

PROTOCOLOS DE BIOSEGURIDAD PARA LA CONTENCIÓN DE ENFERMEDADES EN ANFIBIOS Y PECES PARA EXPERIMENTACIÓN



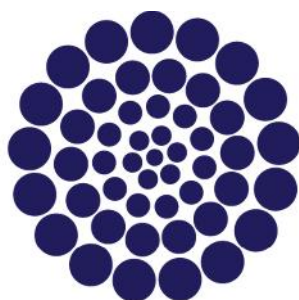
Preparación y edición del manual técnico

Dr. Luis Humberto Escalera Vázquez

CONACyT - Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

CONACyT-Convocatoria I0027-2015-01
Número de Proyecto 264235

Octubre 2016



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Diseño y logotipo de portada: Adriana Rodríguez Villaseñor y Luis Escalera.

Diseño de esquemas: Moisés A. Mendoza, Jorge E. Bolaños y Luis Escalera.

Fotografías: Luis Escalera.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	4
2.	NORMAS BÁSICAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL PERSONAL DE APOYO Y DE INVESTIGACIÓN.....	5
3.	IDENTIFICACIÓN DE ÁREAS, EQUIPO E INSTALCIÓN Y ZONAS SE SEGURIDAD.	6
3.1.	Instalación eléctrica.....	6
3.2.	Sistemas experimentales.....	9
3.2.1	Sistemas de recirculación cerrada.....	9
3.2.2	Estanques de experimentación de circulación cerrada.....	10
3.2.2.1	Descripción del filtro mecánico y biológico de los estanques de experimentación de circulación cerrada.....	12
3.3	Sistema de tratamiento de agua.....	14
3.3.1	Tratamiento de agua.....	15
3.3.1.1	Tratamiento previo a los experimentos.....	15
3.3.1.2	Uso del generador de ozono.....	16
3.3.1.3	Tratamiento de agua al final de los experimentos.....	17
3.3.1.4	Control de temperatura (zona experimental; Zona 2).....	18
3.5.	Sistemas de cuarentena.....	20
3.5.1.	Filtro y aireación del sistema de cuarentena.....	21
4.	PROTOCOLO GENERAL DE CUARENTENA Y USO DE ORGANISMOS UTILIZADOS PARA EXPERIMENTACIÓN.....	22
4.1	Eutanasia.....	23
4.2	Manipulación de organismos infectados en experimentos.....	25
4.3	Protocolo de mantenimiento, descontaminación, limpieza y desecho de material infeccioso.....	25
4.4	Control de insectos y roedores.....	26
5.	ALMACENAMIENTO DE QUÍMICOS.....	27
6.	MANEJO DE EMERGENCIAS.....	27


CONSIDERACIONES



El presente manual contempla puntos importantes sobre medidas de bioseguridad relacionadas el estudio de anfibios y peces en condiciones experimentales. El contenido del mismo, considera formas de manejo y contención de individuos, y medidas de seguridad dentro del Área Experimental del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (AE-INIRENA-UMSNH), tomando como base medidas y estándares internacionales, así como los niveles de bioseguridad aplicables a dicha área de experimentación (Bioseguridad nivel 1). Este manual puede funcionar como guía sobre el manejo y contención de anfibios y peces en sistemas de experimentación externos al establecido en el AE-INIRENA-UMSNH; sin embargo, dadas las características particulares de cada laboratorio se sugiere ampliamente considerar las diferencias en las instalaciones, así como las especies de anfibios y peces de estudio y el tipo de infecciones a tratar y experimentar.

El presente manual contará con actualizaciones, las cuales se encontrarán disponibles en la página web INIRENA-UMSNH (<http://www.inirena.umich.mx/>) con la finalidad de que el personal que haga uso del AE, lea y comprenda el funcionamiento del mismo, con el objetivo primordial de evitar la infección, transmisión de enfermedades o fuga de individuos, así como del uso óptimo del material y equipo presente en el AE-INIRENA-UMSNH.

Por lo anterior, se sugiere ampliamente que el personal que haga uso temporal o permanente de dichas instalaciones, lea cuidadosamente las normas y funcionamiento de las mismas.

Cabe mencionar, que la información aquí presentada está dirigida a investigadores, técnicos y alumnos de carreras afines a las áreas biológicas que desarrollen o estén interesados en desarrollar investigación en dicha AE; la cual sea una guía para conocer los protocolos de bioseguridad y funcionamiento del área y los sistemas de experimentación. El signo de advertencia  en el manual indica información importante.

Como citar este manual: Escalera-Vázquez, Luis H. (2016) Protocolos de bioseguridad para la contención de enfermedades en anfibios y peces para experimentación. Morelia, Michoacán. Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

In his retort the alchemist repeats the work of nature

- James Douglas Morrison -

1. INTRODUCCIÓN

La experimentación en anfibios y peces en laboratorio requiere en su mayor parte de sistemas acuícolas a baja escala que garanticen no solamente el éxito del experimento, sino también evitar la propagación y transmisión de enfermedades, ya sea porque en el experimento se consideró estudiar enfermedades de estos grupos biológicos o por enfermedades propias que se presenten a lo largo del mismo. Por lo que desarrollar áreas de experimentación adecuadas y que cuenten con un nivel de aislamiento, manejo y desinfección del agua y del material utilizado a lo largo de los experimentos cobra gran importancia, ya que se evita la transmisión y propagación de agentes biológicos con potencial infeccioso al ambiente, así como la seguridad del personal que labore directa o indirectamente dentro de las instalaciones en donde se realicen este tipo de experimentos.


El Instituto de Investigaciones Sobre los Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (INIRENA-UMSNH) cuenta con un área para realizar experimentos con anfibios y peces nativos. Dichas instalaciones están diseñadas para realizar experimentos con enfermedades emergentes de dichos grupos biológicos. Dentro de los niveles de Bioseguridad, esta área está catalogada como Nivel de Bioseguridad 1 (BSL-1), por lo que los agentes infecciosos que se consideren en los experimentos no representan una amenaza para la salud humana.

Cabe mencionar, que los agentes infecciosos considerados en este nivel, no causan enfermedades en humanos adultos saludables; sin embargo, se debe evitar que el personal que presente un sistema inmune comprometido temporal o permanentemente (ej. enfermedades respiratorias, alergias, etc.), evite dichas instalaciones. Como ejemplo de agentes estudiados en áreas y laboratorios BSL-1 se encuentran: *Bacillus subtilis*, *Naegeria gruberi*, virus de hepatitis canina infecciosa, y sepas de *E. coli* no patógenas (Nelson 2003-2008), por lo que para este nivel solo se requieren prácticas estandarizadas sencillas pero constantes de trabajo en las áreas en las que se realicen los experimentos, las cuales se mencionarán en el presente manual. Algunas de las medidas de bioseguridad mencionadas en este manual, pueden parecer triviales; sin embargo, se mencionan con el objetivo de que tanto el personal experto como principiantes conozca los procedimientos, y así se evite: la propagación de enfermedades, una alta mortalidad de los individuos de estudio, pérdida del experimento, y fallas en el equipo y sistemas experimentales por un mal manejo en el funcionamiento del mismo. También, se

recomienda consultar a los responsables y expertos técnicos del área experimental sobre cualquier duda que se presente, tanto en el funcionamiento como en los protocolos de bioseguridad relacionados a dicha área.

2. NORMAS BÁSICAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL PERSONAL DE APOYO Y DE INVESTIGACIÓN

Al ingresar, y mientras se trabaje dentro del área experimental se requiere que el personal cumpla con normas básicas para evitar contaminación dentro de los experimentos y seguridad propia del personal. Por lo que, con base en lo anterior, se debe de:


- No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el área experimental.
- Utilizar equipo de protección (bata de laboratorio, botas aislantes, guantes de laboratorio y lentes protectores).
- **NUNCA salir del AE con las batas y botas utilizadas dentro del AE.**
- Desinfectar las botas en la zona especificada dentro de la Zona 2 (área amarilla).
- Lavar frecuente de manos, especialmente después del uso de guantes y antes de salir del área experimental.
- Mantener la puerta del área de experimentación cerrada en todo momento.
- Observar los límites en el acceso al espacio del área experimental al trabajar, así como en caso de mover equipo, determinar previamente el sitio (temporal o permanente) en donde dicho equipo será utilizado.
- Descontaminar de superficies de trabajo después de cada uso y después de cualquier derrame. En superficies de acero inoxidable (ej. Mesas) utilizar desinfectantes antibacterianos que contengan alcohol isopropílico, etílico o propílico. **NO** utilizar productos que contengan hipoclorito de sodio (NaClO) o productos químicos abrasivos. 
- En caso de utilizar material inflamable, minimizar salpicaduras y aislar el material y equipo que pueda verse comprometido o dañado por salpicaduras o alcance por flama.
- Aumentar precauciones al usar objetos punzantes (tijeras, agujas, escalpelos, etc.), lo que incluye el uso de contenedores especiales para desecho de agujas y otros objetos punzantes.

- Desechar en contenedores especiales, material de uso exclusivo de laboratorio y buscar asesoría sobre los procedimientos de desecho y desinfección de dicho material.
- Consultar normas y legislación sobre el uso de Animales en Laboratorio (ej. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999).

