

## PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA ENCEFALOMIELITIS MURINA DE THEILER EN COLONIAS DE RATONES DE ARGENTINA

Laborde JM<sup>1</sup>, Cagliada MdEP<sup>1</sup>, Ayala MA<sup>1</sup>, Carriquiriborde M<sup>1</sup>, Milocco SN<sup>1</sup>, Bonzo E<sup>2</sup>, Cid de la Paz V<sup>3,4</sup>, Galosi CM<sup>3,4</sup>, Carbone C<sup>1</sup>

Cátedras de <sup>1</sup>Animales de Laboratorio y Bioterio, <sup>2</sup> Epidemiología y <sup>3</sup>Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

<sup>4</sup>Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

**RESUMEN:** *En el presente estudio se analizó la prevalencia de anticuerpos contra el virus de la encefalomyelitis de Theiler en colonias de ratones de Argentina. En el primer ensayo se analizaron 352 sueros por ELISA indirecto (iELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). La prevalencia establecida fue del 73 y 67 %, respectivamente, siendo los valores de sensibilidad, especificidad y kappa de 100%, 76,2% y 0,8 respectivamente. En un segundo análisis realizado únicamente por iELISA, en 558 sueros provenientes de 53 colonias, se obtuvo una seroprevalencia de 72.6%, entre valores de 0% hasta 100% .La prevalencia más elevada se observó en bioterios sin barreras sanitarias. Las infecciones del virus Theiler en colonias de ratones puede interferir con los resultados experimentales; esto se relaciona con una infraestructura deficiente, falta de entrenamiento del personal y un manejo inadecuado de la colonia.*

**Palabras clave:** Argentina, prevalencia, virus de la encefalomyelitis de Theiler.

## PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST THEILER MURINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS IN MICE COLONIES OF ARGENTINA

**ABSTRACT:** *This study analyzes the prevalence to antibodies of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) in mice colonies of Argentina. A first study performed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA) and indirect fluorescent antibody test (IFI) on 352 sera determined a prevalence of antibodies of 73% and 67% respectively with sensitivity of 100% and 76,2% respectively and 0,8 of kappa value. In a second assay performed only by iELISA on 558 sera from 53 colonies a seroprevalence of 72,6% varying between 0% to 100% was obtained. The higher values were found in those animal facilities without barrier systems. Theiler virus infections in mouse colonies could interfere with experimental results; this may be due to a lack of barriers, and poor staff training and colony management in the facility.*

**Key words:** Argentina, Prevalence, Theiler encephalomyelitis virus.

Fecha de recepción: 16/08/10

Fecha de aprobación: 10/03/11

**Dirección para correspondencia:** Lic. Juan M Laborde, Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio, Universidad Nacional de La Plata. CC 296, CP 1900 La Plata. Tel. / Fax: +54-221-421-1276.

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

## INTRODUCCIÓN

La presencia de agentes infecciosos en colonias de animales de laboratorio representa un serio problema en la investigación biomédica. La mayoría de los microorganismos patógenos en general causan infecciones subclínicas o asintomáticas y eventualmente pueden provocar signos clínicos. La interferencia que causan estos agentes se debe a que producen alteraciones en los parámetros fisiológicos que se comportan como variables significativas en los resultados experimentales (1, 2, 3, 4).

Uno de los virus murinos que afectan a los animales de laboratorio, es el virus de la Encefalomielitis Murina de Theiler (TMEV) que pertenece al género *Cardiovirus* de la familia *Picornaviridae* (5). Infecta naturalmente a ratones y ratas, a diferencia de los hámsters que pueden ser infectados solo experimentalmente. El TMEV produce infecciones asintomáticas en el tracto intestinal y puede llegar al sistema nervioso central (SNC) causando poliomielitis y menos frecuentemente encefalitis (6, 7), luego de la inoculación intracerebral en ratones. El TMEV se clasificó en dos grupos de acuerdo con su actividad biológica. El primer grupo está integrado por dos cepas altamente virulentas (GDVII y FA), las cuales inducen una encefalitis aguda y fatal. El segundo grupo está formado por las cepas originales (TO, WW, DA y BeAn) que son menos virulentas y causan lesiones en el SNC y poliomielitis seguida de inflamación crónica desmielinizante debido a la persistencia viral (8, 9). Su distribución es mundial con niveles de prevalencia variables que pueden llegar hasta el 70 % (10).

La desmielinización producida por el TMEV presenta parámetros inmunes e histopatológicos similares a aquellos que produce la esclerosis inflamatoria múltiple (MS) por lo que la infección experimental por TMEV se utiliza como modelo para el estudio de esta enfermedad (7, 11).

Las dos técnicas serológicas utilizadas corrientemente para el diagnóstico de TMEV son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el enzimo- inmunoensayo (ELISA). La IFI es el test de elección para ser utilizado en un pequeño número de muestras. El ELISA es reconocido actualmente como una excelente alternativa por su mayor sensibilidad (S) y especificidad (E) y por ser una técnica sencilla y fácil de implementar lo cual facilita el análisis de un gran número de muestras (12).

