



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUIMICA

**ESTUDIOS DE IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE AGENTES  
CONTAMINANTES VIRALES EN COLONIAS DE CRIA DE RATONES**

ANDREA SOLEDAD MAIZA

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

3 de mayo de 2013

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 2007 y el 2012, bajo la dirección de la Dra. Ana María Ambrosio (Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui) y la Dra. Marta Roque (UNS).

[Firma del Alumno]



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ..../..../..... , mereciendo la calificación de .....(.....)

**A la memoria de mi mamá,**

**A la luz de mi vida: mi hijo,  
Juan Manuel Polidoro Maiza**

Agradecimientos:

A la Dra. Ana María Ambrosio y a la Dra. Marta Roque, ambas directoras de este proyecto.

A la Directora del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui, Dra. Delia Enria y a todos mis compañeros, especialmente a:

ALBANI, CRISTINA	GAZZA, PABLO	RAGGIO, ALEJANDRO
MARGALL, ANA	LANZILLOTA, PABLO	MARZANO, MARIA ESTHER
PASTORE, PATRICIA	BANUERA, RAÚL	MARTINEZ, NAHUEL
BIGLIERI MARCELO	BILOS, PABLO	NINNI, SANDRA
BOTTALE, ALEJANDRO	CIGANDA, MARTIN	VIGORITO, MABEL
CANTORE, MARIA FLORENCIA	FERNANDEZ SUSANA	PAZ, CARINA
CHIARITO, LAURA	FOSSA, SEBASTIAN	MEDINA, MARCOS
FERNANDEZ, MARIA FLORENCIA	BONANNO, DIEGO	MARIANI, MAURICIO
FUSTER, STELLA	JESUS, ERICA	GAMBOA, GRACIELA
IBARRA, NELBA	LAZZARI, GISELE	
GALANTE, MARIANA	LUDUEÑA, SILVINA	
OLIVERA DIEGO	GROSSO, FABIAN	
SAAVEDRA, M DEL C	RIERA, LAURA M C	

A los diferentes laboratorios de FIOCRUZ por su calidez en la recepción y por su capacidad de transmitir los conocimientos.

A todos los miembros de la comisión directiva de ABAC (Asociación Banco Argentino de células)

A la Universidad Nacional del Sur.

A mi papá por su confianza y paciencia, a mi hermana Viviana por su tolerancia, a la tía Bety, a mis primos, a Elena, sin ellos todo sería más difícil.

Gracias a mi hijo "Juanchi"

## RESUMEN

Se conoce ampliamente que la confiabilidad de una colonia de cría de ratones para un determinado experimento puede ser solamente demostrada mediante un comprensivo monitoreo del estado de salud de los animales antes y durante el experimento. En este trabajo se han desarrollado las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y enzimoimmunoensayo (ELISA) para la detección de anticuerpos contra el virus Sendai, virus de la hepatitis murina y el virus diminuto o minuto de ratón en las colonias de cría del ratón, considerados los agentes virales más prevalentes en las colonias SPF de ratones. Se estudió la cinética de replicación para cada virus mediante la cosecha de células y sobrenadantes respectivos, en diferentes días post inoculación (pi). Se obtuvo una Semilla Maestra y una Semilla de Trabajo para el virus Sendai mediante la inoculación del virus en huevos embrionados de pollo. La Semilla de Trabajo sin diluir y en diluciones factor de 10 se utilizó para inmunizar a los ratones con diferentes esquemas de inoculación. Los sueros y líquidos ascíticos presentaron títulos de anticuerpos específicos entre 64 y 256, por la inhibición de hemaglutinación (HAI) y IFI, mientras que los títulos por ELISA estuvieron entre 6400 y 204800, para las mismas muestras. Para el virus MHV la Semilla Maestra y la Semilla de Trabajo se obtuvo por inoculación del virus en monocapas de células L929. Diluciones factor 10 de la cepa viral MHV se utilizó para inmunizar a los ratones con diferentes esquemas de inoculación. Los sueros y líquidos ascíticos presentaron títulos de anticuerpos específicos entre 32 y 2048 por IFI, mientras que los títulos por ELISA estuvieron entre 3200 y 12800 para los sueros y entre 200 y 6400 para los líquidos ascíticos, para las mismas muestras. Para el virus MVM la Semilla Maestra y la Semilla de Trabajo se obtuvo por inoculación del virus en monocapas de células L929. Diluciones factor 10 de la cepa viral MVM y de la ST viral se utilizó para inmunizar a los ratones con diferentes esquemas de inoculación. Los sueros y líquidos ascíticos se presentaron títulos de anticuerpos específicos entre 32 y 128 por inmunofluorescencia indirecta (IFI), mientras que los títulos por ELISA estuvieron entre 1600 y 6400 para los sueros y entre 200 y 800 para los líquidos ascíticos, para las mismas muestras.

El antígeno para la pruebas IFI consistió en células enteras, mientras que para las pruebas de ELISA fue células lisadas por sonicación. Para el virus Sendai ambos antígenos se obtuvieron por inoculación de 0,1 UHA de la ST en células LLCMK<sub>2</sub> y se cosechó el día 7pi. Para el virus MHV se inoculó  $\sim 10^5$  DICT<sub>50</sub> / mL y para el virus MVM  $\sim 10^6$  DICT<sub>50</sub> / mL, en células L929. Las células fueron procesadas el día 5 y 1 pi respectivamente. Nuestros estudios muestran que el desarrollo de las pruebas de IFI y ELISA, (complementadas con la prueba clásica de HAI para el caso del virus Sendai), comprenden una batería de pruebas innovadoras y confiables para la detección de anticuerpos contra los virus de Sendai, MHV y MVM en bioterios. Los resultados presentados revelan que las metodologías desarrolladas en nuestro laboratorio son herramientas eficaces para el control de la contaminación por los agentes virales estudiados en colonias de ratones libres de patógenos específicos. Los estudios presentados podrían considerarse como un punto de partida para el desarrollo de futuros avances en este campo del conocimiento.