3. IDENTIFICACIÓN DE ÁREAS, EQUIPO E INSTALCIÓN Y ZONAS SE SEGURIDAD

El área experimental está dividida en dos zonas principales, una de equipamiento del personal y de uso común, en la cual no se desarrollan experimentos y funciona como acceso principal al área experimental (Zona 1). En esta zona se encuentran los sistemas de cuarentena, el equipo a utilizar (ej. batas, botas) y todos los mandos eléctricos que controlan el funcionamiento de la zona destinada a realizar los experimentos (Zona 2; ver figura 1).

3.1. Instalación eléctrica

Por seguridad y en caso de una emergencia (ej. fuego, cortos circuitos, mal funcionamiento del equipo), los controles de mando eléctrico (Figura 2) se encuentran en la Zona 1 (ver figura 1 controles de carga e interruptor general) y  cada interruptor indica la zona y el tipo de voltaje que se suministra en la Zona 2. Por lo que, en caso de emergencia, se deberá salir de la Zona 2 y de ser necesario apagar la alimentación eléctrica desde la Zona 1, e inmediatamente avisar al personal a cargo y/o a expertos autorizados.

Dado que dentro de la Zona 2 se contempla el uso de diversos equipos eléctricos, los cuales varían en el voltaje de trabajo, se cuenta con conexiones bifásicas que suministran voltajes de 110 (conexiones color blanco) y 220 (conexiones color rojo) y trifásicos (conexiones color gris; ver figura 3), por lo que se sugiere verificar el voltaje que utiliza cada equipo, utilizar la corriente correcta y cerciorarse que las zonas en las que se suministra dicha alimentación eléctrica serán las logísticamente correctas en términos de funcionamiento y manejo del (los) experimentos.

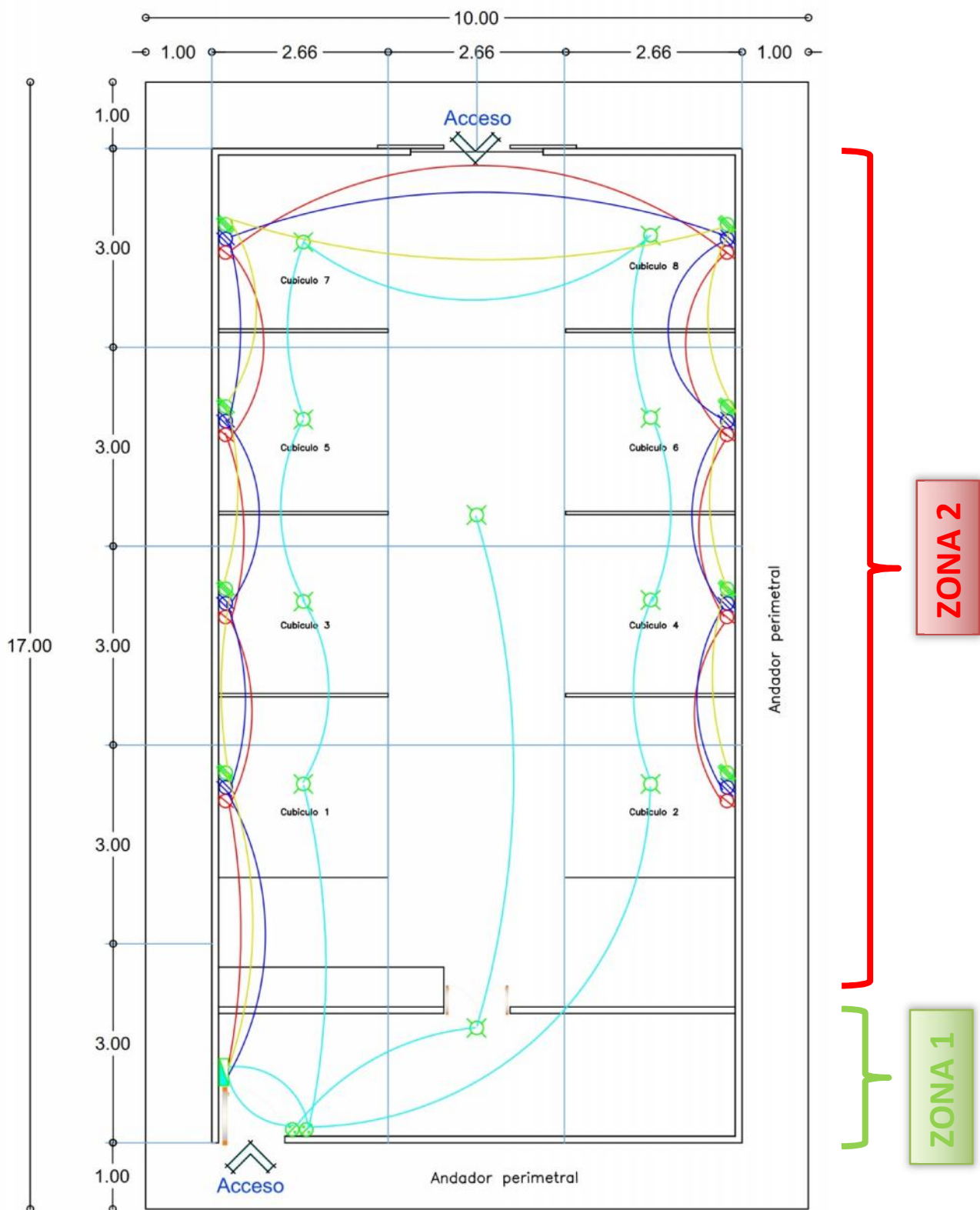


Figura 1. Esquema de la distribución de zonas e intalación eléctrica del área experimental

SINBOLOGIA	
	SALIDA INCANDESENTE Y / O SPOT
	CENTRO DE CARGA QO 4
	INTERRUPTOR GENERAL
	LINEA POR MUROS Y LOSAS
	CONTACTO MONOFASICO 127 V
	CONTACTO BIFASICO 220 V
	CONTACTO TRIFASICO 220 V
	APAGADOR SENCILLO

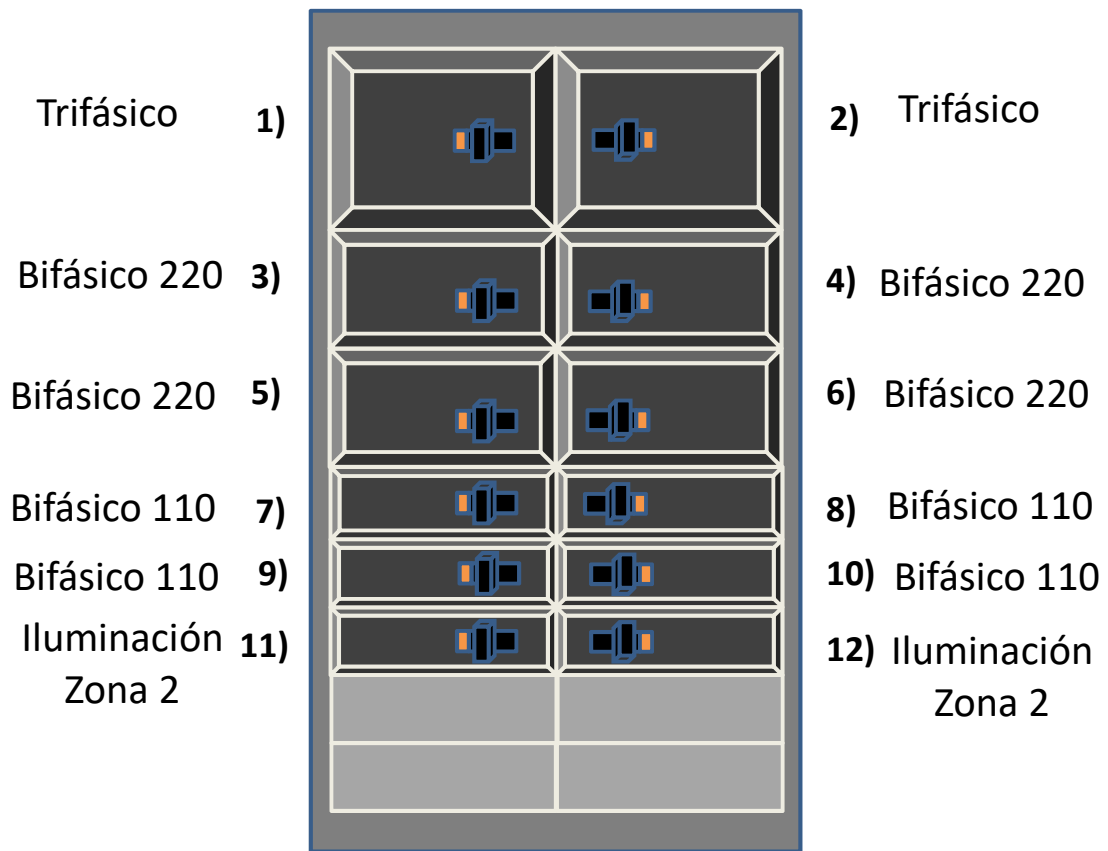


Figura 2. Esquema del control de mandos eléctricos ubicado en la zona 1.



Figura 3. Conexiones bifásicas que suministran voltajes de 110 (color blanco) y 220 (color rojo) y trifásicos (conexiones color gris).

