

Primera incursión en la obtención de curieles libre de patógenos específicos en Cuba

First foray into the production of specific pathogen-free guinea pigs in Cuba

Bárbara O González Navarro^{*}, *Cándida Forte Miranda*^{**}, *Ramón Alonso Rojas*[†],
Antonio Alfonso Montero^{***}, *Liliana Francis Turner*^{****}, *María Elena Arteaga Pérez*^{*****},
Layna Riera Ojeda^{*****}

Resumen

Resultados confiables y económicos solo son obtenidos cuando los animales de experimentación son aislados de factores ambientales y biológicos, implantándose en el biomodelo una microbiota normal, lejos de la presencia de microorganismos patógenos. El objetivo de la investigación fue obtener curieles libre de patógenos específicos por cesárea aséptica, mantenidos en aisladores y alimentados con dietas estériles. Se realizaron 26 histerectomías. Los animales fueron alimentados con una fórmula modificada (L-477) en forma de papilla hasta los 21 días y permanentemente después la C-484 sólida y granulada, esterilizadas a 121°C/20 minutos o a 1,5Mrad. Además fueron suplementados con vitamina C y B1. El forraje o heno fue consumido a partir de la primera generación. La microbiota gastrointestinal se administró por vía oral en 0,5 ml de una dilución de 10⁻⁶/g de contenido de la porción final del íleon, ciego y principio del colon de curieles, a las 24 y 48 horas del nacimiento. Se utilizó para el monitoreo microbiológico caldo Tioglicolato, caldo Triptona Soya y caldo Saboraud incubados aeróbicamente a temperatura de 55, 37 y 25°C respectivamente. Se obtuvieron 51 neonatos. La mortalidad más alta se registró entre los primeros 10 días de edad (58,8%). Se lograron 12 animales (3 machos y 9 hembras), 6 de las hembras se reprodujeron aproximadamente a los 9 meses de edad, lográndose 11 crías por parto normal. La metodología aplicada permitió obtener curieles libres de *Salmonella* sp, *Pasteurella* sp, *Streptococcus* del tipo A y C, *Bordetella bronchiseptica*, *Toxoplasma gondii*, Virus Sendai y parásitos internos y externos.

Palabras clave: curieles, libre de patógenos específicos, aisladores, histerectomía y dietas estériles.

Abstract

Confidence and economics results are only obtained when the animals are isolated of the environmental and biological factors, that could interfere the course of from investigation and when is being established in them, a normal microflora balanced far from the presence of pathogen microorganisms. They were accomplished 26 hysterectomies. The animals were fed with a modified formula of L-477 in the form of porridge until 21 days of age and permanently after with the C-484 solid and granulated, sterilized at 121°C/20 minutes or 1,5Mrad. The forage or hay was consumed by the first generation since the 6 months of age. The gastrointestinal flora was administered by oral route with 0,5 ml of a dilution of 10⁻⁶/g of the contents of the ileum final portion, cecum and first part of the colon of conventionalized Dunkin Hartley guinea pigs, at 24 and 48 hours born. It was used for microbiological bacteria monitoring Thioglycolate broth, Tryptic Soy broth and Sabouraud broth incubated aerobically at temperatures of 55, 37 and 25°C respectively. There were obtained 51 newborns. The highest

^{*} PhD. Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. CENPALAB. Calle 3ra N° 40759 entre 6ta y Carretera Tirabeque, Reparto La Unión, Boyeros, La Habana. Cuba. barbara.gonzalez@cenpalab.inf.cu

^{**} MSc. CENPALAB. candida.forte@cenpalab.inf.cu

[†] MV. CENPALAB. Fallecido

^{***} MV. CENPALAB. antonio.alfonso@cenpalab.inf.cu

^{****} PhD. Universidad de Tolima, Ibagué, Tolima, Colombia. lily_colcuba@gmail.com