Palabras claves: ratones SPF, virus contaminantes de roedores , enzimo inmuno análisis (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI)

## ABSTRACT

It is widely known that the reliability of a mouse breeding colony for a given experiment only can be demonstrated by a comprehensive health monitoring of the animals before and during the experiment. We recommend finding specific antibodies as indicators of virus circulation in the colony. In this work, we developed the techniques of indirect immunofluorescence (IFI) and enzyme immunoassay (ELISA) for the detection of antibodies to Sendai virus, MHV virus and MVM virus in mouse breeding colonies. It was studied the kinetics for each virus replication by harvesting cells and its respective supernatants at different days post inoculation (pi). It was generated both a master sample and a working sample by inoculation of Sendai virus in embryonated chicken eggs. The working sample undiluted and 10-fold serial dilutions were used to immunize mice following different schemes of inoculation. Serum and ascitic fluid samples were collected and showed titers of specific antibodies between 64 and 256, by hemagglutination inhibition (HAI) and IFI, whereas serum and ascitic fluid samples showed titers between 6400 and 204800, by ELISA. The master sample for MHV virus and Working sample was obtained by inoculation of the virus in L929 cell monolayers. The MHV virus 10-fold serial dilutions were used to immunize mice following different schemes of inoculation. Serum and ascitic fluids samples were collected and specific antibody titers between 32 and 2048 by IFI, while ELISA titers were between 3200 and 12800 for the serum and 200 to 6400 for ascitic fluids samples, for the same samples. The master sample for MVM virus and Working sample was obtained by inoculation of the virus in L929 cell monolayers. The working sample and 10-fold serial dilutions of MVM virus were used to immunize mice following different schemes of inoculation. Serum and ascitic fluids samples were collected and specific antibody titers between 32 and 128 by indirect IFI, while ELISA titers were between 1600 and 6400 for serum and 200 to 800 for ascites fluids samples, for same samples. The antigen for IFA tests consisted of whole cells, while for the ELISA was lysed cells by sonication. Sendai virus for both antigens was obtained on day 7pi in LLCMK<sub>2</sub> cells by inoculation of 0.1 UHA of working sample. For MVM virus was inoculated  $\sim 10^6$  DICT<sub>50</sub> / mL and MHV was inoculated  $\sim 10^5$  DICT<sub>50</sub> / mL. They were processed L929 cells and used on day 1 and 5pi respectively. Our results show that the development of

specific IFI and ELISA, (complemented by the classical test of HAI for Sendai virus), comprise a battery of innovative and reliable tests for the detection of antibodies against Sendai virus, MHV virus and MVM virus in laboratory mice. These initial data reveal that both tests might be efficient tools for the monitoring of contamination by these viral agents in colonies of specific pathogen free mice. The studies presented could be considered as a starting point for the development of future advances in this field of knowledge.

Keywords: specific pathogen free mice, rodent virus contamination, enzyme immunoassay (ELISA), immunofluorescence assay (IFI)



# INDICES

**INDICE GENERAL**

<b>1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1 LA NECESIDAD DE LOS MODELOS ANIMALES EN LA EXPERIMENTACIÓN.....</b>	<b>25</b>
ALTERNATIVAS AL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO.....	26
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	27
EL EMPLEO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN EL CONTEXTO MUNDIAL.....	28
<b>1.2 EL RATÓN COMO MODELO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>28</b>
MONITOREO DE PATÓGENOS CONTAMINANTES DE RATONES EN BIOTERIOS.....	30
CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD.....	31
JUSTIFICACIÓN DE LA BÚSQUEDA DE LOS CONTAMINANTES VIRALES: VIRUS SENDAI, VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV) Y VIRUS DIMINUTO O MINUTO DE RATÓN (MVM).....	34
<b>1.3 EL VIRUS SENDAI.....</b>	<b>36</b>
INFECCIÓN y PATOLOGÍA.....	37
RESPUESTA INMUNE.....	39
BÚSQUEDA DE INFECCIÓN POR EL VIRUS SENDAI: ANÁLISIS SEROLÓGICO.....	40
INTERFERENCIA CON LA INVESTIGACIÓN.....	42
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	43
<b>1.4 VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV).....</b>	<b>44</b>
INFECCIÓN y PATOLOGÍA.....	45

RESPUESTA INMUNE.....	47
BÚSQUEDA DE INFECCIÓN POR EL VIRUS MHV: ANÁLISIS SEROLÓGICO.....	48
INTERFERENCIA EN LAS INVESTIGACIONES.....	48
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....	49
<b>1.5 VIRUS MINUTO O DIMINUTO DE RATON (MVM).....</b>	<b>50</b>
INFECCIÓN Y PATOLOGÍA.....	51
RESPUESTA INMUNE .....	53
BÚSQUEDA DE INFECCIÓN POR EL VIRUS MVM: ANÁLISIS SEROLÓGICO.....	53
INTERFERENCIA EN LAS INVESTIGACIONES.....	54
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	54
<b>1.6 OBJETIVO .....</b>	<b>55</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
<b>2.1 OBTENCIÓN DE LOS ANTÍGENOS, SEMILLA MAESTRA (SM) Y DE TRABAJO (ST) PARA LOS VIRUS SENDAI, MHV Y MVM.....</b>	<b>58</b>
2.1.1 OBJETIVO.....	58
2.1.2 MATERIALES.....	58
VIRUS SENDAI.....	58
VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV).....	59
VIRUS DIMINUTO O MINUTO DE RATON (MVM).....	59
2.1.3 MÉTODOS.....	61
OBTENCIÓN DE LA CURVA DE REPLICACIÓN DEL VIRUS SENDAI.....	61
OBTENCIÓN DE SEMILLA MAESTRA Y DE TRABAJO DEL VIRUS SENDAI.....	63