Actualmente existe escasa información sobre las contaminaciones por TMEV en colonias de ratones en nuestro país. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de anticuerpos (Ac) contra este virus en colonias de ratones de experimentación en Argentina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### TECNICA DE ELISA

Se utilizó un ELISA indirecto (iELISA) previamente estandarizado usando un antígeno elaborado a partir de células de riñón de hamsters lactantes (BHK-21) infectadas con la cepa GDVII, suero antiratón conjugado con peroxidada como Ac secundario y azinodietilbenzotiazol-sulfonato (ABTS) y  $H_2O_2$  como sustrato. La reacción fue leída en un lector de ELISA (Titertek Multiskán Flow Laboratory, USA). Se consideraron positivos aquellos sueros que superaron el punto de corte determinado por el valor correspondiente a 2 valores promedio de absorbancia del suero negativo de referencia (13).

### TÉCNICA DE INMUNOFLUORECENCIA

Se desarrolló con células BHK-21 infectadas y fijadas con acetona fría sobre láminas teflonadas. Cada suero problema fue analizado por duplicado en la dilución 1:5 y como Ac secundario se utilizó un suero antiratón conjugado con fluoresceína. La reacción fue leída en un microscopio de fluorescencia (13).

### EXPERIENCIA A

Se analizaron 352 sueros provenientes de ratones de 18 diferentes bioterios convencionales, por las técnicas de iELISA e IFI. Se calcularon los valores de S, E y el valor de kappa (WinEpiscop 2.0). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de comparación de proporciones (Epidat 3.1) utilizando un nivel de confianza de 95 %.

### EXPERIENCIA B

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Experiencia A, en la segunda experiencia se analizaron 558 sueros representativos de 53 colonias de animales de experimentación, solamente por la técnica de iELISA. Los sueros analizados en la experiencia A fueron también incluidos en este segundo análisis. Se determinó el intervalo de confianza ( $IC_{95\%}$ ) mediante el método exacto basado en la Distribución Binomial (Epidat 3.1) y se aplicó la prueba de chi cuadrado (EpiInfo) para observar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre establecimientos con o sin barreras sanitarias.

## RESULTADOS

Del total de sueros analizados en la experiencia A, 238 resultaron positivos y 94 negativos por ambas técnicas. Veinte sueros positivos por iELISA fueron negativos por IFI. No se observaron sueros positivos por IFI y negativos por iELISA. La prevalencia establecida calculada por iELISA e IFI fue del 73 y 67 %, respectivamente. Los valores de S y E fueron de 100 % y 76,2 % respectivamente obteniéndose un valor de kappa de 0,8.

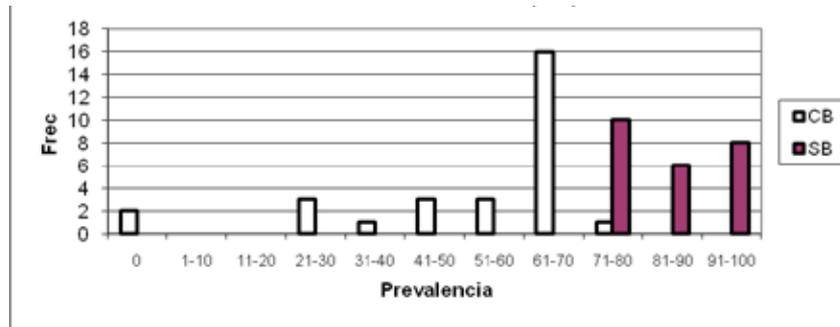


Figura 1. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler en diferentes colonias de ratones convencionales de Argentina con barreras sanitarias (CB) y sin barreras sanitarias (SB)

Del total de 558 sueros analizados en la experiencia B, se obtuvo una seroprevalencia de 72,6 % (405/558), variando entre valores de 0 % hasta 100 %. Se hallaron prevalencias mayores a 70 % en el 100 % en muestras provenientes de bioterios sin barreras sanitarias (SB). En sólo 1 bioterio con barreras sanitarias (CB) se observó una prevalencia mayor de 70 %. Al aplicar la prueba de chi cuadrado se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre ambos grupos.

## DISCUSIÓN

Debido a que con los resultados obtenidos en la experiencia A no se pudo establecer una prevalencia representativa, se incorporaron más muestras de suero al estudio, provenientes de diferentes colonias de ratones en las que se utilizó solamente la prueba de iELISA ya que su S y E habían sido determinadas en trabajos previos (13).

Se determinó que el TMEV se encuentra presente en los bioterios convencionales de Argentina. Se observó que las diferencias entre bioterios CB y SB son significativas, indicando en el primer caso la necesidad de validar la eficiencia de los sistemas de barreras adoptados y en el segundo la instalación de estos sistemas.

La alta prevalencia de este virus se puede asociar o relacionar con una infraestructura deficiente, falta de entrenamiento del personal o con un mal manejo del bioterio ya sea de producción o experimentación (2, 3).