^{*****} MSc. CENPALAB. melena@cenpalab.inf.cu

^{*****} PhD. CENPALAB. layna.riera@cenpalab.inf.cu

mortality was registered during the first 10 days of age (58,8%). There were archived 12 animals: 9 female and 3 males. 6 of the female were reproduced approximately at 9 months of age and were archived 11 normal delivery sucklings. There were obtained guinea pigs free of the followings specific pathogens: *Salmonella* sp., *Pasteurella* sp., Streptococcus of the group A y *C. Bordetella bronchiseptica*, *Toxoplasma gondii*, Sendai Virus, beside internal and external parasites.

Key words: guinea pigs, specific pathogen free, isolators, hysterectomy and sterile diets.

Recibido: agosto 5 de 2013

Aprobado: abril 25 de 2014

Introducción

El primer animal mantenido en condiciones Libres de Gérmenes (GF) fue el curiel, obtenido por Nuttall y Thierfelder (1895, 1896 y 1897) empleando el método de hysterectomía aséptica. Los animales sobrevivieron durante 13 días aproximadamente en una campana de cristal preparada para tales efectos (Wagner y Foster 1976).

Esta especie al nacimiento presenta un buen desarrollo corporal, sus ojos y el canal auditivo están abiertos, el cuerpo cubierto de pelos, a las pocas horas corretea por las jaulas y es capaz de ingerir los alimentos que se les suministran a sus padres. Puede alimentarse con dietas semisólidas y sólidas, no necesitando de fórmulas de leche artificial, estas características hicieron posible que el curiel llegara al reino de la Gnotobiología como la primera especie (Wagner y Foster 1976).

El uso de animales convencionales muchas veces causan costosas pérdidas económicas y consumen tiempo en la repetición de los experimentos al portar organismos patógenos potenciales, los cuales causan manifestaciones clínicas de enfermedad cuando son sujetos a procedimientos de investigación (Festing 2010).

El interés de producir animales libre de patógenos específicos (SPF) en la década de 1980 se hizo una necesidad aparejada al desarrollo científico técnico de las investigaciones biomédicas que ya daba sus primeros pasos en la producción de vacunas y productos biotecnológicos, aportando resultados confiables y reproducibles al país. Entonces se funda el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), encargado de investigar, producir y comercializar todo lo referente a esta ciencia. Como tal participa en el desarrollo de la biotecnología en los subprogramas de bioplaguicidas, en el impulso y aplicación de los anticuerpos monoclonales de uso humano (Martínez 2008).

En 1984 se iniciaron las primeras investigaciones en condiciones gnotobióticas. Las primeras especies en las que se incursionó en orden cronológico fueron: curieles, ratones, ratas, conejos y aves mantenidas en aisladores flexibles y rígidos, además en macroaisladores con escafandra que fueron de producción nacional (Molinete *et al.*, 1988; Francis *et al.*, 2001; Forte *et al.*, 2001).

El presente trabajo tiene como objetivo describir las técnicas gnotobióticas empleadas por primera vez en

Cuba para la obtención de curieles libre de patógenos específicos a través de cesárea aséptica, mantenidos en aisladores y alimentados con dieta artificial estéril.

Materiales y métodos

Procedencia, ética y bienestar animal

Los curieles de la línea Dunkin Hartley no consanguínea utilizados en esta investigación procedieron del CENPALAB. Los animales se alojaron y alimentaron en las instalaciones de ensayo pertenecientes a la Dirección de Animales Gnotobióticos según lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso y Reproducción de los Animales de Laboratorio y los Procedimientos Operacionales de Trabajo. A su vez el protocolo de investigación fue inspeccionado y aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de dicha institución teniendo en consideración la protección del bienestar animal, el control del estrés, el dolor y el punto final humanitario.