3.2. Sistemas experimentales

Los sistemas experimentales del AE-INIRENA-UMSNH, se diseñaron con el objetivo de que fueran versátiles considerando diferentes diseños experimentales, así como facilitar la adecuación del material y equipo relacionado/complementario a experimentos específicos. A continuación, se describen sus características y funcionamiento, los cuales deben ser considerados al momento de implementar y proponer un diseño experimental relacionado a la investigación que se proponga en un momento dado. Los sistemas experimentales se encuentran en la Zona 2 del AE y por ningún motivo deben ser trasladados a otras zonas ni modificados en su estructura general, así como remover y modificar partes que comprometan su funcionamiento básico. En caso de requerir e implementar equipo específico, se debe notificar al personal responsable del AE para su evaluación.

3.2.1. Sistemas de recirculación cerrada

Los 4 (cuatro) sistemas de recirculación cerrada están contruidos con material inerte, y cada uno presenta una configuración con 10 (diez) contenedores con una capacidad de 60 litros, en los cuales la capacidad y flujo de agua puede ser regulada; los contenedores están interconectados a un sistema de recirculación de agua, el cual permite homogeneizar las condiciones del agua entre todos los contenedores, y de esta manera generar réplicas en los experimentos (Figura 4). El sistema cuenta con un reservorio de agua, el cual mantiene el volumen de agua de forma homogénea en todos los contenedores experimentales, y funciona como compartimento para el sistema de bombeo de agua y control de temperatura del sistema (en caso de que el experimento lo requiera). Cabe mencionar que, cuando el sistema experimental se encuentre en funcionamiento, el reservorio debe tener agua, la cual genere una profundidad de por lo menos 25 cm.

Este sistema cuenta con un filtro mecánico y biológico (Figura 5), el cual esta contruido con vidrio templado, con la finalidad de observar directamente el proceso de filtración, lo cual permite reconocer los momentos en los que haya que reemplazar algún componente importante (ej. biobolas) o dar mantenimiento y desinfección al mismo.



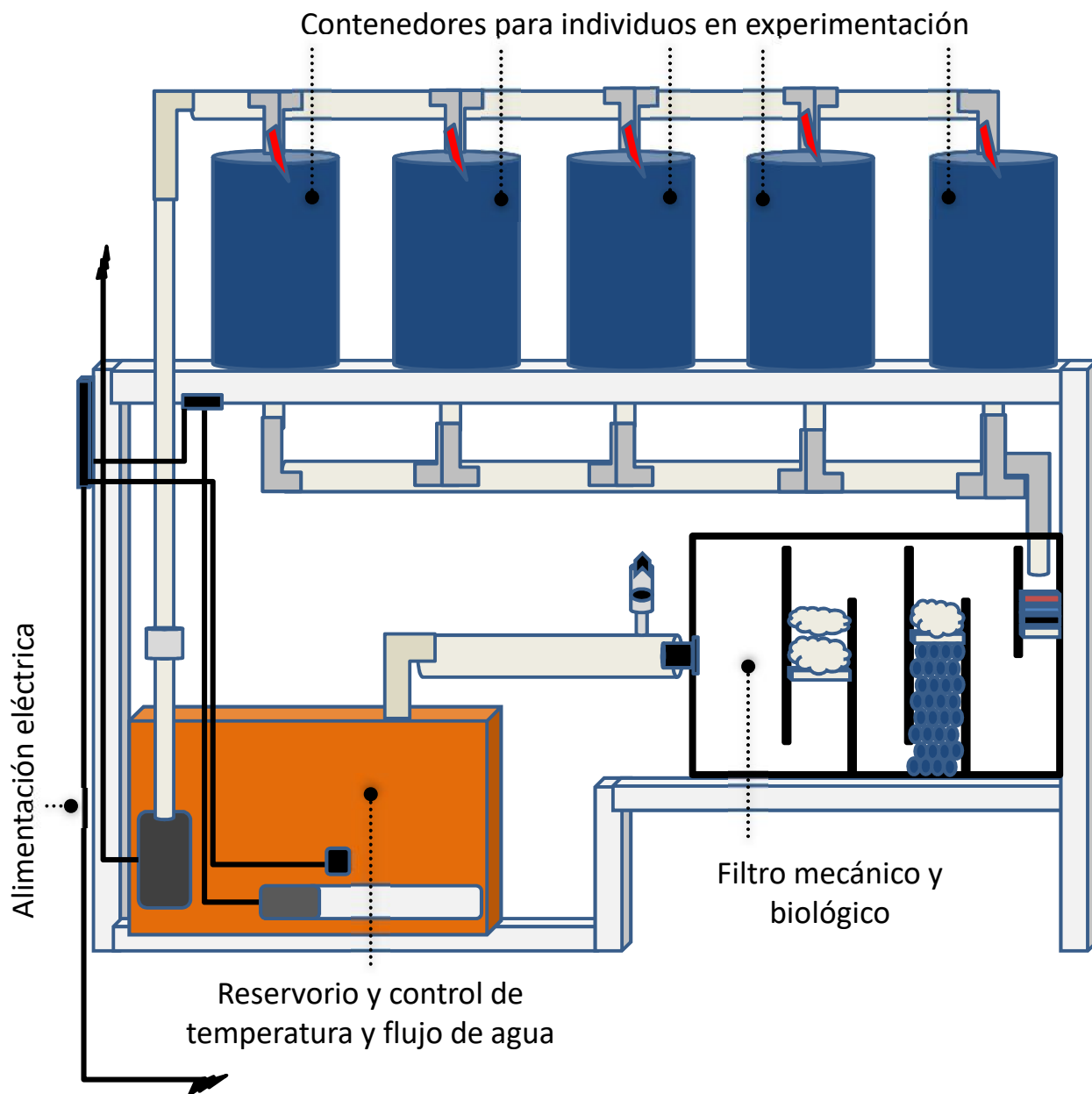


Figura 4. Esquema del sistema de recirculación cerrada (vista lateral).

3.2.2. Estanques de experimentación de circulación cerrada

Los estanques están diseñados para realizar experimentos en los cuales se considere una mayor cantidad de individuos, y por consiguiente un mayor volumen de agua (Figura 6). Estos estanques cuentan con un sistema que permite una circulación cerrada e

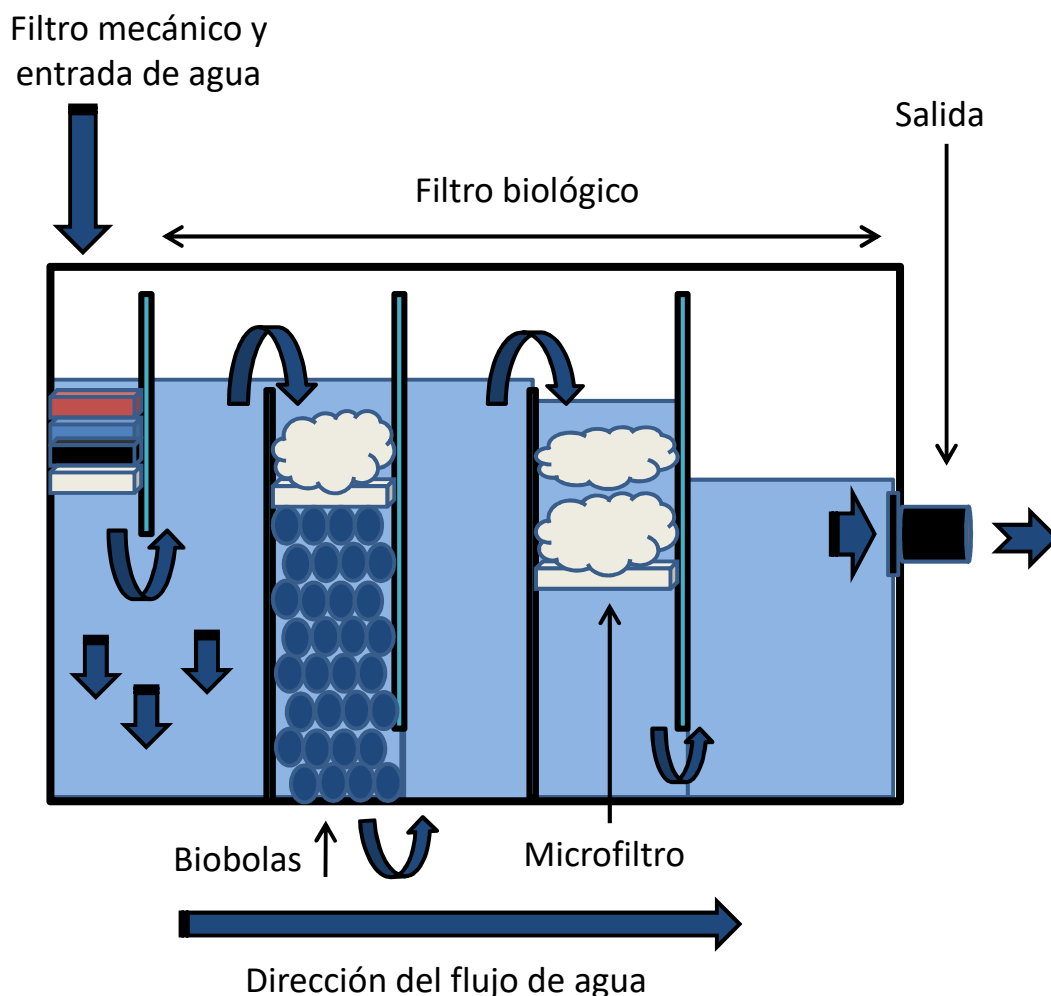


Figura 5. Esquema sobre el funcionamiento de filtración del sistema de recirculación cerrada (vista lateral).

independiente entre cada estanque, y simultáneamente puede filtrar el agua mediante rayos ultravioleta (UV), así como mediante filtración mecánica y biológica. Este tipo de filtro es de fácil mantenimiento; sin embargo, se sugiere ampliamente identificar los diferentes compartimentos que este presenta y los cuales se muestran en la figura 7. En caso de requerirlo, los estanques cuentan con una brida, la cual permite incluir una instalación hidráulica adicional en interconectar los diferentes estanques; antes de realizar dicha instalación, se sugiere revisar las medidas del material o sistemas adicionales con la finalidad de que su ensamble sea el óptimo, ya que las bridas forman parte de la estructura principal del estanque y no deben ser removidas por ningún motivo. Al igual que en los sistemas de recirculación cerrada, y en caso de requerir e implementar equipo específico a los estanques, se debe notificar al personal responsable del AE para su evaluación.

