del área de preparación de materiales del Bioterio por su intervención en la preparación de insumos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Carbone C, Maschi F. El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Revista Química Viva*. Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA. 2006.
2. Hansen CT, Fogh J, Giovanella B. The nude gene and its effects. *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research*. Eds. New York: Academic Press. 1978; p.1-35.
3. CCAC [Canadian Council on Animal Care]. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. 2nd ed. Ottawa Canada: CCAC. 1993.
4. Clark Derrel J. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 1996; p. 22-48.
5. MacDonald HR, Blanc C, Lees RK, Sordat B. Abnormal distribution of T-cell subsets in athymic mice. *J. Immunol*. 1986; (136): 4337-4339.
6. Clough G. UFAW Handbook. *The animal House: design, equipment and environmental control*. UFAW. 1991; p. 108 – 143.
7. Coates ME, Gustafsson BE. *Germ Free Animals in Biomedical Research*. 1984; p. 11-48.
8. Ferrer Bazaga S, Martinez Escandell A. *SECAL – Animales de Laboratorio: Prevención de riesgos en la exposición a agentes biológicos*. 2003; p. 19-23.
9. Michael FW. Festing. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. Churchill Livingstone. 1976; p. 57 – 73.
10. Lawson T. *LAT Manual de entrenamiento*. American Association for Laboratory Animals Science. 2000.
11. Eaton P. UFAW Handbook. *Higiene in the animal House*. UFAW. 1991; p. 144 – 157.
12. Abraham G, Muschilli J, Middleton D, Richmond JY. *Animal experimentation in level 4 facilities. Anthology of Biosafety. V. BSL-4 Laboratories*. Mundelein IL: American Biological Safety Association. 2002; p. 343-359.
13. Bennett M., Parks S.R., & Dennis M.J. Containment testing of negative pressure isolators used to house laboratory animals infected with BL3 agents. *FELASA: Internationalisation and harmonization of laboratory animal care and use issues*. 2004; p. 137 -144.
14. Lipman N. S., Corning B. F., Saifuddin M. Evaluation of isolator caging systems for protection of mice against challenge with mouse hepatitis virus. *Laboratory Animals*. 1993; p. 134 – 140.
15. Carlberg D. *Cleanroom Microbiology for the Non Microbiologist*. Interpharm Press, Inc. Buffalo Grove, Illinois. 1995.
16. Clavell L, Pedrique de Aulacio M. *Microbiología. Manual de Métodos Generales* (2da edición). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. 1992.
17. Perkins Scott E, Neil S. Lipman. Characterization and Quantification of Microenvironmental Contaminants in Isolator Cages with a Variety of Contact Beddings. *Contemporary Topics*. 1995. (34) N° 5: 93 -97.
18. Riley Lela K. Development of a Performance Assessment Program for Research Animal Diagnostic Laboratories and Defining Microbiologic Testing Standards. *Microbial Status and Genetic Evaluation of Mice and Rats*. 1999; p. 7-13.
19. Cercos Augusto P. *Aves y mamíferos libres de germen*. Gnotobiología. Colección Científica del INTA. 1978. p. 49-130.