TITULACIÓN DEL CONTENIDO VIRAL EN LA SM y ST DEL VIRUS SENDAI.....	65
PRUEBA DE HEMOAGLUTINACIÓN .....	65
DOSIS INFECTIVA 50 EN CULTIVO DE TEJIDO ( DICT <sub>50</sub> ) .....	65
OBTENCIÓN DE LA CURVA DE REPLICACIÓN DEL VIRUS MHV.....	66
OBTENCIÓN DE LA SM y ST DEL VIRUS MHV .....	67
TITULACIÓN DEL CONTENIDO VIRAL DE LA SEMILLA MAESTRA DEL VIRUS MHV.....	69
OBTENCIÓN DE LA CURVA DE REPLICACIÓN DEL VIRUS MVM.....	69
OBTENCIÓN DE SM Y ST DEL VIRUS MVM.....	70
TITULACIÓN DEL CONTENIDO VIRAL DE LA SEMILLA MAESTRA DEL VIRUS MVM.....	71
<b>2.2 DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE REACTIVOS</b>	
<b>INMUNES: SUEROS Y LÍQUIDOS ASCÍTICOS.....</b>	<b>72</b>
2.2.1 OBJETIVO.....	73
2.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
SISTRATO CELULAR.....	74
INOCULACIÓN INTRANASAL (IN) DE LOS VIRUS SENDAI, MHV y MVM).....	74
INOCULACIÓN INTRAPERITONEAL (IP) DE SARCOMA 180 EN RATONES .....	75
ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN DE RATONES .....	75
VIRUS SENDAI.....	75
OBTENCIÓN DE SUEROS ANTI-SENDAI.....	75
OBTENCIÓN DE LÍQUIDOS ASCÍTICOS NORMALES...76	

OBTENCIÓN DE LÍQUIDOS ASCÍTICOS INMUNES ANTI-SENDAI.....	77
VIRUS MHV.....	79
OBTENCIÓN DE SUEROS INMUNES ESPECIFICOS PARA EL VIRUS MHV.....	79
OBTENCIÓN DE LÍQUIDOS ASCÍTICOS INMUNES ESPECIFICOS PARA EL VIRUS MHV.....	80
VIRUS MVM.....	82
OBTENCIÓN DE SUEROS INMUNES.....	82
OBTENCIÓN DE LÍQUIDOS ASCÍTICOS INMUNES ESPECIFICOS PARA EL VIRUS MVM.....	84
PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN RATONES .....	86
<b>2.3 DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE IFI PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS PARA LOS VIRUS SENDAI, MHV Y MVM.....</b>	<b>87</b>
2.3.1 OBJETIVO .....	88
2.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	88
OBTENCIÓN DE LOS ANTÍGENOS.....	88
PRUEBA DE IFI.....	89
REPRODUCIBILIDAD DE LAS PRUEBAS DE IFI.....	91
<b>2.4 DESARROLLO UNA PRUEBA DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS PARA LOS VIRUS SENDAI, MHV Y MVM .....</b>	<b>92</b>
2.4.1 OBJETIVO.....	93
2.4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
OBTENCIÓN DE LOS ANTÍGENOS.....	93
VIRUS SENDAI.....	94

VIRUS MHV .....	95
VIRUS MVM.....	96
PRUEBA DE ELISA.....	96
FORMATO GENERAL PARA LA PRUEBA DE ELISA.....	97
<b>2.5 BÚSQUEDA DE LOS VIRUS SENDAI, MHV Y MVM EN DIFERENTES BIOTERIOS DE ARGENTINA .....</b>	<b>100</b>
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>101</b>
<b>3.1 VIRUS SENDAI.....</b>	<b>102</b>
DETERMINACION DEL TÍTULO PARA EL VIRUS SENDAI POR HA.....	103
OBTENCIÓN DE LA CURVA DE REPLICACIÓN VIRAL.....	104
DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS POR IFI EN LOS ANTISUEROS Y LÍQUIDOS ASCÍTICOS OBTENIDOS APARTIR DE RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS SENDAI.....	107
REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA DE IFI.....	109
DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS POR ELISA EN LOS REACTIVOS INMUNES OBTENIDOS A PARTIR DE RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS SENDAI .....	110
CONDICIONES PARA REALIZAR LA PRUEBA DE ELISA PARA EL VIRUS SENDAI.....	111
ESTIMACIÓN PRELIMINAR DEL VALOR DE CORTE PARA TÍTULOS DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS OBTENIDOS POR ELISA.....	112
REPRODUCIBILIDAD, CONSISTENCIA Y ESTABILIDAD DE LOS ANTÍGENOS OBTENIDOS PARA LA PRUEBA DE ELISA PARA EL VIRUS SENDAI.....	114
CÁLCULO APROXIMADO DEL RENDIMIENTO EN LA OBTENCIÓN DE LOS ANTÍGENOS PARA LAS PRUEBAS DE IFI Y ELISA PARA EL VIRUS SENDAI.....	115