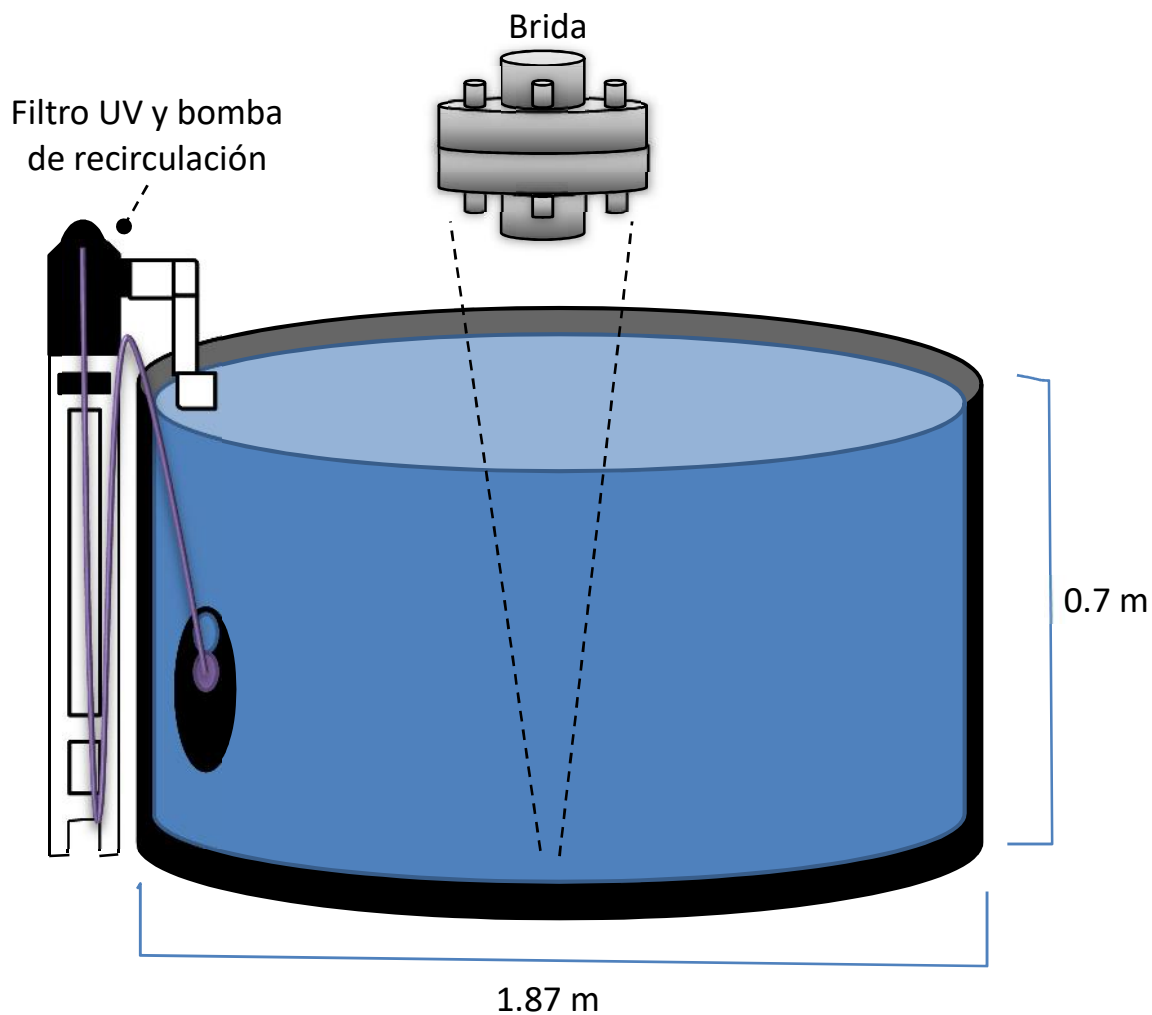


Figura 6. Esquema de un estanque de circulación cerrada.

3.2.2.1 Descripción del filtro mecánico y biológico de los estanques de experimentación de circulación cerrada

A continuación, se describe brevemente las partes y funcionamiento del filtro integrado a los estanques de experimentación; cada número pertenece a una parte del filtro, la cual se muestra en la figura 7.

- 1) Conexión para ducto por donde ingresa el agua a el filtro, el cual al entrar pasa por un canal donde se encuentra el filtro UV, ayudando a la eliminación de algas y bacterias que se encuentren el agua. Al terminar el paso del canal, el agua entra al filtro mecánico y biológico el cual está formado de dos partes:

- 2) La esponja de color azul funciona como filtro mecánico para retener impurezas solidas de mayor tamaño como eses o restos de alimentos;
- 3) La esponja de color amarilla funciona como filtro biológico, la cual está “cargada” de bacterias que promueven la purificación del agua, ya que participan en el ciclo del nitrógeno permitiendo la desnitrificación del amonio en nitritos y nitratos;
- 4) Finalmente, una vez que el sistema completa la recirculación del agua, ésta llena el filtro hasta llegar al ducto de salida, por donde desemboca al estanque y comienza de nuevo el ciclo de filtración.

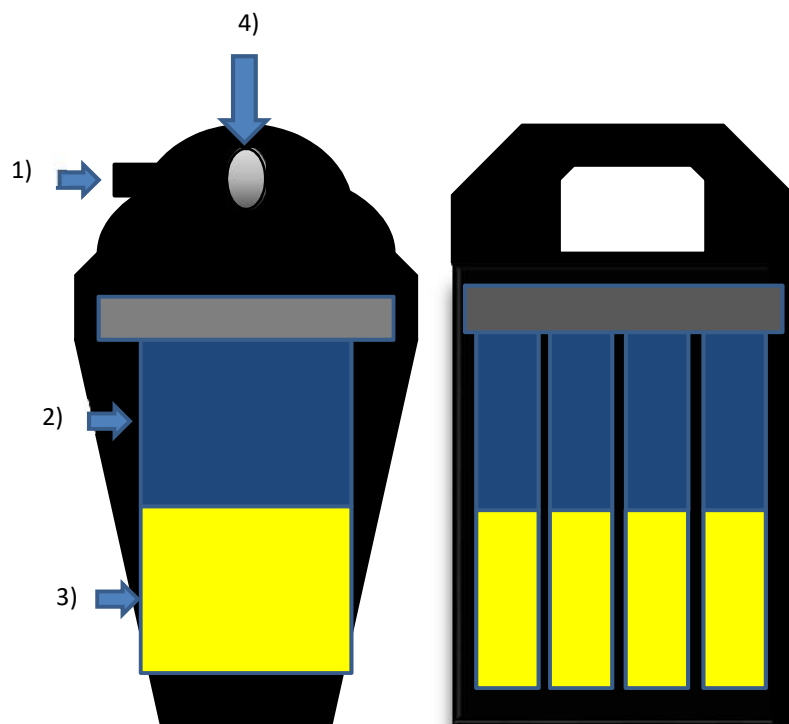


Figura 7. Esquema del filtro mecánico y biológico de los estanques de experimentación de circulación cerrada.

Bomba de succión interna de los estanques de recirculación cerrada

El sistema de filtración cuenta con una bomba hidráulica interna para la extracción de agua, la cual siempre debe estar sumergida, por lo que se deben seguir los siguientes pasos para verificar su correcto funcionamiento:

- 1) Se sumerge la bomba hidráulica por completo y se conecta la manguera de la bomba al filtro.

- 2) Se conecta a la corriente eléctrica (110 V), para que comience a trabajar la bomba hidráulica.
- 3) La bomba hidráulica succiona el agua del estanque mandándola al filtro mecánico biológico.
- 4) En caso de que la bomba hidráulica no se encuentre sumergida, ésta debe desconectarse de la alimentación eléctrica.