Técnica de hysterectomía y mantenimiento de los neonatos obtenidos por cesárea

Veintiséis madres preñadas fueron hysterectomizadas al determinar por palpación la separación aproximada de 16 mm o más de los huesos del pubis necesaria para la expulsión (Phillips *et al.*, 1959).

A las parturientas se les infiltró clorhidrato de lidocaína al 0,7 % desde la base del esternón hasta el borde anterior del pubis y a ambos lados de la línea media, donde se realizó una incisión amplia para exteriorizar el útero, ligando este por delante del cuello uterino y por los extremos de los dos cuernos y una vez extirpado el útero, fue sumergido en una solución al 2 % de yodo activo por 10 segundos y se pasó al interior del aislador a través de la trampa germicida que contenía Cloramina T al 4 % a una temperatura de 37 °C. Los neonatos fueron liberados de las membranas fetales procediéndose a cortar el cordón umbilical dejando un remanente de un centímetro aproximadamente. Los animales secados y reanimados se colocaron en cajas frente a lámparas infrarrojas a una temperatura que oscilaba entre 25 y 27 °C dentro del aislador, evitando la humedad de sus lechos. Desde que se ligaron los extremos del órgano grávido hasta que los animales se reanimaron, el tiempo no excedió de los 2,5 minutos (Phillips *et al.*, 1959; Landy *et al.*, 1960).

Las hembras histerectomizadas no sobrevivieron, la eutanasia fue practicada inmediatamente después de extraído el útero grávido administrándole CO₂ a una concentración 70 % por vía inhalatoria.

Alojamiento, limpieza y esterilización de los aisladores

Los aisladores utilizados fueron fabricados por *la Calhène* (Francia), modelo LCI-RI-3, con folia flexible compuesta por cloruro de polivinilo (PVC) de tamaño estándar (volumen interior de 0.73 m³) de presión positiva y esterilizados por ácido peracético al 2 % conteniendo 0,1 % de detergente con alkyl aryl sulfonato como principio activo.

Los aisladores contaban con filtros de alta eficiencia, mangas con guantes de neopreno y dos sistemas de transferencia rápida con doble puerta para ser utilizados como aislador de transporte y/o transferencia. El aislador de cría presentaba un sistema de transferencia de doble puerta y otra puerta cerrada con una capota de PVC (figura 1).

Dietas, régimen de alimentación y esterilización de las dietas

La dieta aplicada responde a una fórmula modificada (tabla 1) a partir de la L-477 en forma de papilla y por la C-484 sólida granulada (tablas 2 y 3) (Phillips *et al.*, 1959; Dieters *et al.*, 1976). La suplementación de Vitamina C y B1 así como el régimen de alimentación fueron transferidos de las experiencias de otros trabajos (tabla 4) y la cantidad de agua por 100 gramos de dieta seca varió acorde a la edad del animal (Phillips *et al.*, 1959; Dieters *et al.*, 1976).

El alimento (L-477 modificada) semisólido en forma de papilla se le ofreció a los animales a partir de las dos horas de nacidos, dos veces al día, a razón de 10 g/animal/día, fortificado con suplemento vitamínico en placas petri. En el momento de elaborar la papilla se adicionó 1 ml de suplemento vitamínico/animal. Al tercer día se fue eliminando el contenido de agua de la papilla y al séptimo día se les colocó en la jaula una pequeña cantidad de dieta sólida granulada (C-484). A partir de los 10 días, la dieta semisólida se limitó a una vez por día, reduciéndose gradualmente a expensas de un aumento en el consumo de la dieta granulada, y a los 21 días solo consumieron alimento sólido, agua a voluntad y el suplemento vitamínico a razón de 1 ml/animal/día. En ocasiones fue necesario enseñar a los animales a consumir la papilla de forma tal que reconocieran el alimento ofrecido.

Se prepararon tres formulaciones de suplemento vitamínico de acuerdo a las variaciones en los requerimientos de la especie durante los primeros 21 días de vida (tabla 4).