BÚSQUEDA DEL VIRUS SENDAI EN DIFERENTES BIOTERIOS DE ARGENTINA.....	117
<b>3.2 VIRUS MHV.....</b>	<b>118</b>
TÍTULO DE LA SEMILLA MAESTRA Y DE TRABAJO PARA EL VIRUS MHV.....	119
OBTENCION DE LA CURVA DE REPLICACION VIRAL.....	120
DETERMINACIÓN POR IFI DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN REACTIVOS INMUNES OBTENIDOS A PARTIR DE RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS MHV .....	123
REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA DE IFI.....	125
DETERMINACIÓN DEL TÍTULO POR ELISA DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN LOS REACTIVOS INMUNES OBTENIDOS A PARTIR DE RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS MHV .....	126
CONDICIONES PARA REALIZAR LA PRUEBA DE ELISA PARA EL VIRUS MHV.....	127
ESTIMACIÓN PRELIMINAR DEL VALOR DE CORTE PARA TÍTULOS DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS OBTENIDOS POR ELISA MHV.....	128
REPRODUCIBILIDAD, CONSISTENCIA Y ESTABILIDAD DE LOS ANTIGENOS OBTENIDOS PARA ELISA .....	130
CÁLCULO APROXIMADO DEL RENDIMIENTO EN LA OBTENCIÓN DE LOS ANTÍGENOS PARA LAS PRUEBAS DE IFI Y ELISA PARA EL VIRUS MHV.....	132
BÚSQUEDA DEL VIRUS MHV EN DIFERENTES BIOTERIOS DE ARGENTINA.....	133
<b>3.3 VIRUS MVM.....</b>	<b>134</b>
CURVA DE REPLICACIÓN DEL VIRUS MVM.....	136
CURVA DE REPLICACION DEL VIRUS MVM.....	138
DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS	

ESPECÍFICOS EN LOS REACTIVOS INMUNES OBTENIDOS A PARTIR DE RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS MVM.....	139
REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA DE IFI.....	140
DETERMINACIÓN DEL TÍTULO POR ELISA DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN LOS REACTIVOS INMUNES OBTENIDOS A PARTIR DE RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS MVM.....	141
CONDICIONES PARA REALIZAR LA PRUEBA DE ELISA PARA EL VIRUS MVM.....	141
ESTIMACIÓN PRELIMINAR DEL VALOR DE CORTE PARA TÍTULOS DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS OBTENIDOS POR ELISA.....	142
CÁLCULO APROXIMADO DEL RENDIMIENTO EN LA OBTENCIÓN DE LOS AG PARA LAS PRUEBAS DE IFI Y ELISA PARA EL VIRUS MVM.....	144
REPRODUCIBILIDAD, CONSISTENCIA Y ESTABILIDAD DE LOS ANTÍGENOS OBTENIDOS PARA LAS PRUEBA DE ELISA MVM.....	145
BÚSQUEDA DEL VIRUS MVM EN DIFERENTES BIOTERIOS DE ARGENTINA.....	146
<b>4 DISCUSIÓN y CONCLUSIONES.....</b>	<b>147</b>
<b>4.1 DISCUSIÓN.....</b>	<b>148</b>
<b>4.2 CONCLUSIONES.....</b>	<b>161</b>
<b>5 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>164</b>
<b>6 ABREVIATURAS.....</b>	<b>173</b>
<b>7 GLOSARIO.....</b>	<b>177</b>



## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.1.</b> Contaminantes virales buscados en colonias de ratones, ratas y cobayos de bioterio.....	31
<b>TABLA 1.2.</b> Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas y el equipo (Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. OMS 2005).....	33
<b>TABLA 2.1.</b> Resumen de las condiciones y materiales empleados para obtener las SM y ST de los virus Sendai, MHV y MVM.....	60
<b>TABLA 2.2.</b> Esquemas de inmunización con virus Sendai (antígeno) en ratones para la obtención de suero inmune anti Sendai .....	76
<b>TABLA 2.3.</b> Esquemas de inmunización con virus Sendai (antígeno) en ratones para la obtención de ascitis inmunes específicas.....	77
<b>TABLA 2.4.</b> Esquemas de inoculación con virus MHV (antígeno) en ratones para la obtención de sueros inmunes específicos .....	79
<b>TABLA 2.5.</b> Esquemas de inoculación con el virus MHV (antígeno) en ratones para la obtención de ascitis inmunes específicas .....	81
<b>TABLA 2.6.</b> Esquemas de inoculación con virus MVM (antígeno) en ratones para la obtención de sueros inmunes específicos.....	83
<b>TABLA 2.7.</b> Esquemas de inoculación con el virus MVM (antígeno) en ratones para la obtención de ascitis inmunes específicas .....	84
<b>TABLA 2.8.</b> Condiciones para la obtención de antígenos para la prueba de IFI para los virus Sendai, MHV y MVM.....	89
<b>TABLA 2.9.</b> Esquema de obtención de AG para los virus Sendai, MHV y MVM.....	93
<b>TABLA 3.1.</b> Título de las semillas virales obtenidos por HA.....	103
<b>TABLA 3.2.</b> Título de virus en sobrenadantes celulares de diferentes días de cosecha hallados por HA.....	105
<b>TABLA 3.3.</b> Resultados de una prueba de IFI para evaluar las células infectadas en diferentes días de cosecha.....	106
<b>TABLA 3.4.</b> Título hallado por IHA e IFI en muestras de sueros y líquidos ascíticos de ratones inmunizados, donde 1 UHA equivale a 4096.....	108