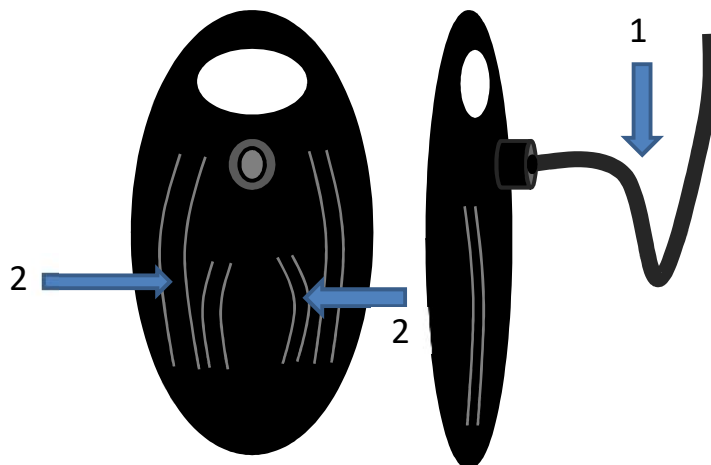



Figura 7. Esquema de la bomba hidráulica del filtro mecánico y biológico de los estanques de experimentación de circulación cerrada

3.3. Sistema de tratamiento de agua

El sistema de tratamiento de agua tiene el objetivo de proveer agua libre de bacterias, hongos y otros microorganismos que interfieran con nuestros experimentos o generen infecciones en los individuos de estudio o al personal de trabajo. También funciona como sistema de desinfección y tratamiento de agua para que, al finalizar los experimentos ésta pueda ser desechada de forma segura y libre de agentes infecciosos. 

El sistema de tratamiento de agua consta de dos etapas principales. La primera la constituye el reservorio de agua, el cual lo constituyen dos contenedores de 1600 L interconectados (haciendo un total de 3200 L), y los cuales presentan válvulas que permiten el flujo de agua desde de los sistemas experimentales y viceversa, lo que optimiza el tratamiento de agua pre y post experimentos. La segunda etapa lo constituye

un generador de ozono (O₃), el cual inyecta aire con ozono a los contenedores, desinfectando de manera eficiente (más que los rayos UV) el agua dentro de los contenedores. Por seguridad del personal, el generador de ozono **NUNCA DEBE DE ESTAR EN FUNCIONAMIENTO EN ESPACIOS CERRADOS Y POR MAS DE 10 MINUTOS.**



3.3.1. Tratamiento de agua

Por seguridad del equipo y del personal, en el momento de realizar el tratamiento de agua, el generador de ozono **SIEMPRE** debe de funcionar en la parte exterior en la zona de los contenedores de agua, así como debe de ser conectado a los contenedores de manera que no se presenten fugas de aire entre la conexión hidráulica del generador y los conductos que transportan el ozono/aire a los contenedores.

3.3.1.1. Tratamiento previo a los experimentos

El agua que se utilizará para los experimentos se debe obtener de la red que alimenta el AE. Para esto, se deben de abrir (forma vertical) las dos válvulas (azules) interconectadas, y cerrar la válvula superior izquierda (independiente) que se encuentran en la parte interna del AE hasta que los contenedores alcancen su capacidad de almacenamiento máximo (ver figura 8). Una vez llenados los contenedores, TODAS las

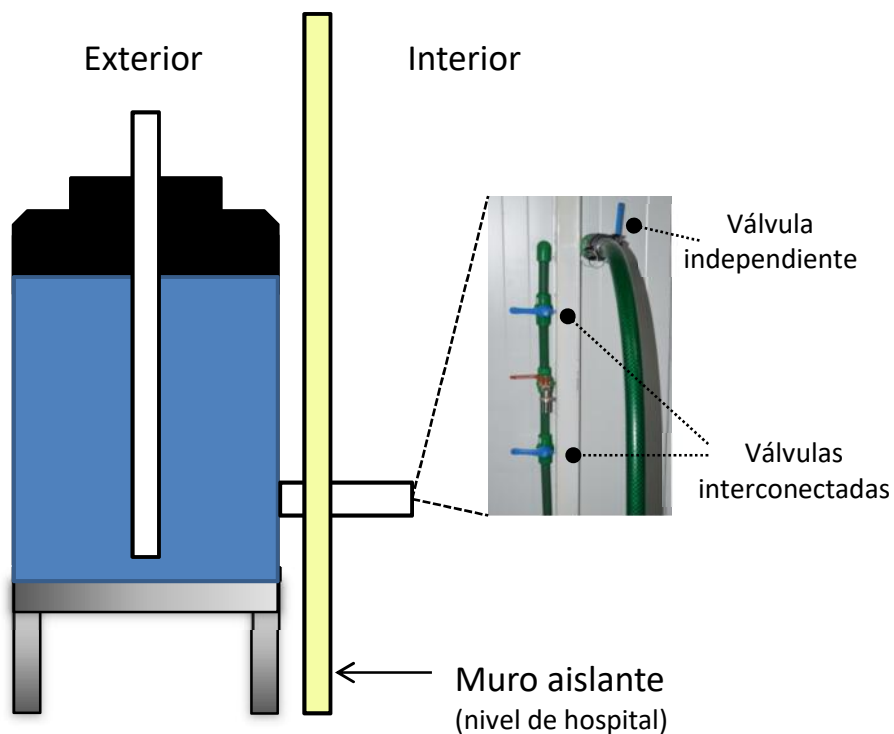


Figura 8. Esquema del contendor y válvulas de funcionamiento del Sistema de tratamiento de agua (vista lateral)

válvulas deben cerrarse para proceder con el encendido e instalación del generador de ozono.

3.3.1.2. Uso del generador de ozono

Antes de encender el generador de ozono, se debe asegurar que la conexión entre éste y los ductos que transportan el ozono/aire a los contenedores del reservorio esté asegurada e instalada correctamente (ver figura 9), así como cerciorarse que los contenedores no presenten interrupciones en los orificios de purga en la parte superior de los mismos. Una vez instalado el generador, se debe abrir la válvula de aire (válvula roja) y posteriormente encenderlo con el interruptor del *blower*, con el botón rojo “on” (ver figura 10), y dejarlo encendido por 30 segundos, esto hará que se genere solamente aire y se saturan los ductos internos del generador, permitiendo un mejor funcionamiento; en esta etapa se escuchará el sonido del motor en marcha. Una vez transcurridos los 30 segundos, se enciende el sistema de ozono con el interruptor metálico, en este momento se encenderá el led de color rojo, indicando que se está generando aire con ozono. En este paso no se percibe un cambio en el funcionamiento del motor, por lo que se debe observar cuidadosamente el *led* de color rojo. También, los contenedores generarán un sonido de burbujas, el cual está dentro del funcionamiento normal.

El tiempo de uso del generador de ozono **NO DEBE EXCEDER LOS 10 MINUTOS**, por lo que se sugiere usar un dispositivo de apagado automático (ej. *timer*) o contar con una alarma que indique el tiempo de uso del generador.



Una vez finalizado el tiempo de uso del generador, primero se debe de apagar el generador de ozono con el interruptor metálico y el *led* rojo deberá de apagarse, indicando que la generación de ozono esta interrumpida. En este paso no se perciben cambios en el funcionamiento del motor. Antes de apagar el *blower* (boton verde “off”), se debe de mantener encendido por 30 segundo, esto permitirá la salida del aire exedente en el equipo. Una vez apagado el generador, se debe de cerrar la válvula de air (válvula roja), desconectar el generador de la conexión hidráulica, y finalmente almacenar el equipo en el área designada.

Por ningún motivo, el generador debe permanecer en el exterior, así como nunca debe estar sin supervisión mientras este en funcionamiento.

3.3.1.3. Tratamiento de agua al final de los experimentos



Una vez finalizados los experimentos que se realicen en un momento dado, el agua utilizada deberá ser tratada mediante un proceso de ozono. Para esto, se debe verificar que los contenedores del sistema de tratamiento estén vacíos (ya que se llenarán con el agua utilizada en los experimentos) y que las válvulas interconectadas estén cerradas (posición horizontal). Una vez hecho esto, se conecta el sistema de experimentación que fue utilizado a la válvula independiente con ayuda de las conexiones y bombas hidráulicas que se encuentran adjuntas al sistema de tratamiento. Posteriormente, se enciende la bomba hidráulica. Esto permitirá que el agua utilizada en los experimentos sature los contenedores del sistema de tratamiento de agua. Una vez saturados los contenedores, se cierra la válvula independiente y se apaga la bomba hidráulica.

El procedimiento para tratar el agua con ozono, se realiza de la misma manera que en la sección anterior (ver sección “uso del generador de ozono”).

Una vez realizado el tratamiento del agua con ozono, se procede a liberar el agua en zonas útiles para riego interno. **NUNCA** se debe liberar el agua aun con tratamiento de ozono a la red general de drenaje.