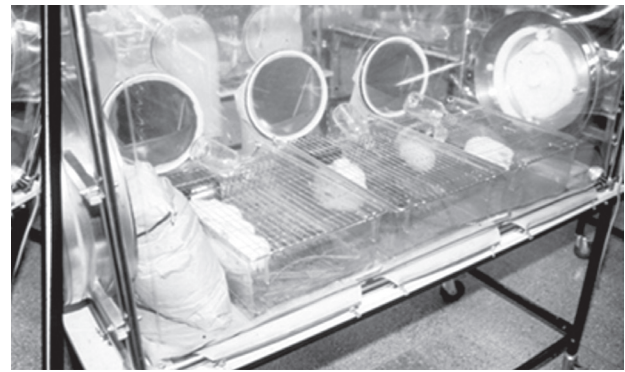


Figura 1. Curieles Dukin-Hartley SPF en aisladores con folia flexible de PVC.

Tabla 1. Fórmula de la papilla L-477 modificada.

Ingredientes	Cantidad (g)
Fórmula peletizada	100
Avena molida	100
Glucosa D (+) anhidra	10
Levadura Torula	15
Cloruro de Sodio	5
Agua	1000

Tabla 2. Fórmula peletizada C-484.

Materias primas	% de Inclusión
Trigo	30
Maíz	13
Avena	10
Soya	18
Alfalfa deshidratada	18,65
Aceite de girasol	2,0
Harina de pescado	2,0
CaCO ₃	1,1
CaHPO ₄	0,4
Mg(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ ·4H ₂ O	0,95
CH ₃ COOK	0,9
Pre-mezcla minero-vitamínica	3,0

La dieta comenzó a esterilizarse por autoclave (Sakura, Japón) utilizando vacío a una temperatura de 121 °C/20 minutos, solamente los primeros 80 días del experimento. La suplementación con forraje o heno se experimentó con la primera generación a los 6 meses de edad, esta se sometió a vapor húmedo a igual temperatura pero por 30 minutos. La segunda generación lo recibió desde el nacimiento.

Tabla 3. Valor nutricional de la fórmula C-484.

Parámetros bromatológicos	%
Materia seca	90
Humedad	10
Proteína bruta	18,10
Fibra bruta	8,29
Grasa bruta	3,19
Energía metabolizable	2,40 Kcal/g
Ca	1,0
P	0,48

Las bolsas de alimento (C-484) se empaquetaron herméticamente con tres sacos de polietileno y se irradiaron con ⁶⁰Co a una dosis de 1,5Mrad. El agua fue esterilizada por vapor húmedo a 121 °C/1h. La gasa, el encamado, las cajas de policarbonato con piso de rejilla, el equipamiento quirúrgico y los utensilios de cristal se pasaron a través de un cilindro metálico al aislador, después de ser sometidos a una temperatura de 121 °C/30 minutos en la autoclave.

Implantación de la microbiota gastrointestinal

La microbiota gastrointestinal se le administró por vía oral a los neonatos obtenidos por cesárea aséptica directamente en el estómago, usando una cánula rígida a las 24 y 48 horas del nacimiento. El ampulla contenía 0,5ml de una dilución en agua destilada de 10⁶/g de contenido de la porción final del íleon, ciego y principio del colon de curieles Dunkin-Hartley convencionalizados, monitoreados contra patógenos específicos.

Control microbiológico, necropsia y procesamiento histológico

Se monitoreó la esterilidad de los aisladores, el alimento, el agua, la placenta de cada animal reanimado, muestras de heces fecales frescas y los fómites. Se utilizó caldo Tioglicolato, caldo Triptona Soya y caldo Saboraud incubándose aeróbicamente a temperatura de 55, 37 y 25 °C respectivamente. La necropsia de los animales recientemente muertos o moribundos se realizó en condiciones asépticas y se controlaron microbiológicamente sus heces, fragmentos de intestino, tráquea, pulmones y algún otro órgano con lesiones. Los segmentos del tracto gastrointestinal y los pulmo-

nes fueron fijados en formol neutro al 10 % y después embebidos en parafina, cortados a 4μ y teñidos por hematoxilina y eosina. Los ciegos fueron pesados llenos empleando una balanza (Sartorius, Japón).

