

CAPÍTULO 4.10.

RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÓVULOS/EMBRIONES DE ROEDORES Y CONEJOS DE LABORATORIO

Artículo 4.10.1.

Estado microbiano de las colonias de animales de laboratorio

Las colonias de diversas especies y genotipos de *animales* de laboratorio se crían por lo general en locales especializados y su estado microbiano depende en gran parte del sistema utilizado para constituir y mantener la colonia. En el presente capítulo, se considera que el estado microbiano de las colonias es de tres tipos principales: “definido”, “convencional” e “indefinido”. Las colonias de estado definido son aquellas en las cuales los *animales* están en un medio totalmente exento de microorganismos patógenos y no patógenos (es decir, gnotobiótico), aunque a veces se administre ulteriormente un cóctel de microorganismos no patógenos conocidos. En uno y otro caso, las colonias definidas son criadas en un medio sumamente controlado en salas separadas por barreras, con protocolos estrictos que tienden a eliminar cualquier fuente eventual de contaminación microbiana indeseada. Las colonias de estado convencional son aquellas en las que los *animales* son criados en colonias cerradas pero donde puede haber patógenos conocidos (“específicos”) o microorganismos no patógenos. Aunque los protocolos de gestión de las colonias convencionales pueden ser menos rígidos que para las colonias definidas, están diseñados para controlar eventuales fuentes de contaminación microbiana. Para asegurarse de que los *animales* no resulten infectados por microflora indeseada, se toman precauciones de asepsia simples (por ejemplo, esterilización con autoclave de los alimentos y la cama). Por último, los *animales* de laboratorio pueden ser criados en colonias de estado microbiológico indefinido, donde no hay restricciones y que pueden incluir los *animales* criados al aire libre. Para más detalles sobre los diferentes tipos de colonias, véase el Informe de la FELASA¹.

La situación sanitaria de todas las colonias definidas y convencionales deberá controlarse al menos cada tres meses mediante pruebas bacteriológicas, virológicas, parasitológicas, serológicas y otras a las que deberán someterse *animales* centinela preseleccionados u otros miembros representativos de la colonia. Se suele seleccionar machos reproductores de edad avanzada que hayan engendrado ya varias camadas, por ejemplo.

La finalidad del control sanitario oficial de los embriones de roedores y conejos de laboratorio destinados a intercambios internacionales consiste en garantizar el control de microorganismos patógenos específicos, que pueden estar asociados a los embriones, y evitar la transmisión de *infección* a los *animales* receptores, la descendencia y las colonias. Los requisitos de gestión de los donantes y la manipulación de embriones varía en función del estado microbiano de la colonia, es decir, si es definido (incluido el estado gnotobiótico), convencional o indefinido.

Artículo 4.10.2.

Condiciones aplicables al equipo de recolección de embriones

El equipo de recolección de embriones es un grupo de técnicos capacitados para proceder a operaciones de recolección, tratamiento y conservación de embriones/ovocitos. El equipo comprende por lo menos un profesional experimentado.

Deberá reunir las siguientes condiciones:

1. El equipo debe ser dirigido por un técnico profesional experimentado.

2. El técnico profesional es responsable de todas las actividades del equipo que incluyen la inspección sanitaria de la colonia y del donante, la manipulación y cirugía de los donantes en condiciones sanitarias apropiadas y los procedimientos de *desinfección* e higiene. El técnico profesional rendirá cuentas al *veterinario* de la institución.
3. El *veterinario* de la institución deberá ser certificado o acreditado en el cuidado de *animales* de laboratorio y contar con la autorización expresa para la recolección de embriones destinados a la exportación. Es responsabilidad del *veterinario* de la institución asegurarse de que se apliquen los procedimientos requeridos de tipificación sanitaria del estado de la colonia. Es responsable de certificar que los procedimientos de manipulación de embriones y las instalaciones de laboratorio son conformes a los requisitos establecidos en el presente capítulo.
4. El personal del equipo deberá estar debidamente adiestrado para aplicar las técnicas y los principios de control de *enfermedades* y a utilizar técnicas asépticas en la manipulación de los embriones. El potencial zoonótico de los agentes patógenos específicos que afecten a las diversas especies de *animales* de laboratorio deberá identificarse y comprenderse a fin de evitar la contaminación de las colonias por medio de los vectores humanos y viceversa.
5. Se deberán respetar reglas de higiene estrictas para evitar la introducción de *infecciones* en los *animales* donantes, colonias, instalaciones y equipos. Deberán tomarse disposiciones para impedir que el personal que entre en otras instalaciones de cría de *animales* pueda tener libre acceso a las instalaciones de recolección y manipulación de embriones.
6. El equipo deberá trabajar en instalaciones adecuadas y disponer del material necesario para:
 - a) la recolección de embriones;
 - b) la manipulación y tratamiento de embriones en un laboratorio fijo o móvil;
 - c) el almacenamiento de embriones.
7. El *veterinario* de la institución debe velar por la conservación de los registros completos de los *animales* y embriones, incluidos los registros de recolección, manipulación y almacenamiento de embriones. De ser aplicable, se usarán hojas de registro del tipo indicado en el Manual de la IETS² para las especies ganaderas, y se indicarán datos tales como la identificación genotípica de los donantes, la gradación de la calidad embrionaria, el estadio morfológico. El equipo de recolección de embriones deberá llevar un registro de sus actividades que conservará durante por lo menos los dos años consecutivos a la exportación de los embriones para presentarlo a la *Autoridad Veterinaria* en caso de inspección.
8. El equipo de recolección de embriones que participe en la exportación de embriones deberá estar autorizado por la *Autoridad Competente* y ser inspeccionado periódicamente por un *veterinario oficial* para asegurarse de que respeta las normas sanitarias durante la recolección, la manipulación y la conservación de los embriones.

Artículo 4.10.3.

Condiciones aplicables al laboratorio de manipulación

El laboratorio de manipulación utilizado por el equipo de recolección de embriones es una instalación donde se recuperan los embriones de los donantes (o del conducto reproductor extirpado) y de los medios de recolección. Los embriones son examinados y sometidos a los tratamientos necesarios, como la crioconservación para almacenamiento y cuarentena en función de los resultados de diagnóstico. El laboratorio de manipulación puede formar parte de una unidad de recolección y tratamiento específicamente diseñada para ese fin o ser una parte expresamente acondicionada de un edificio existente, y puede estar situado en el lugar en que residen las hembras donantes. En cualquier caso, el laboratorio deberá estar físicamente separado de los *animales*.

Además:

1. El laboratorio de manipulación deberá estar bajo la supervisión directa del *veterinario* de la institución y ser inspeccionado periódicamente por un *veterinario oficial*.
2. Durante las manipulaciones que preceden la conservación de los embriones destinados a la exportación en ampollas, frascos o pajuelas, no deberá efectuarse ninguna operación con embriones de condición sanitaria inferior.
3. El laboratorio de manipulación deberá estar construido con materiales que permitan una limpieza y una *desinfección* eficaces. Estas operaciones deberán efectuarse con frecuencia, y siempre antes y después de cada manipulación de embriones para la exportación.

Artículo 4.10.4.

Gestión del riesgo

En lo que concierne la transmisión de *enfermedades*, la transferencia de embriones recolectados *in vivo* es un método de intercambio de material genético de *animales* de laboratorio que entraña muy poco riesgo. Independientemente de la especie animal considerada, el proceso de transferencia de embriones comprende tres fases que determinan el nivel definitivo de riesgo.