<b>TABLA 3.5.</b> Título de sueros y ascitis inmunes específicas para el virus Sendai por ELISA .....	110
<b>TABLA 3.6.</b> Comparación de los títulos correspondientes a muestras de sueros y ascitis inmunes procesados por las tres técnicas.....	113
<b>TABLA 3.7.</b> Títulos obtenidos por ELISA, IHA e IFI para diferentes muestras de sueros y líquidos ascíticos inmunes de ratón.....	114
<b>TABLA 3.8.</b> Determinaciones de estabilidad del antígeno para ELISA (a -70°C).....	115
<b>TABLA 3.9.</b> Resultados de la prueba de ELISA Sendai para muestras de sueros de ratones de diferentes bioterios distribuidos en la provincia de Buenos Aires y Santa Fe.....	117
<b>TABLA 3.10.</b> Título viral MHV.....	119
<b>TABLA 3.11.</b> Titulación de MHV en sobrenadantes celulares.....	120
<b>TABLA 3.12.</b> Título de MHV en rrn.....	121
<b>TABLA 3.13.</b> Porcentaje de células L929 infectadas por el virus MHV por IFI.....	121
<b>TABLA 3.14</b> Título hallado por IFI en muestras de sueros y ascitis de ratones inmunes para el virus.....	124
<b>TABLA 3.15.</b> Títulos de sueros y ascitis por la prueba de ELISA para MHV.....	126
<b>TABLA 3.16.</b> Comparación de los títulos correspondientes a muestras de sueros y ascitis inmunes procesados por ELISA e IFI para el virus MHV.....	129
<b>TABLA 3.17.</b> Títulos obtenidos por ELISA e IFI para diferentes muestras de sueros y líquidos ascíticos inmunes de ratón para el virus MHV.....	130
<b>TABLA 3.18.</b> Prueba de estabilidad del antígeno MHV para la prueba de ELISA (a -70°C).....	131
<b>TABLA 3.19.</b> Resultados de la prueba de ELISA MHV para muestras de sueros de ratones de diferentes bioterios distribuidos en la provincia de Buenos Aires y Santa Fe.....	133
<b>TABLA 3.20.</b> Título de virus MVM en sobrenadantes celulares por ECP.....	136
<b>TABLA 3.21.</b> Porcentaje de células L929 infectadas por el virus MVM	

por IFI.....	137
<b>TABLA 3.22.</b> Título hallado por IFI de muestras de sueros y ascitis de ratones inmunes .....	139
<b>TABLA 3.23.</b> Título de sueros y ascitis por la prueba de ELISA para el virus MVM.....	141
<b>TABLA 3.24.</b> Comparación de los títulos correspondientes a muestras de sueros y ascitis inmunes procesados por las dos técnicas.....	143
<b>TABLA 3.25.</b> Títulos obtenidos por ELISA e IFI para diferentes muestras de sueros y líquidos ascíticos inmunes de ratón .....	144
<b>TABLA 3.26.</b> Prueba de estabilidad del antígeno MVM para la prueba de ELISA (a- 70°C).....	145
<b>TABLA 3.27.</b> Resultados de la prueba de ELISA MVM para muestras de sueros de ratones de diferentes bioterios distribuidos en la provincia de Buenos Aires y Santa Fe.....	146
<b>TABLA 4.1.</b> Título de anticuerpos obtenido para cada virus de acuerdo al reactivo inmune y a la técnica empleada.....	152
<b>TABLA 4.2.</b> Comportamiento de cada virus en el sustrato celular Seleccionado.....	154
<b>TABLA 4.3.</b> Cosecha de antígenos virales.....	155
<b>TABLA 4.4</b> Esquema de obtención de AG para ELISA en la determinación de anticuerpos para Sendai, MHV y MVM.....	157
<b>TABLA 4.5.</b> Condiciones para la prueba de ELISA.....	158
<b>TABLA 4.6</b> Resultados de la encuesta serológica a los bioterios.....	160
<b>TABLA 4.7.</b> Estabilidad de los antígenos para las pruebas de ELISA e IFI..	162

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1.</b> Ilustración esquemática del mapa genético del virus Sendai .....	37
<b>FIGURA 1.2.</b> Infección por el virus Sendai en pulmón. ....	38
<b>FIGURA 1.3.</b> Título hallado para el virus Sendai en saliva y pulmones de ratones experimentalmente infectados.....	41
<b>FIGURA 1.4.</b> Perfil de la infección por el virus Sendai en colonias de cría de ratones enzoóticamente infectados.....	42
<b>FIGURA 1.5.</b> Marcación con inmunoperoxidasa para antígenos del virus Sendai .....	43
<b>FIGURA 2.1.</b> Esquema de inoculación de las monocapas de células LLCMK <sub>2</sub> con diferentes diluciones de la ST del virus Sendai.....	61
<b>FIGURA 2.2.</b> Protocolo utilizado para la evaluación de: a) la acción del virus Sendai sobre las células LLCMK <sub>2</sub> por observación de ECP, b) la titulación del virus en el sobrenadante celular (HA), c) las cosechas de células como posibles antígenos en las pruebas de IFI y ELISA.....	62
<b>FIGURA 2.3.</b> Esquema para la obtención de la SM y ST del virus Sendai a partir de la inoculación de HE, SPF de pollo. ....	64
<b>FIGURA 2.4.</b> Protocolo utilizado para la evaluación de la acción de distintas diluciones del virus MHV VR 261 sobre las monocapas de células L929 .....	67
<b>FIGURA 2.5.</b> Protocolo utilizado para la obtención de la SM y ST del virus MHV VR 261 sobre las monocapas de células L929 .....	68
<b>FIGURA 2.6.</b> Protocolo utilizado para la evaluación de la acción de distintas diluciones del virus MVMp VR 1346 sobre monocapas de células L929.....	70
<b>FIGURA 2.7.</b> Esquema de inmunización con el virus Sendai en RA.....	76
<b>FIGURA 2.8.</b> Esquema de obtención de líquido ascítico normal e inmune.....	78
<b>FIGURA 2.9.</b> Esquema de inoculación utilizado para la obtención de suero inmune específico para MHV en RA.....	80
<b>FIGURA 2.10.</b> Esquema para la obtención de líquido ascítico inmune (anti-MHV) y normal en ratones adultos.....	82