Los animales fueron muestreados para patógenos específicos como, *Salmonella* sp., *Pasteurellas* sp., *Streptococcus del grupo A y C*, *Bordetella bronchiseptica*, *Toxoplasma gondii*, Virus Sendai, y parásitos internos y externos de acuerdo a lo planteado por Riera (2008) con el propósito de establecer las categorías microbiológicas de salud en los animales de laboratorio clasificadas en Libres de Gérmenes Patógenos Específicos (SPF) y convencionales.

Resultados

Se realizaron 26 histerectomías, cinco de ellas fueron extraídas del aislador por contener en el útero más de tres crías que no respiraron espontáneamente, obteniéndose 51 neonatos. La mortalidad más alta se registró entre los primeros 10 días de edad (58,8 %). Se lograron 12 animales adultos: nueve hembras y tres machos; de las hembras solo seis se reprodujeron aproximadamente a los nueve meses de edad.

De los 30 animales muertos durante los 10 primeros días de vida, el 83,3 % de ellos oscilaban entre los 45 y 65 g de peso al nacimiento, 6 animales murieron en las primeras 24 horas de vida con los pesos más bajos y el resto entre los 2 y 10 días de edad. Estos animales se mostraron anoréxicos, somnolientos, con pelo hirsuto y sucio, mientras se mantenían lo más cerca posible de la fuente de calor, desarrollaron un proceso diséptico progresivo y muerte dentro de las 24 horas siguientes. Se detectaron trastornos nerviosos (convulsiones, tortícolis, movimientos desordenados de la cabeza y vueltas en círculo) a los cuales no sobrevivieron.

Los animales obtenidos por cesárea manifestaron en alguna oportunidad, enteritis leve con cambios poco sustanciales en la textura de sus heces, enteritis severas con deshidratación, pérdidas de peso, hasta diarreas con estrías sanguinolentas. Las necropsias mostraron neumonías causadas por bronco aspiración y neumonías donde se aisló *Staphylococcus aureus* no hemolítico, así como enteritis, colitis y tiflitis con aparición de francos procesos diarreicos sin aislamiento.

A medida que se introducía la dieta sólida, C-484, se detectaron distensiones cecales que conllevaron a la aparición de prolapsos rectales, así como cuatro obstrucciones intestinales y una de ellas concomitan-

Tabla 4. Suplementos vitamínicos.

Ingredientes	1 ^{ra} Semana de vida	2 ^{da} Semana de vida	3 ^{ra} Semana de vida
Ácido ascórbico (mg)	12,5	16,5	20
Tiamina (g)	0,05	0,05	0,05
H ₂ O destilada (ml)	100	100	100

do con queratoconjuntivitis. Esta patología ocular no pudo ser enmarcada en ningún período específico y fueron diagnosticados ocho casos. Al analizar las secreciones oculares se aislaron *Pseudomonas* sp. y *Staphylococcus aureus* no hemolítico.

En algunos curieles jóvenes adultos se observó deformaciones de las extremidades posteriores o anteriores, tortícolis, pelaje no uniforme, bajo peso corporal, trastornos gastrointestinales con heces blandas hasta francas diarreas con prolapso rectal. De estos, los que no murieron, fueron apareados. Los que murieron, padecieron deshidratación y pérdida de peso extrema a consecuencia de una disminución del consumo de alimento y una ingestión exagerada de agua que conllevó a la distensión cecal con paredes muy finas, que mostraron acortamiento de las vellosidades, degeneración del epitelio de absorción e infiltrado inflamatorio escaso a predominio de neutrófilos, junto a un contenido muy líquido de coloración normal. Cuando comenzamos a irradiar las dietas el aspecto físico de los animales fue mejorando sustancialmente y el período de vida se fue alargando. Además se redujo el tamaño cecal en machos de 45 % a 13 % y en hembras de 31 % a 15 % con relación al peso corporal.