La presencia de este virus en las colonias de animales de experimentación puede estar interfiriendo con investigaciones relacionadas con el SNC en las que se utiliza el ratón como reactivo biológico. Estos resultados indican también que es necesario desarrollar e implementar un método rápido, sensible y específico como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ARN viral en las colonias.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hansen AK. Health status and the effects of microbial organisms on animal experiments. In: Svendsen P, Han J. Handbook of laboratory animal science. Vol.

I: Selection and handling of animals in biomedical research, Boca Ratona, Florida. CRC Press, Inc. 1994; p. 125-153.

2. Gilioli R. Controle virológico em animais de laboratório. In: De Lucca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Merusse JLB, Neves SP. Manual para técnicos em bioterismo. 2ª Edición. Sao Paulo: COBEA-FINEP, 1996; p. 139-148.

3. Rehlinger C. Health monitoring. In: Svendsen P, Han J. Handbook of laboratory animal science. Vol. I: Selection and handling of animals in biomedical research, Boca Ratona, Florida. CRC Press, Inc. 1994; p. 155-167.

4. Descoteaux JP, Grignon-Archambault D, Luisier G. Serologic study on the prevalence of murine viruses in five Canadian mouse colonies. Lab. Anim. Sci. 1977; 27(5): 621-626.

5. Theiler M. Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. J. Exp. Med. 1937; 163: 620-631.

6. Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbits and their effect on research. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11(2): 231-266.

7. Brahic M. Theiler's virus infection of the mouse, or: Of the importance of studying animal models. Virology, 2002; 301: 1-5.

8. Calenoff MA, Faaberg KS, Lipton HL. Genomic regions of neurovirulence and attenuation in Theiler murine encephalomyelitis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1990; 87: 978-982.

9. Miyata H, Sato H. Theiler's murine encephalomyelitis virus: characterization of newly isolated viruses from Japanese mouse colonies. Jikken Dobutsu 1990; 39:539-548.

10. Gilioli R. Avaliação do perfil sanitario de colonias de camundongos e de ratos em bioterios brasileiros: ocorrência de bacterias, parasitas e virus murinos. Tese de Doutorado em Genética e Biología Molecular, Área de Microbiología. Instituto de Biología, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003; 138p.

11. Pachner AR, Libin L, Narayan K. Intrathecal antibody production in an animal model of multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2007; 185: 57-63.

12. Waggle K, Kagiya N, Allen A, Nomura T. Manual of microbiologic monitoring of laboratory animals, 2nd ed. (NIH publication no. 94-2498). U.S. Department

Tabla 1: Prevalencia de anticuerpos contra virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV), determinada por iELISA, en Bioterios (muestras) convencionales de Argentina.

ID muestra	Barreras	n	(+)	(-)	% (+)	IC (95%)	
1	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
2	CB	12	9	3	75%	42,8	94,5
3	SB	10	10	0	100%	69,2	100,0
4	CB	15	8	7	53%	26,6	78,7
5	SB	10	9	1	90%	55,5	99,7
6	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
7	SB	10	10	0	100%	69,2	100,0
8	CB	12	8	4	67%	34,8	90,0
9	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
10	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
11	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
12	SB	10	9	1	90%	55,5	99,7
13	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
14	CB	10	7	7	70%	34,7	93,3
15	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
16	CB	20	13	7	65%	40,7	84,6
17	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
18	CB	10	0	10	0%	0,0	30,8
19	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
20	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
21	SB	10	9	9	90%	55,5	99,7
22	SB	15	12	3	80%	51,9	95,6
23	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
24	SB	10	8	8	80%	44,4	97,4
25	SB	10	9	1	90%	55,5	99,7
26	SB	20	17	3	85%	62	96,7
27	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
28	CB	10	4	6	40%	12,15	73,7
29	SB	10	9	1	90%	55,5	99,7
30	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
31	CB	10	3	7	30%	6,7	65,2
32	CB	10	5	5	50%	18,7	81,2
33	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
34	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
35	CB	12	8	4	67%	34,8	90
36	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
37	CB	10	3	7	30%	6,7	65,2
38	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
39	CB	10	5	5	50%	18,7	81,2
40	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
41	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
42	CB	10	0	10	0%	0,0	30,8
43	CB	10	6	4	60%	26,2	87,4
44	CB	12	8	4	67%	34,8	90
45	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
46	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
47	CB	10	3	7	30%	6,7	65,2
48	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
49	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
50	CB	12	6	6	50%	21,0	78,9
51	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
52	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
53	CB	10	6	4	60%	26,2	87,4
TOTAL		558	405	175	73%	67,5	76,1

Se detallan positivos (+), negativos (-) e intervalo de confianza (IC95%) determinado mediante el método exacto basado en la Distribución Binomial

of Health and Human Services, National Institutes of Health, Bethesda MD. 1994.

13. Laborde JM, Carbone C, Corva SG, Galosi CM. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for routine screening of Theiler encephalomyelitis virus antibodies in mice colonies. J.Vet. Diagn. Invest. 2008; 20 (6): 789-791.