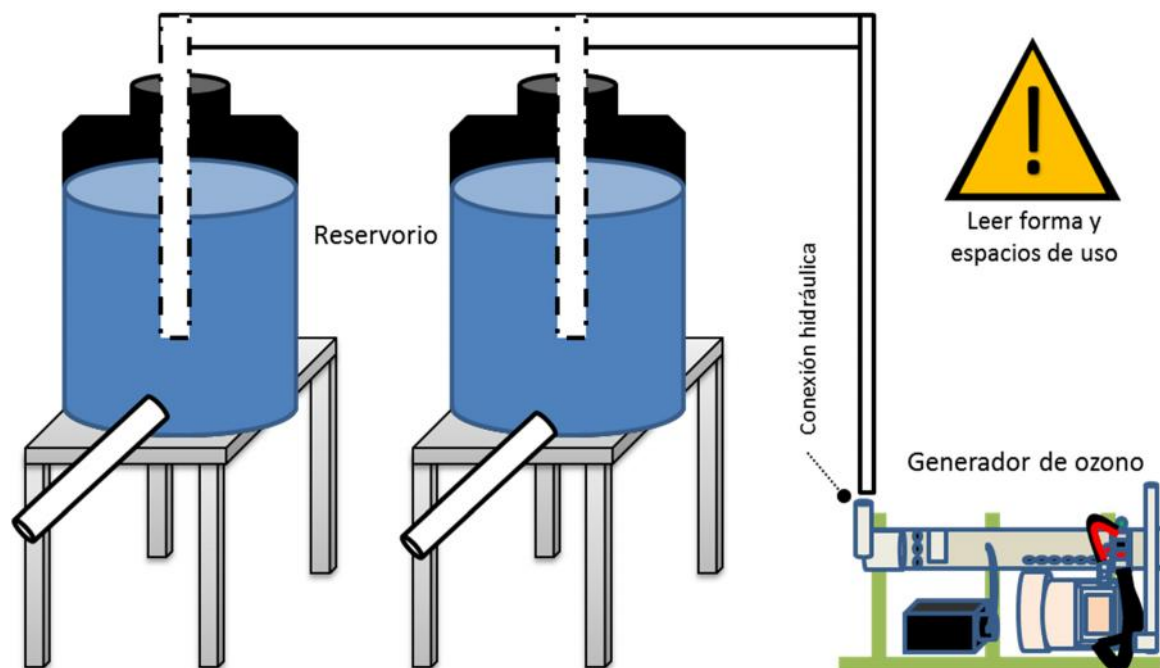


Figura 9. Esquema del sistema de tratamiento de agua con generador de ozono

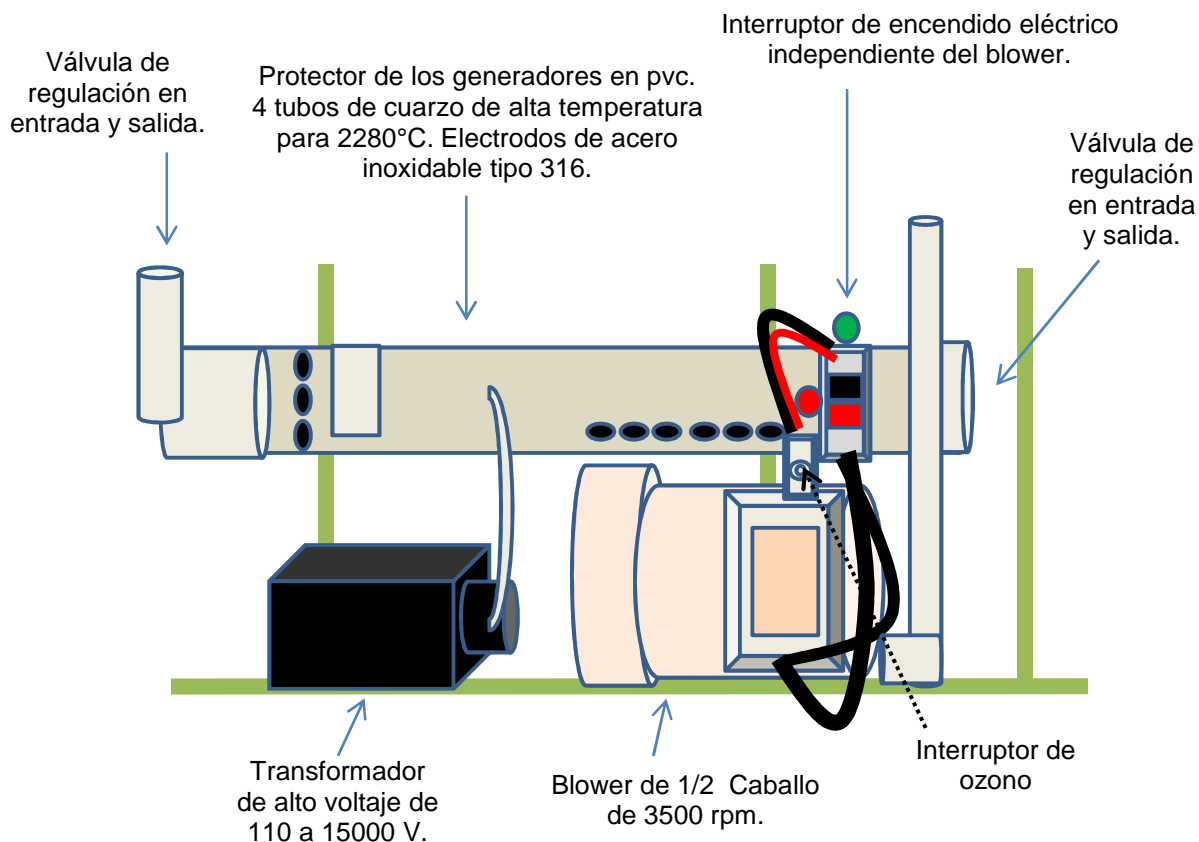


Figura 10. Esquema del generador de ozono (vista interna)

3.4. Control de temperatura (zona experimental; Zona 2)

La Zona 2 cuenta con un sistema que permite disminuir y mantener la temperatura. Dicho sistema cuenta con dos suministros de aire acondicionado tipo paquete, de 5 ton y opera con un voltaje de 220/3/60 y en gas 410^a. Esto permite tener temperaturas de 15-19°C en el ambiente.

Se recomienda identificar la zona en la que se encuentran dichos suministros (exterior del área experimental), así como identificar si ambos o solamente uno está en funcionamiento (esto en caso de que se requiera).

Para regular la temperatura ambiente, ésta se programa mediante el *display* que se encuentra en cada uno de los suministros en la parte inferior de la entrada de aire (figura 11). En caso de estar apagado, el *display* mostrará la temperatura actual debajo del indicador izquierdo *Inside* (números grandes) y la temperatura a la que está programado debajo del indicador *Setting* (números pequeños), así como indicará que está apagado

(off) en el recuadro inferior derecho (System). Para activar el funcionamiento, programe la temperatura deseada utilizando los botones ubicados en la parte derecha del *display* (flechas arriba y abajo), el indicador se desplazará en unidades de 0.5°C, oprima el botón inferior izquierdo (encendido/apagado), en el recuadro *System* aparecerá la leyenda *cool* y el suministro de aire frío comenzará en 3-5 segundos, en este momento se escuchará el motor principal en funcionamiento. En esta etapa, el suministro de aire será continuo hasta alcanzar la temperatura programada. Una vez que la temperatura ambiente llegue a la temperatura programa, el suministro de aire será intermitente (esto es parte del funcionamiento normal para regular la temperatura). Para detener totalmente el suministro de aire, presione el botón de encendido/apagado, el suministro de aire se detendrá en 10-15 segundos.

Cuando el suministro de aire no se encuentra en uso durante tiempos prolongados, la probabilidad de retener humedad es mayor, por lo que para evitar que los ductos y tubería interna se congelen, se recomienda bajar la temperatura de manera gradual, preferentemente un grado centígrado por día. Por ejemplo, si el experimento requiere de una temperatura ambiente de 18°C y la temperatura “actual” es de 22°C, entonces se requerirá de 4 días para llegar a los 18°C. Esto debe ser considerado al inicio del experimento.

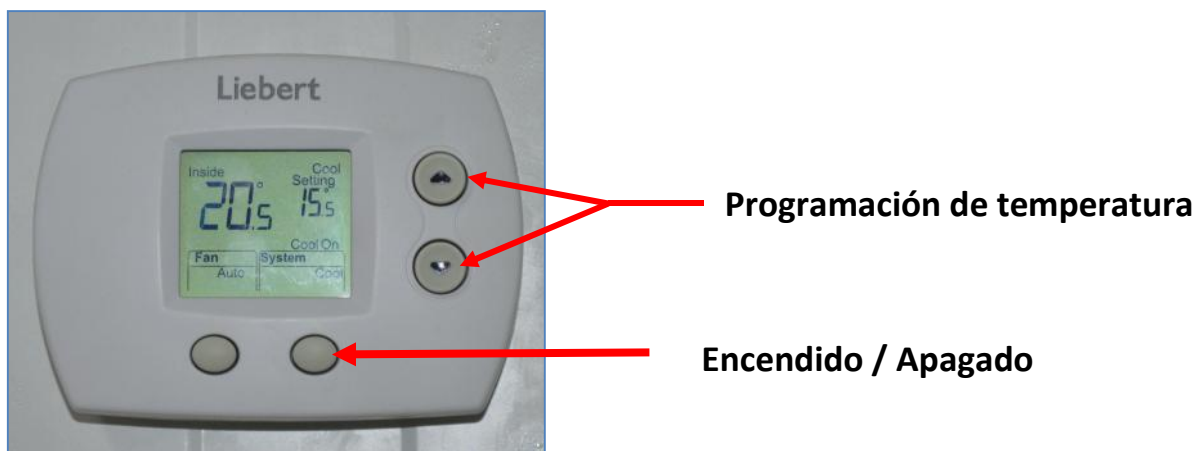


Figura 11. *Display* para programación de temperatura ambiente en la Zona 2.

3.5. Sistemas de cuarentena

Con el objetivo de controlar las enfermedades producidas por individuos que procedan del campo, o de cultivos en los cuales se desconoce la calidad del agua y las enfermedades potenciales de las que puedan ser vectores, los sistemas de cuarentena (figura 12) se encuentran en la Zona 1, aislados de la zona principal de experimentación (Zona 2) dentro del AE. Estos sistemas funcionan como sitio de aislamiento y tratamiento preventivo para individuos que serán utilizados en los experimentos, los cuales requieren de una supervisión de alrededor de 40 días, para asegurar que no tengan parásitos, hongos, bacterias o enfermedades infecciosas con el potencial de infectar a otros individuos, o producir sesgos en el diseño experimental.