Tres animales sufrieron fracturas completas de los huesos de una o dos de sus extremidades al accidentarse con el piso de rejilla de la caja.

Con los 12 animales obtenidos por cesárea aséptica se conformaron dentro del aislador de cría dos grupos de cuatro hembras por un macho, seis se gestaron, dos abortaron y otra murió a causa de parto distócico. De la primera gestación nacieron cinco crías, todas hembras. Las hembras que abortaron lograron seis crías en el segundo parto, tres hembras y tres machos. Es decir, nacieron por parto natural en condiciones controladas un total de 11 animales, ocho hembras y tres machos.

Los 11 animales nacidos por parto natural y lactados por sus madres tuvieron un comportamiento muy superior a los animales obtenidos por histerectomía. La ganancia en peso y la talla alcanzada fue superada, el pelaje fue uniforme, limpio, brillante y no practicaron la tricofagia. No se observaron deformidades de las extremidades, procesos disneicos, digestivos ni nerviosos.

En los controles microbiológicos se aislaron intermitentemente *Staphylococcus aureus* no hemolítico, Bacilos esporulantes y *Pseudomonas* sp. y no se reportaron hongos ni parásitos.

Se lograron curieles obtenidos por cesárea aséptica, mantenidos en aisladores con dietas estériles, capaces de reproducirse por primera vez en el país, libres de patógenos específicos: *Salmonella* sp., *Pasteurellas* sp., *Streptococcus* del grupo A y C, *Bordetella bronchiseptica*, *Toxoplasma gondii*, *Virus Sendai*, y parásitos internos y externos.

Discusión

Indudablemente el período más peligroso de la vida es el neonatal. En ninguna otra ocasión se enfrentará el individuo a desafíos más impresionantes que la transición de la existencia intrauterina dependiente, a la vida post natal independiente. Si este tránsito ocurre utilizando el método de la cesárea, el individuo estará expuesto a un estrés superior y a mayores riesgos (Shofield y Cotran 2007). El período desde la aplicación de la anestesia hasta la reanimación de los curieles (neonatos) se consideró un punto crítico si se compara con la prolongada sobrevivencia en las ratas según Francis *et al.* (2001) y los conejos citado por Forte *et al.* (2001) después de la dislocación cervical de las madres histerectomizadas, por eso se le prestó mucho interés al tiempo que no excediera de 2,5 minutos, desde la ligadura del útero grávido hasta su reanimación (Landy *et al.*, 1960).

La alta letalidad en los diez primeros días de vida pudo deberse a la incorrecta selección de animales, considerados prematuros por otros autores, que arrojaron índices superiores de sobrevivencia al emplear neonatos de 70 g o más (Dieters *et al.*, 1976).

Los microorganismos oportunistas aislados, los relacionamos con defectos en la implantación de la microbiota gastrointestinal. Otras investigaciones demostraron que el desbalance de la microbiota cecal en curieles obtenidos por histerectomía y mantenidos en barrera causó alta mortalidad, infecciones por microorganismos oportunistas, prevaleciendo los trastornos entéricos con cambios histológicos semejantes a los descritos en nuestros resultados, además de neumonías, otitis media y reducción del peso corporal e indicaron que los problemas pudieron deberse a una pobre o inadecuada composición de la microbiota intestinal, constituida mayormente en los curieles por organismos bacteroidaceae y peptocococeae (Yanabe *et al.*, 2001). Estudios en conejos indicaron que la inoculación de una microbiota completa autóctona es un método apropiado para convertir un animal GF a su estado normal. La microbiota completa autóctona ayuda al establecimiento de la resistencia de especies patógenas y patógenas oportunistas, además manifestó ser esencial para la salud y la sobrevivencia de los animales obtenidos por histerectomía (Yanabe *et al.*, 1999).