1. La primera fase comprende el riesgo potencial de contaminación de los embriones, la cual depende:
 - a) de la situación zoonosanitaria del *país exportador* y/o de la zona de exportación;
 - b) del estado microbiano de la colonia (es decir, definido, convencional o indefinido) y de las hembras donantes de las que son extraídos los embriones;
 - c) del poder patógeno de los agentes patógenos específicos que preocupan a la *Autoridad Veterinaria* del *país importador*.
2. La segunda fase corresponde a la disminución del riesgo mediante la utilización de procedimientos de tratamiento de embriones internacionalmente reconocidos y definidos en el Manual de la IETS². Dichos procedimientos son los siguientes:
 - a) Dependiendo del estado microbiano de la colonia, los embriones serán lavados hasta 10 veces con diluciones de 1/100 por lo menos entre cada lavado, y para transferir los embriones de un lavado a otro se utilizará una pipeta nueva.
 - b) Sólo se lavarán juntos los embriones procedentes de una misma hembra donante, y no más de diez embriones a la vez.
 - c) A veces, por ejemplo, cuando la supresión de ciertos virus (herpesvirus por ejemplo) sea necesaria, se modificará el procedimiento estándar de lavado y se harán lavados suplementarios con tripsina, de acuerdo con las indicaciones del Manual de la IETS².
 - d) Después del lavado se examinará toda la superficie de la zona pelúcida de cada embrión con lentes que aumenten por lo menos 50 veces su tamaño y se certificará que está intacta y (aparte de la capa de mucina en el caso de los embriones de conejo) exenta de materia adherente.
3. La tercera fase, que se aplica a las *enfermedades* que preocupan a la *Autoridad Veterinaria* del *país importador*, incluye las reducciones del riesgo resultantes de:
 - a) la vigilancia del estado microbiano de la colonia de donantes basándose en los *períodos normales de incubación* de las *enfermedades* consideradas, para determinar retrospectivamente el estado de salud de la colonia mientras los embriones son almacenados en el *país exportador* (si se trata de especies que pueden ser conservadas mediante crioconservación);
 - b) análisis post mortem en laboratorio de muestras de los donantes u otras muestras, como la sangre, líquido de recolección de embriones (enjuague) y embriones no viables, para detectar la presencia de agentes patógenos específicos.

Artículo 4.10.5.

Condiciones aplicables al veterinario del equipo/laboratorio de recolección de embriones

1. El *veterinario* de la institución debe velar por la aplicación de los procedimientos de análisis sanitario requeridos para demostrar el estado microbiano de la colonia (es decir, definido, convencional o indefinido). El estado microbiano de la colonia debe ser revisado por el *veterinario* de la institución antes de la expedición de los embriones.
2. El *veterinario* debe certificar que los procedimientos de manipulación de los embriones y las condiciones de trabajo en el laboratorio son conformes a las indicaciones de los Artículos 4.10.2. y 4.10.3.
3. El *veterinario* es responsable de los procedimientos de gestión del riesgo contemplados en el Artículo 4.10.4.
4. El *veterinario* debe autorizar todas las expediciones de embriones y asegurarse de que los debidos registros de recolección de los embriones y los documentos de certificación sanitaria han sido debidamente cumplimentados y enviados con los lotes.

Artículo 4.10.6.

Condiciones aplicables a los donantes de colonias de animales de diferente estado microbiano

Cabe señalar que las condiciones aplicables a los *animales* donantes varían según el estado microbiano de la colonia de origen, es decir, definido, convencional o indefinido.

Los *animales* centinela en cada colonia de donantes de estado definido y convencional deberán ser objeto del cribado microbiano de rutina, de preferencia cada mes, pero cuando menos trimestralmente. Las pruebas para detectar agentes patógenos específicos varían según la especie animal y también según la situación geográfica. Las recomendaciones respecto a los agentes microbianos específicos que deberán detectarse en las pruebas en diferentes especies de *animales* de laboratorio se han recogido en otras publicaciones¹.