<b>FIGURA 2.11.</b> Esquema para la obtención de suero inmune (anti-MVM) y normal en RA.....	83
<b>FIGURA 2.12.</b> Esquema para la obtención de líquido ascítico inmune (anti-MVM) y normal en RA.....	85
<b>FIGURA 2.13.</b> Esquema del procedimiento de la prueba de IHA.....	86
<b>FIGURA 2.14.</b> Esquema de una prueba de IFI.....	87
<b>FIGURA 2.15.</b> Procedimiento empleado para obtener los spots con células normales e infectadas con el virus Sendai para realizar pruebas de IFI.....	90
<b>FIGURA 2.16.</b> Esquema de una prueba de ELISA.....	92
<b>FIGURA 2.17.</b> Esquema del procedimiento para la obtención de antígenos ...	94
<b>FIGURA 2.18.</b> Condiciones evaluadas para la prueba de ELISA para el virus Sendai.....	95
<b>FIGURA 2.19.</b> Condiciones evaluadas para la prueba de ELISA para el virus MHV.....	95
<b>FIGURA 2.20.</b> Condiciones evaluadas para la prueba de ELISA para el virus MVM.....	96
<b>FIGURA 2.21.</b> Disposición de los antígenos y muestras en las planillas de lectura del software para hallar el valor de corte para la prueba de ELISA .....	97
<b>FIGURA 2.22.</b> Disposición de los antígenos y de las diluciones de sueros y ascitis empleados en las placas, para realizar la prueba de ELISA.....	98
<b>FIGURA 3.1.</b> Esquema del procedimiento para obtener la SM, ST y AG para las pruebas de ELISA e IFI para detectar anticuerpos específicos.....	102
<b>FIGURA 3.2.</b> Observación de monocapas de células LLCMK <sub>2</sub> en microscopio óptico (400X).....	104
<b>FIGURA 3.3.</b> Células LLCMK <sub>2</sub> positivas por la prueba de IFI para detectar Ac. Anti-Sendai.....	106
<b>FIGURA 3.4.</b> Curva de replicación del virus Sendai.....	107
<b>FIGURA 3.5</b> Título de anticuerpos específicos para el virus Sendai por IFI. ....	109

<b>FIGURA 3.6.</b> Título de anticuerpos para el virus Sendai por IFI. ....	109
<b>FIGURA 3.7.</b> Valores de corte obtenidos de las muestras negativas en diferentes pruebas de ELISA .....	112
<b>FIGURA 3.8.</b> Esquema de la historia de pasajes del MHV en todas las aplicaciones de este antígeno en el presente trabajo.....	118
<b>FIGURA 3.9.</b> Observación de monocapas de células L929 en microscopio óptico (400X).....	119
<b>FIGURA 3.10.</b> Las células L929 positivas presentaron fluorescencia verdosa intracelular al ser incubadas con el reactivo inmune específico el día 4pi (400X).....	122
<b>FIGURA 3.11.</b> Curva de replicación del virus MHV.....	122
<b>FIGURA 3.12.</b> Título de anticuerpos en suero para el virus MHV por IFI.....	125
<b>FIGURA 3.13.</b> Título de anticuerpos para el virus MHV por IFI. Se procesó la misma muestra de líquido ascítico A1 de RA por IFI en días diferentes y en las mismas condiciones.....	125
<b>FIGURA 3.14</b> a) Placa de ELISA para el virus MHV. Muestra de suero positivo de ratón b) Placa control .....	127
<b>FIGURA 3.15.</b> Valores de corte obtenidos de las muestras negativas en las distintas pruebas de ELISA MHV.....	128
<b>FIGURA 3.16.</b> Esquema de la historia de pasajes del virus MVM utilizado para obtener los antígenos de las pruebas desarrolladas.....	134
<b>FIGURA 3.17.</b> Observación de ECP en células L929 con el virus MVM (400X) .....	135
<b>FIGURA 3.18.</b> Las células L929 positivas para el virus MVM por IFI al ser incubadas con el reactivo inmune específico el día 2 pi (400X).....	137
<b>FIGURA 3.19.</b> Curva de replicación del virus MVM.....	138
<b>FIGURA 3.20.</b> Título de anticuerpos específicos para MVM en suero por IFI. ....	140

<b>FIGURA 3.21.</b> Título de anticuerpos específicos para MVM en LAI por IFI...	140
<b>FIGURA 3.22.</b> Valores de cortes obtenidos de las muestras negativas en diferentes pruebas de ELISA .....	142
<b>FIGURA 4.1.</b> Características de las Semillas de virus Sendai, MHV y MVM desarrolladas y utilizadas en esta Tesis.....	150
<b>FIGURA 4.2.</b> Curvas de replicación para cada virus en condiciones optimas.....	156

# **CAPITULO N°1.**

# **INTRODUCCION**

**Y**

# **OBJETIVO**



## 1.1 LA NECESIDAD DE LOS MODELOS ANIMALES EN LA EXPERIMENTACIÓN.

El hombre por principio ético-moral esta obligado a no experimentar con seres de su misma especie, por lo que el uso de animales de experimentación ha acompañado el desarrollo científico y tecnológico por muchas décadas. Su empleo requiere de una justificación válida, cumplir con una serie de requisitos y acuerdos universales y locales, y con la apropiación de valores estrechamente relacionados con el respeto, la dignidad, responsabilidad, justicia y equidad, los cuales deben ser evaluados por grupos interdisciplinarios desde la perspectiva ética (Mrad de Osorio,2006).

Un hito fundamental en el estudio de diversas enfermedades, así como en el avance de desarrollos tecnológicos es el hallazgo y caracterización de un modelo animal. Éste puede definirse como un animal de experimentación que reproduce una enfermedad (o procesos de una enfermedad) de manera similar al huésped natural para permitir su conocimiento o abordaje mediante diferentes técnicas terapéuticas. Estos modelos ayudan a la comprensión de la patogénesis y han demostrado ser altamente relevantes para el estudio de procesos fisiopatológicos muy complejos, como el cáncer (Frese and Tuveson,2007; Walrath et al.,2010). Constituyen también una herramienta muy valiosa en proyectos de innovación tecnológica en las áreas de la salud humana y animal. En general los animales de experimentación son criados en cautiverio con el objeto de mantener condiciones uniformes y controladas, y por ello también se los denomina animales de laboratorio. Un animal de laboratorio se engendra y se cría con uno o más objetivos científicos (Olivares,1996). De acuerdo con éstos, los animales de laboratorio se pueden usar como:

- **Materia Prima:** Producción de Inmunoglobulinas (Ig), producción de parásitos, etc.
- **Reactivo Biológico:** Sustrato (animal) al que se le añade otro reactivo (tratamiento) donde se observa el producto de la reacción (cambios de parámetros biológicos), y que es capaz de dar una respuesta confiable, reproducible y comparable. Su pureza debe ser vigilada, controlada y comparada al igual que otro reactivo químico o físico sin olvidar su posible contaminación biótica.