Los desajustes dietéticos conjuntamente con una mala implantación de la microbiota gastrointestinal influyeron en la salud de los curieles obtenidos por cesárea y aunque no fue demostrado, la microbiota implantada se multiplicó, los microorganismos ocuparon su nicho correspondiente y el heno o hierba estéril los proveyó de algún factor fundamental del crecimiento y de un sustrato adecuado para la proliferación bacteriana, inferido por la mejoría de su apariencia clínica.

Otros autores dieron a conocer los desajustes en la dieta sobre la composición de la microbiota y plantearon que la utilización competitiva de escasos nu-

trientes por los microorganismos autóctonos y sus hospederos pueden repercutir sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos del animal, llegando a complicar la estimación cuantitativa de los requerimientos dietéticos (Gordon y Pesti 1971). Estas valoraciones nos ayudaron a comprender el comportamiento superior de los animales amamantados por sus madres.

La dieta es un factor fundamental y de gran importancia para la investigación gnotobiótica. No solo el cambio cualitativo de las dietas influye sobre el fisiologismo animal, simplemente el modo de esterilización y la forma de presentación inducen a grandes variaciones fisiológicas (Rote y Blaut 2013). Nosotros comprobamos la influencia de estos cambios cuando se comenzó a irradiar las dietas y con la aparición de trastornos gastrointestinales a medida que se sustituía la dieta de forma escalonada de semisólida a sólida peletizada. Desde el punto de vista de la estabilidad de los nutrientes, Coates (1984) demostró que la irradiación es el método de preferencia para la esterilización de las dietas por ser menos destructivos sus efectos sobre las proteínas y aminoácidos en dosis tan altas como la de 10Mrad.

Muchos son los factores que influyen en el establecimiento de la microbiota gastrointestinal (Wagner 2008; Fava y Danese 2011). Se llegará a la "Normalización" si se reúnen una gran variedad de microorganismos y factores como la composición de la dieta, la reducción del tamaño cecal y la estructura histológica del sistema gastrointestinal en los animales gnotobióticos (Tlaskalová-Hogenová et al., 2011). Y, el establecimiento de la microbiota gastrointestinal será semejante al del animal convencional según Gordon y Pesti (1971), solo cuando sean coleccionadas grandes cantidades de microorganismos de heces y de contenido intestinal de un animal convencional sano, sin la intervención de medios de cultivos.

Conclusiones

La metodología aplicada permitió obtener curieles criados en aisladores, derivados por histerectomía aséptica y alimentados con dietas estériles, con un comportamiento estable y superior en la segunda generación que mostró ser fértil, resultado de la interacción entre los factores hospederos-microbiota-dieta. La especialización del personal y la experiencia acumulada nos prepararon para incursionar en otras especies como ratas, ratones, aves, conejos, ovinos y perros. Los animales asociados con una microbiota gastrointestinal autóctona fueron libres para todos los patógenos muestreados.

Referencias bibliográficas

Coates ME. 1984. Diets for Germ-Free animals Part 1. Sterilization of diets. In *The Germ-Free animal in biomedical research. Laboratory Animal Handbooks* 9. Chap 3. Edited by ME. Coates and BE. Gustafsson, London, p 85-90.

Dieters K, Renner S, Kruger E and Appel KR. 1976. Some data on establishing a SPF guinea pig colony. *Lab. Anim. Science.* 26:288.

Fava F and Danese S. 2011. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol.* 17(5):557-66.

Festing MFW. 2010. The desing of animal experiments. In *The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals.* Chap 3. 7th Edition, p 23-36.