1. Estado microbiológico definido

- a) Las colonias (Artículo 4.10.1.) definidas microbiológicamente representan la fuente de gametos más «limpia», y cabe considerar que los embriones que se obtienen de estos *animales* están libres de agentes patógenos.
- b) Puesto que los machos y hembras donantes están libres de agentes patógenos, la disección del aparato reproductor de las hembras y la recolección de los embriones deben realizarse en condiciones asépticas usando una cabina de seguridad biológica si procede.
- c) Aunque no es necesario lavar los embriones según se describe en el punto 2 del Artículo 4.10.4., se recomienda lavarlos dos o tres veces. En cada lavado, se agitarán suavemente en medio.
- d) Se llevarán registros de los embriones con la indicación de si proceden de colonias criadas en medios gnotobióticos, o en recintos aislados con condiciones microbiológicas definidas, lo que indicará que no se precisan procedimientos especiales de gestión del riesgo (Artículo 4.10.4.) para eliminar los agentes patógenos. La necesidad de poner en cuarentena a las hembras receptoras se deja a la decisión del instituto importador.

2. Condiciones convencionales

- a) Las colonias de estado microbiano convencional por lo general son cerradas y su situación sanitaria es objeto de controles periódicos (Artículo 4.10.1). Los *animales* pueden haber estado expuestos a distintos agentes patógenos, lo que conducirá a la *infección* con detección de anticuerpos, o incluso a la manifestación de síntomas clínicos, pero el agente o los agentes patógenos importantes en cada colonia individual deben ser bien conocidos.

- b) El aparato reproductor (útero, oviductos y/o ovarios) será extraído en un lugar separado y llevado luego al laboratorio de manipulación de embriones. Estas operaciones deberán efectuarlas diferentes técnicos o, si no, deberá exigirse, como mínimo, el cambio de ropa de protección entre los dos lugares. En caso de manipulación de los *animales* en el laboratorio, la disección de los aparatos reproductores se efectuará en una cabina de seguridad biológica, para evitar la diseminación de agentes patógenos en el laboratorio.
- c) Una vez extraído el aparato reproductor, se procederá a la recolección de los embriones en condiciones asépticas. En función de los eventuales patógenos presentes en la colonia, los embriones serán manipulados conforme a los procedimientos de gestión del riesgo, incluido el lavado, según se describe en el Artículo 4.10.4. y en el Manual de la IETS².
- d) Los embriones procedentes de *animales* que posean anticuerpos o presenten otros síntomas de contaminación por determinados agentes patógenos no podrán ser transferidos a una nueva colonia, si no es con la condición de que se aplique un sistema de cuarentena y de que se utilicen hembras receptoras criadas en condiciones microbiológicas definidas. En caso de duda sobre el estado microbiano de la colonia de donantes o de los donantes, la cuarentena también puede ser apropiada. En situaciones en que haya podido haber exposición de los embriones a una *infección* bacteriana, se procederá a su cultivo durante 24 horas en un medio que contenga un antibiótico apropiado antes de la crioconservación, o en el intervalo entre la descongelación y la transferencia a los receptores.
- e) Si la institución receptora decida poner en cuarentena a las hembras receptoras y su descendencia hasta que se confirme su estado de salud, los receptores serán sometidos a pruebas para detectar agentes patógenos de interés, y sólo se introducirá la descendencia en la colonia si los resultados de las pruebas son satisfactorios.