Cabe destacar que, cada vez que se utilicen los sistemas de cuarentena, tanto los filtros como el sistema en general, deberán ser lavados y desinfectados para que estén disponibles constantemente.



Figura 12. Sistema de cuarentena (Zona 1 de la AE)

3.5.1. Filtro y aireación del sistema de cuarentena

El (los) filtros del sistema de cuarentena permiten generar una aireación constante, la cual promueve la eliminación del cloro (en caso de presentarse) en el agua, así como son fáciles de desinfectar y dar mantenimiento. El filtro y la bomba de agua están ensamblados para que funcionen de manera simultánea. A continuación, se menciona brevemente el funcionamiento (ver figura 13).

- 1) Se sumerge el tanto la bomba como el filtro y se conecta a la corriente eléctrica 110V. **NO** llevar a cabo el funcionamiento de la misma si esta no está completamente sumergida.
- 2) La bomba hidráulica comienza a succionar el agua conduciéndola por el filtro de esponja (color amarillo) y carbón activado.
- 3) El agua limpia y sale por un lado de la bomba hidráulica generando movimiento del agua tanto en la superficie como en el fondo de las acuario.
- 4) El mantenimiento consiste en desensamblar el filtro de la bomba y desinfectar y lavar ambas partes por separado.

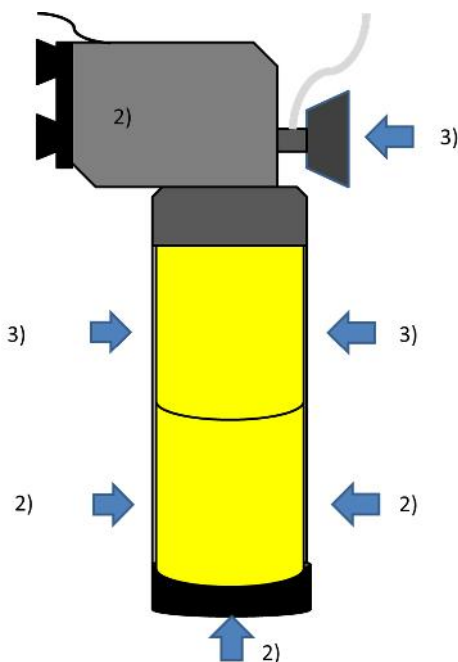


Figura 13. Sistema de cuarentena (Zona 1 de la AE)

4. PROTOCOLO GENERAL DE CUARENTENA Y USO DE ORGANISMOS UTILIZADOS PARA EXPERIMENTACIÓN

A continuación, se describen de manera general (y deben de considerarse solamente como referencias básicas y meramente informativas), técnicas para el uso de organismos acuáticos (peces y anfibios) en experimentación. Esto no indica que sean las únicas, por lo que sugiere ampliamente que, todos los procedimientos, medicamentos y sustancias relacionadas al experimento que se realice, deben de estar aprobadas / avaladas por Instituciones de Investigación, así como deben de cumplir con las normas relacionadas a la experimentación con animales dentro del marco legal que en cada país corresponda.



Ya que los individuos que se utilicen en los experimentos provendrán del campo, de centros de cultivo y en general, de condiciones en las cuales desconocemos la calidad del ambiente y el contacto potencial con agentes infecciosos, dichos individuos, inicialmente deben ser contenidos en los sistemas de cuarentena (ver sección 3.5) por un periodo de 30 a 40 días, así como se deben de manipular con equipo de protección como guantes, lentes y bata de laboratorio. Durante este tiempo, se debe de vigilar constantemente la presencia de bacterias, hongos y parásitos; dentro de los más comunes se encuentran *Dactylogyrus*, *Chilodonelas*, *Gyrodactylus*, *Costia* y *Saprolegnia*.

En el caso de que, al menos uno de los individuos dentro del mismo sistema de cuarentena presente síntomas de infección, no se utilizará ninguno de los individuos presentes aun cuando no se observen síntomas de infección. En este caso, se debe de identificar el agente infeccioso y comenzar el tratamiento. Ya que las dosis del medicamento dependerá de la especie del (los) individuo (s) enfermos, la densidad de los mismos y la capacidad del contenedor (litros), se recomienda seguir las instrucciones del medicamento.



Las sustancias activas más comunes para el tratamiento enfermedades en organismos acuáticos se muestran en la tabla 1.

Se recomienda que, al finalizar el tratamiento, aun cuando no se observen síntomas de infección, se mantengan los individuos por lo menos 10 días en observación y si no hay cambios o no se presenten nuevos síntomas, entonces se podrá proceder con los experimentos que se propongan en un momento dado, así como efectuar la limpieza del sistema de cuarentena (ver sección 3.5).

Tabla 1. Sustancias activas más comunes para enfermedades en organismos acuáticos

Sustancia activa
Sulfato de cobre
Cobre parcialmente quelado
Acriflavina (anti hongos)
Verde de malaquita
Permanganato de potasio

4.1 Eutanasia

En muchos experimentos sobre sobrevivencia/recuperación relacionada a diferentes respuestas de peces y anfibios a diferentes enfermedades o agentes infecciosos, generalmente habrá individuos que se debiliten, dejen de alimentarse y mueran de una manera lenta y dolorosa. En estos casos, se puede optar por la eutanasia, la cual evita que se prolongue el tiempo de sufrimiento de los individuos.

Dentro de las técnicas sugeridas y reconocidas a nivel mundial (e.g. American Veterinary Medical Association) para realizar la eutanasia en organismos acuáticos con el menor dolor posible, está la de sobredosis por anestésicos.

La tabla 2 muestra algunos de los anestésicos más utilizados en anfibios y la dosis **NO LETAL**, esto para tener un punto de referencia y aumentar la dosis en caso de

que se requiera proceder con la eutanasia. Se debe considerar que algunos de los anestésicos requieren de prescripción veterinaria, así como se debe de considerar las leyes locales para su adquisición. La concentración del anestésico a utilizar dependerá del tamaño del individuo y el contenedor en donde se realice la eutanasia, por lo que se sugiere consultar con expertos sobre el uso de anestésicos en la eutanasia en especies de anfibios y peces en los que se desconozcan las dosis letales.

Una vez realizada la eutanasia, se sugiere preservar al individuo en soluciones de alcohol al 70% o formol al 10%, e incluir una etiqueta indeleble con los datos de la enfermedad y datos que se consideren relevantes (ej. Localidad en donde fue colectado, uso que se le dio al individuo, etc.). En caso de que no se pueda preservar al (los) individuo (s), se deberá consultar a expertos o personas responsables sobre los protocolos a seguir y equipo a utilizar para el desecho de dichos individuos (ej. Incineración) evitando la propagación de los agentes infecciosos.

Tabla 2. Anestésicos comúnmente utilizados para eutanasia, dosis NO LETALES y grupos biológicos en los que se han probado.

Anestésico	Dosis	Grupo en que se han probado
Metasulfonato de triclaína, conocido también como MS 222. Se recomienda utilizar bicarbonato de sodio como solución estabilizadora (Buffer).	240 - 450 mg/l 1gr/l 3 gr/l	Ranas y salamandras Especies grandes de sapos
Benzocaina (en polvo o en clorhidrato). Se recomienda utilizar bicarbonato de sodio como solución estabilizadora (Buffer).	2 gm/l	Sapos y salamandras grandes
Isoflurano	Dosis variable	Aplicar en la piel (considerar susceptibilidad de la especie)

4.2 Manipulación de organismos infectados en experimentos

En experimentos en donde se manejen niveles de infección en organismos, se deben de seguir las normas básicas de contención y aislamiento (ver sección 2), así como de manipularlos con guantes, bata, botas y lentes de laboratorio. Para evitar contagios y sesgos entre los tratamientos, se sugiere utilizar guantes nuevos cada que se manipule un tratamiento/individuos diferentes, esto evitará el transporte de agentes infecciosos entre tratamientos y entre diferentes experimentos que se lleguen a realizar de manera simultánea.

Aun cuando los sistemas de experimentación se encuentran aislados de la red general de la toma y liberación de agua, se debe de evitar cualquier contacto directo con dichas instalaciones y salir del área experimental sin previa desinfección del personal. Por lo que, antes de que el personal salga de la zona 2 se deben de tomar las medidas necesarias descritas en la sección 2. También, por ningún motivo se deben de transportar fuera del área experimental y entre la Zona 1 y 2, individuos utilizados en los experimentos, sin previa desinfección, cuarentena, eutanasia y/o preservación (según sea el caso).



4.3 Protocolo de mantenimiento, descontaminación, limpieza y desecho de material infeccioso.

El material no desechable que se utilice de manera constante (ej. Cajas de Petri, charolas de disección, agujas de disección, tubos de ensaye, pipetas, etc.) debe de ser lavado y desinfectado cada vez que se utilice. Una vez desinfectado se recomienda el uso de autoclave (consultar especificaciones del equipo y material a desinfectar), y posteriormente guardar el material en zonas y gavetas específicas que eviten contaminación. Para el uso de autoclaves, así como para la identificación de espacios de almacenamiento, se debe de solicitar asesoría al personal y técnicos capacitados. También, se deben de lavar y desinfectar las mesas de trabajo, mediante técnicas establecidas con alcohol y calor (ej. Uso de un mechero).