Forte MC, Francis TL, González NB, Arteaga PME, Alonso MA. 2001. Obtención y mantenimiento de conejos libres de patógenos específicos en Cuba. *Rev. Animales de Experimentación. La Revista Hispanoamericana.* 6(1):17-19.

Francis TL, Forte MC, Alonso MA, González NB, Arteaga PME. Remigio CA. 2001. Primeras partidas de ratas gnotobióticas en Cuba. *Rev. Animales de Experimentación. La Revista Hispanoamericana.* 6(1):5-6.

Gordon HA and Pesti L. 1971. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relations helps. *Bacteriological Reviews.* 35(4):390-429.

Landy JJ, Yerasimides TG, Growdon JH and Bausor SC. 1960. Germfree guinea pig delively by hysterectomy. *Surg. Forum.* 11:425-426.

Martínez PS. 2008. Revolución cubana: hechos más que palabras. En *Un país de hombres y mujeres de ciencia.* Editorial José Martí. Ciudad de La Habana. Cuba, p 77.

Molinete MC, Forte C, Fernández J, Francis L y Ferrera S. 1988. Aplicación de la gnotobiosis en aves de la raza White Leghon. *Revista Cubana de Ciencias Avícola.* 15(1):1-14.

Nuttall GHF and Thierfelder H. 1895. Thierisches Leben ohne Bakterien in Verdauungskanal. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 21:109-121.

Nuttall GHF and Thierfelder H. 1896. Thierisches Leben ohne Bakterien in Verdauungskanal. II. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 22:62-73.

Nuttall GHF and Thierfelder H. 1897. Thierisches Leben ohne Bakterien in Verdauungskanal. III. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 23:231-235.

Phillips BP, Wolfe PA. and Gordon HA. 1959. Studies on rearing the guinea pigs germ-free. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 78:183-207.

Riera L, Lugo S, Sosa I, Entrena A, Acevedo MC, Tabares T, Llanes H, Fernández N, Joglar I, Otaño A, Zamora Z, Negrín N, González A, Rodríguez K, Muñoz E, Crespo E, Peña M, Chala T. 2008. Programas de aseguramiento de la Calidad en la producción de animales de laboratorio. *Rev. Salud Animal.* 30(1):12-16.

Rothe M and Blaut M. 2013. Evolution of the gut microbiota and the influence of diet. *Benef Microbes.* 4(1):31-37.

Shofield D y Cotran RS. 2007. Enfermedades durante la lactancia y la niñez. En *Robbins, Patología estructural y funcional.* Cap 11. 6th Edición. Editora Mc Graw-Hill. Interamericana, p 486-518.

Tlaskalová-Hogenová H, Stěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L, Rossmann P, Hrnčář T, Kverka M, Zákostelská Z, Klimešová K, Pribylová J, Bártová J, Sanchez D, Fundová P, Borovská D, Srůtková D, Zidek Z, Schwarzer M, Drastich P, Funda DP. 2011. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol.* 8(2):110-120.

Wagner JE and Foster HL. 1976. The biology of the guinea pig. Chapter 4. Ed. Joseph ER. Wagner and Patrick J. Manning, Academic Press, New York, p 21-30.

Wagner RD. 2008. Effects of microbiota on GI health: gnotobiotic research. *Adv Exp Med Biol.* 635:41-56.

Yanabe M, Shibuya M, Gonda T, Asai H, Tanaka T, Narita T, Sudou K, Matsui T, Itoh K. 1999. Production of ex-germfree rabbits for establishment of specific pathogen-free colonies. *Exp. Anim.* 48(2):79-86.

Yanabe M, Shibuya M, Gonda T, Asai H, Tanaka T, Sudou K, Narita T, Matsui T, Itoh K. 2001. Establishment of specific pathogen-free guinea pig colonies using limited flora guinea-pig associated with conventional guinea-pig flora, and monitoring of their cecal flora. *Exp Anim.* 50(2):105-113.