3. Condiciones microbiológicas indefinidas

- a) Los embriones de *animales* criados al aire libre o de colonias cuya situación sanitaria se desconoce requerirán la gama completa de procedimientos de gestión del riesgo que se describen en el Artículo 4.10.4. y en el Manual de la IETS². Estos procedimientos son similares a los utilizados con embriones de ganado tal como se recomienda en los Capítulos 4.7. y 4.8. del presente *Código Terrestre*. En condiciones ideales, los machos reproductores y las hembras donantes deben ser separados de otros *animales* y controlados 15 días antes y el día mismo del apareamiento (en el caso de los machos), o en el momento de la recolección de los embriones (en el caso de las hembras). Otra posibilidad consiste en introducir a estos *animales* en una colonia convencional, en la que con el tiempo pueda establecerse su historial sanitario, para reducir las prescripciones estrictas relativas a su vigilancia y a la manipulación de los embriones.
- b) Se utilizará una cabina de seguridad biológica para la manipulación de los donantes y tejidos reproductivos, y para la manipulación de embriones.
- c) Una vez recolectados los embriones y ovocitos, puede ser apropiado un análisis post mortem de las hembras donantes para detectar las *enfermedades* o agentes patógenos que tengan importancia para el *país importador*. Si los embriones se recolectan por medios quirúrgicos, una alternativa es analizar una parte alícuota del líquido de aclarado de cada hembra donante, o una muestra de líquidos mezclados, para detectar la presencia eventual de agentes patógenos.
- d) Se lavarán los embriones al menos 10 veces según los procedimientos indicados en el Manual de la IETS². Se utilizará un tratamiento de tripsina si están presentes ciertos herpesvirus patógenos que planteen problemas.
- e) El laboratorio exportador conservará los embriones congelados hasta que hayan concluido los análisis necesarios de las colonias, tejidos o líquidos, y el *veterinario* del instituto haya completado y firmado los documentos aclaratorios para la certificación.

- f) A su llegada al *país importador*, los embriones serán transferidos a las hembras receptoras en un sistema de cuarentena. Las receptoras serán sometidas a análisis a intervalos apropiados a fin de reconocer los *períodos de incubación* de las *enfermedades* en cuestión. Además de someter a controles a las receptoras se someterá a controles a la descendencia a las 12 semanas de edad y antes de su introducción en colonias de reproductores situadas fuera de las instalaciones de cuarentena.

Artículo 4.10.7.

Condiciones aplicables al almacenamiento y al transporte de embriones

1. Los embriones destinados a la exportación se congelarán en nitrógeno líquido fresco y luego se almacenarán en nitrógeno líquido fresco dentro de tanques o contenedores limpiados y desinfectados.
2. Los embriones se almacenarán en ampollas, frascos o pajuelas esterilizados y precintados en condiciones de higiene estrictas en un lugar de almacenamiento autorizado por la *Autoridad Veterinaria* del *país exportador*. Sólo se almacenarán juntos embriones de un mismo donante en una misma ampolla, frasco o pajueta.
3. Las ampollas, los frascos o las pajuelas se precintarán en el momento de la congelación (o antes de la exportación si no es posible la criopreservación) y se etiquetarán claramente conforme al sistema recomendado en el Manual de la IETS² u otro sistema similar. La identificación incluirá detalles de la especie o genotipo de los donantes, el estado microbiano (definido, convencional o indefinido), la fecha de recolección o de criopreservación, el número de embriones y la etapa de desarrollo, el número del contenedor y detalles de los procedimientos especializados, tales como la fecundación *in vitro*, micromanipulación.
4. Los contenedores de almacenamiento de nitrógeno líquido se precintarán bajo la supervisión del *veterinario oficial* antes de ser expedidos del *país exportador*.
5. Los embriones no deberán exportarse hasta que no se hayan ultimado los certificados veterinarios pertinentes.

Artículo 4.10.8.

Fecundación *in vitro* micromanipulación

Con los embriones que deban ser producidos por fecundación *in vitro* de los ovocitos, se recomienda utilizar el semen lavado, para reducir en la mayor medida posible el riesgo de exposición a agentes patógenos. Si los embriones serán sometidos a micromanipulaciones especializadas, con penetración de la zona pelúcida, se tomarán primero las medidas de gestión del riesgo requeridas (incluido el lavado), tal como se describe en el Capítulo 4.9.

-
- 1 **Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies.** Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA), Working Group on Animal Health accepted by the FELASA Board of Management, November (1992).
 - 2 Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.