El material desechable (ej. Jeringas, guantes, puntas de pipetas, etc.) se deben almacenar en contenedores específicos para posteriormente trasladarlos a instituciones

que manejan material infeccioso. En el caso de las jeringas, una vez utilizadas, coloca de nuevo la tapa de la jeringa, de forma que la aguja no quede expuesta. **NO** dobles, rompas o separes la aguja de la jeringa. Identifica los contenedores para agujas, los cuales estarán marcados con etiquetas con leyendas como "No reciclar", "Material peligroso" o "Material con desechos biológicos". Verifica que dichos contenedores sean de plástico, presenten una tapa de rosca, y que la distancia entre las jeringas (una vez introducidas al contenedor) y la tapa no rebasen los 7-8 cm. En caso de desconocer o no identificar dichos contenedores solicita asesoría al personal y técnicos capacitados.

Para el almacenamiento de muestras, éstas deben de estar debidamente etiquetadas, en contenedores cerrados con sistemas que eviten abrirse fácilmente y en sistemas de refrigeración que garanticen la inactividad de los agentes infecciosos mientras su almacenamiento, por lo que se sugiere utilizar equipo que permita disminuir la temperatura a más de -20°C . La zona 2 del área experimental cuenta con este equipo, por lo que se debe solicitar asesoría al personal y técnicos capacitados para determinar el tipo de muestra a almacenar, así como el espacio de almacenamiento requerido. **NUNCA** coloque muestras encima de otras de las cuales desconozca su procedencia o interfieran con el funcionamiento del equipo de almacenamiento (ej. Obstruir puerta de cerrado de un congelador).



Una vez finalizados los experimentos que se realicen, se deben de seguir los lineamientos mencionados en la sección 2 y 3 para la desinfección y limpieza de los sistemas de experimentación.

4.4 Control de insectos y roedores

El área experimental está sujeta a un programa de fumigación para controlar insectos. Dicha fumigación se realiza cuando no haya experimentos en curso, por lo que se sugiere que se notifique al coordinador del Área Experimental las fechas en las que se realizarán experimentos y su duración. Una vez realizada la fumigación, se da aviso sobre las fechas en las que las instalaciones pueden ser ocupadas de nuevo.

Para el control de roedores, se cuenta con trampas químicas en la parte externa, utilizando Bromadiolona al 0.005% (o similar). Las trampas son revisadas contantemente, por lo que se observan trampas destruidas o deterioradas, avise a los técnicos y personal capacitado. NO manipule dichas trampas sin autorización o con equipo protector (ej. Guantes, lentes).

5. ALMACENAMIENTO DE QUÍMICOS

Dependiendo del experimento que se realice, se requerirán diferentes tipos de químicos y reactivos relacionados a la investigación en curso. Por lo que se recomienda que: si los reactivos, químicos o sustancias serán de uso continuo, identificar y solicitar espacio de almacenamiento dentro de la zona 2, esto evitará que se transporten continuamente dichas sustancias, disminuyendo el riesgo de fugas, derramamientos o quemaduras al personal. Los espacios de almacenamiento, cuentan con material anticorrosivo; sin embargo, se debe asegurar que los recipientes en donde se almacenan las sustancias químicas (ej. botellas de vidrio, cajas de pipetas, etc.) estén totalmente cerradas para evitar derramamiento y quemaduras o irritaciones cutáneas al personal.

Evite manipular químicos o sus recipientes sin equipo protector (ej. Guantes, lentes, bata de laboratorio)



6. MANEJO DE EMERGENCIAS

El manejo óptimo de emergencias, tanto médicas como de los individuos en experimentación y los sistemas que los contienen, depende en gran medida de la capacidad de respuesta, criterio y experiencia del personal que utilice el AE. Por lo que, en esta sección del manual, se presentan formas básicas de respuesta, y ya que como las emergencias pueden presentarse de diferentes maneras, lo explicado aquí no sustituye de ninguna manera, el conocimiento adquirido a través de cursos de primeros auxilios, así como la experiencia en el manejo del equipo e instalaciones del AE.

Se recomienda ampliamente contar con un curso de primeros auxilios impartido por instituciones reconocidas (ej. Cruz Roja)



Emergencias relacionadas con los sistemas experimentales

Los sistemas experimentales están diseñados para evitar fuga de individuos en experimentación; sin embargo, una falla en los sistemas puede promover que la infección en individuos aumente. Esto se puede deber principalmente a: 1) Falta de agua en los sistemas de experimentación, provocando sobrecalentamiento (y falla total) de las bombas de recirculación, disminuyendo o deteniendo el flujo de agua. Para esto se recomienda observar continuamente el nivel de agua en los reservorios y en caso de ser necesario subir el nivel con agua (previamente tratada); 2) Obstrucción en los ductos de los sistemas experimentales, lo cual producirá que algunos contenedores no generen el flujo de agua necesarios. Para esto se recomienda observar, y en su caso dar mantenimiento, a los ductos de los sistemas.

Emergencia mayor

Se considera una emergencia mayor con el funcionamiento de los sistemas experimentales cuando no se puede solucionar, reparar o controlar de manera inmediata la falla en los sistemas. Cuando esto suceda, primero llame al técnico o investigador responsable, y en caso de ser posible, apague la alimentación eléctrica del sistema que presenta falla (ver figura 2) y abandone el área experimental.



Lo anterior está altamente relacionado con el conocimiento sobre el funcionamiento y diseño de los sistemas experimentales, para esto vea de la sección 3 a la 3.2.2.1.

**Ver de la sección
3 a la 3.2.2.1.**

Emergencias relacionadas con el personal

En esta sección, se menciona el cómo manejar una emergencia por quemadura, ya que el uso de químicos y fuentes de calor (ej. mecheros, estufas, autoclaves, etc.) es la forma más común de quemaduras en laboratorios.

Procedimiento para la atención de quemaduras

1. Evacuar al individuo de la fuente de calor, (ej. apagar las llamas o equipo que produce el calor, retirar el producto químico del contacto con la piel).
2. Evaluar al paciente y mantener los signos vitales.

Las de quemaduras por inhalación de gases como monóxido de carbono o productos de la combustión durante un incendio debe detectarse lo antes posible.

4. Buscar otras posibles lesiones (hemorragias, fracturas).

Se dará prioridad a la lesión más grave

5. Aplicar agua en abundancia (20-30 minutos) en la zona quemada. En este paso se debe evitar enfriar al paciente (riesgo de hipotermia).
6. Despojarse o remover todo aquello que mantenga el calor (ej. ropa, joyería, zapatos, lentes).
7. Cubrir la zona dañada con gasas o pañuelos limpios y húmedos con agua. El vendaje no debe ser apretado.
8. Dirigirse a un hospital, y mantener una posición lateral para evitar efectos secundarios (ej. vómito, mareos, desorientación, etc.).
9. Vigilar de forma continua signos vitales principalmente si la quemadura se produjo electrocución.

En un caso de quemadura **NUNCA**

1. Aplique o utilice pomadas y cremas sobre la quemadura (Solamente agua).
2. Enfriar excesivamente al paciente; enfríe solamente la zona afectada. En caso de presentarse temblores o la zona dañada en mayor al 20 %, se debe de utilizar manta térmica.

3. Ofrecer/tomar agua, alcohol, y analgésicos que se administren oralmente.
4. Abrir las ampollas producidas por la quemadura, esto genera una vía de entrada para agentes infecciosos.
5. Despegar cualquier elemento que se haya pegado a la piel (ej. ropa, joyas, zapatos, lentes) o
6. Dejar solo al paciente. En caso requerir desplazamiento para pedir ayuda, llevaremos al paciente con nosotros, haciendo una evaluación de si sus lesiones lo permiten.
7. Tardar en pedir transportación.

Síntomas y signos de una quemadura químicos en ojos

El daño generado por químicos depende del tipo de sustancia, cantidad, tiempo de exposición y susceptibilidad de la persona. Por lo que se recomienda saber el riesgo potencial de los químicos utilizados en la AE.

Los síntomas más comunes son:

- a) Pupila dilatada
- b) Visión borrosa o pérdida total la vista.
- c) Dolor en el ojo al mirar la luz
- d) Ojo lloroso o rojo
- e) Párpado hinchado o tics
- f) Cortes, ampollas en el ojo

Manejo de quemaduras por químicos en los ojos

Enjuague el ojo inmediatamente. El AE cuenta con una llave de agua que permite su manipulación para lavar los ojos.

1. Enjuague el ojo con agua en movimiento (corriente constante) durante un periodo mínimo de **30 minutos**. **Nunca** utilizar otras sustancias para enjuagar el (los) ojo (s). Mueva los ojos hacia diferentes direcciones para asegurar que la mayor parte del globo ocular se enjuague.

2. Despojarse de la bata de laboratorio o de ropa que pueda contener químicos. En caso de utilizar lentes de contacto **No** removerlos del ojo.
3. Intentar continuar el enjuague hasta llegar al hospital o centro médico más cercano, así como llevar el envase de la sustancia para mostrarlo al médico. De no ser posible **(porque el** químico pueda quemarlo nuevamente) tome una fotografía con celular o algún dispositivo móvil.

Protocolos de bioseguridad para la contención de enfermedades en anfibios y peces para experimentación

Este manual representa uno de los productos generados proyecto CONACyT-
Convocatoria I0027-2015-01; Número de Proyecto 264235