- **Modelo Biológico:** Debe reproducir un efecto proveniente del sujeto original, poseer una estructura, una lógica propia y realizar actos determinados cuando se utiliza para extrapolar resultados de una especie animal al hombre. Válido es remarcar también que debido a las diferencias biológicas entre las especies, los resultados obtenidos en animales no siempre son aplicables a los humanos.

En el diseño y ejecución de experimentos con animales de laboratorio existen criterios básicos que deben ser atendidos: 1) la situación experimental donde el diseño, la ejecución y validación deben estar en consonancia con los objetivos del estudio 2) los principios éticos, que preconizan que el uso de modelos animales es aceptable solamente si contribuye en forma efectiva al desarrollo de conocimientos y, principalmente, debe hacerse apreciando el valor de estas especies y asegurando el cumplimiento de las “3R: refinamiento, reducción y reemplazo”(Rowell,1986; Katahira,2001; Balls,2009), 3) la adecuada calidad genética y ambiental (microorganismos, climáticos, fisicoquímicos, habitacional y nutricional), según el experimento.

### **Alternativas al uso de animales de laboratorio**

Desde hace más de 50 años se busca desarrollar métodos alternativos al uso de animales de laboratorio con métodos in vitro tales como los modelos matemáticos de simulaciones de computación y los cultivos celulares, que validen el procedimiento y los resultados esperados de la misma forma que con el modelo in vivo (Reznikov,2010; Kastenmayer et al.,2012).

Se ha demostrado que los procedimientos in vitro no pueden predecir con confiabilidad el efecto de un producto químico en los sistemas de órganos combinados del cuerpo con toda su complejidad. La evaluación de vacunas, medicamentos, técnicas o procedimientos quirúrgicos complejos requiere de una serie de etapas, que van desde las pruebas físicas y químicas, ensayos in vitro, pruebas en órganos y tejidos y finalmente la evaluación en organismos completos y vivos.

Los resultados de las investigaciones con modelos animales proporcionan información imprescindible para diseñar pruebas humanas.

## Consideraciones éticas

Existen diversas líneas de pensamiento que justifican o rechazan la investigación con animales. Ésta se justifica por el beneficio que supone para el ser humano, siempre que se tienda a eliminar el sufrimiento (Ferdowsian,2011).

Por otro lado, se considera que toda investigación con animales supone un dilema moral: mientras su uso es necesario para hallar la forma de curar enfermedades humanas, también se los trata en forma moralmente equivocada, por lo que es prioritario buscar alternativas para el reemplazo de los animales. Además, desde el punto de vista abolicionista se considera que cualquier investigación que cause dolor, sufrimiento y angustia sobre los animales con capacidades cognitivas, es equivocada, por lo que debería evitarse toda investigación en animales excepto que sea para beneficio humano (Reznikov,2010; Ferdowsian,2011).

Las investigaciones con animales de experimentación son un problema no sólo científico sino también social, que requiere definición conceptual sobre la relación hombre-animal, los derechos de los animales, la actitud frente al sufrimiento y los derechos humanos (Hendriksen,2006).

Para garantizar el mejor tratamiento posible, se han establecido múltiples reglamentaciones, acuerdos, postulados, leyes y consensos. Para su cumplimiento, se exige que cada institución establezca un Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), que supervise, examine y vigile cada posible experimento. Estos comités deben incluir miembros de la comunidad científica, un bioeticista, un miembro lego y un veterinario o experto en animales de experimentación (Cardozo de Martínez C.A,2007).

En este trabajo de tesis los animales utilizados en las diferentes experiencias (ratones), fueron tratados cumpliendo con las buenas prácticas en el tratamiento de animales de experimentación (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council, 2011. National Academy Press. Washington, D.C.*)

## **El empleo de animales de experimentación en el contexto mundial**

Los aportes científicos en el área de la biomedicina obtenidos por empleo de animales de experimentación, conducen a aceptar el uso de los modelos animales en forma racional y en condiciones controladas para el desarrollo de las investigaciones (Luy,2007) .

Según estimaciones de AnimaNaturalis, una asociación protectora de animales, cada año se utilizan 2.854.000 de éstos en procedimientos científicos en el mundo. Casi el 87% son roedores y conejos, de los cuales más de la mitad se utilizan para el desarrollo de biomedicinas.

### **1.2 El ratón como modelo experimental**

Un modelo experimental de utilización muy difundida es el ratón en sus diferentes versiones genéticas exo y endocriados.

El ratón es un modelo que ofrece muchas ventajas porque:

1. Comparte con el hombre el privilegio de ser la especie de mamífero mejor estudiada desde el punto de vista genético. Al tratarse de un mamífero, gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre.
2. Tienen un tiempo generacional muy corto, lo que facilita la rapidez de obtención de resultados.
3. Son muy prolíficos
4. Se adaptan fácilmente a la vida en los bioterios, lo que permite controlar las variables ambientales en las experiencias.
5. El cuidado, manejo y mantenimiento es más fácil respecto de otras especies.
6. Soportan bien la consanguinidad, por ello es posible obtener por medio de cruza repetidas entre individuos emparentados, líneas de individuos genéticamente idénticas.
7. La depresión endogámica es raramente observada. Existe una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénitas, además de cientos de mutaciones y un gran número de rearrreglos cromosómicos e incluso numerosas líneas de ratones obtenidas por mutación inducida y por técnicas de transgenia.

8. Es el único animal que posee sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales, lo que permite la realización de mutaciones dirigidas a través de recombinación homóloga y la subsecuente generación de ratones “knock-out” (KO) y “knock-in”.

9. Se cuenta con mapas genéticos y secuencia completa del genoma, con informaciones que muestran que casi todos sus genes tienen ortólogos en la especie humana. Esto hace que la manipulación del genoma sea relativamente sencilla permitiendo la obtención de ratones transgénicos. En estos animales se han introducido genes nuevos y/o se han eliminado genes propios.

10. Son de un costo relativamente reducido (depende del tipo de animal, de sus características genéticas y carga microbiológicas).

11. En ellos se puede realizar una gran variedad de estudios.

12. Se cuenta con una amplia estandarización según su carga microbiológica.

13. Son de pequeño tamaño, lo que facilita el uso de reactivos en mínimas cantidades.

14. Las ventajas previamente enumeradas se despliegan siempre que estos huéspedes respondan homogénea y comparablemente a los tratamientos. Para ello, las variables que afectan a los animales y deben ser controladas, homogenizadas y monitoreadas son:

- Ambientales: temperatura, humedad, ventilación.
- Fisicoquímicas: iluminación, ruidos, presencia de contaminantes, composición del aire y camas.
- Habitacionales: forma, tamaño, tipo y población de las jaulas.
- Nutricionales: dietas, agua y esquema de administración.
- Microorganismos y parásitos: con especial referencia a los patógenos específicos de cada especie.

## **Monitoreo de patógenos contaminantes de ratones en bioterios**

Para poder abordar estas necesidades los animales son criados en bioterios en donde existen barreras y se controla la calidad de todas las acometidas, desde el aire que ingresa y egresa de cada habitación hasta las características de las camas, alimento, agua, etc (Shek,2008). La efectividad de estas barreras debe ser regularmente evaluada y se manifiesta en el estado de salud de los animales para cuya vigilancia se debe cumplir con un programa de verificaciones rutinarias y especiales (Compton et al.,2004). Este monitoreo incluye la búsqueda, mediante métodos validados, de infecciones por bacterias, hongos, parásitos y virus, cuya ausencia se debe certificar. En particular, las contaminaciones por virus son un importante desafío en el sistema de monitoreo microbiológico de los bioterios (Waggie,1994). En la Tabla 1.1 se presentan los virus reconocidos como contaminantes de pequeños roedores en bioterios.

**TABLA 1.1.** Contaminantes virales buscados en colonias de ratones, ratas y cobayos de bioferio.

Virus buscados en cepas de ratones	Virus buscados en cepas de cobayos	Virus buscados en cepas de ratas
MHV ( virus de la Hepatitis murina)	Adenovirus de cobayo	Virus Toolan`s H-1
Reovirus tipo 3	Cytomegalovirus de cobayo	Reovirus tipo 3
Rotavirus (EDIM) de raton	-	X
Parvovirus	-	Parvovirus
MVM ( virus Minuto de raton )	-	Sialodacryoadenitis/Coronavirus de ratas
Parvovirus de raton	-	X
Virus Pneumonia de raton	-	Virus Pneumonia
<b><u>Virus Sendai</u></b>	<b><u>Virus Sendai</u></b>	<b><u>Virus Sendai</u></b>
virus de la Encefalomieltitis de Theiler' de raton	-	Virus Toolan's H-1
LCMV ( virus de la Linfocoriomeningitis de ratón)	-	Hantavirus
Adenovirus tipo 1 (FL) de raton	-	Adenovirus tipo 1 (FL) de raton
Adenovirus tipo 2 (K87) de raton	-	Adenovirus tipo 2 (K87) de raton
Cytomegalovirus de raton	-	Parvovirus de rata
Virus Ectromelia	-	Virus Kilham de rata

(Recomendaciones de FELASA para los controles de Sanidad en las Unidades Experimentales de ratones, ratas, hámster. Gerbos, cobayos y conejos. Laboratory Animals (1996) . Ernest D. Olfert, DVM ; Brenda M. Cross, DVM; and A. Ann McWilliam, 1993. Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals, Second edition, 1994. W.Nicklas, P. Baneux,R. Boot, T. Decelle, A.A. Deeny, M. Fumanelli and B. illgen-Wilcke, 2001. Recomendaciones de felasa ( Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de Laboratorio). FELASA Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies Laboratory Animals (2002). David Craft, 2004

### Condiciones de bioseguridad

En la historia de la microbiología hay muchos ejemplos de infecciones contraídas en el laboratorio: en 1957 se señala la ocurrencia de casos de fiebre tifoidea (Adamson,1957), cólera (Richard,1957), brucelosis (Meyer,1974),

tétanos (Newton-John,1984), etc. asociados con el trabajo de laboratorio.

Algunos agentes patógenos considerados de muy alto riesgo por que su infectividad se mantiene en los vertebrados naturalmente infectados de manera asintomática pudiendo transmitirse a los manipuladores de estos animales aparentemente sanos y a sus productos, como ocurrió con la enfermedad de Marburg aparecida en 1967 (Martinez and Ramirez Ronda,1996; Slenczka,1999; Schou and Hansen,2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que la seguridad, y en particular la seguridad biológica son importantes cuestiones de interés internacional. Es así como la OMS publicó en 1983 el primer Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, en el que se mostraba a todos los países la importancia de aceptar y aplicar conceptos básicos de seguridad biológica y de elaborar códigos nacionales para la manipulación sin riesgo de microorganismos patógenos en el laboratorio.

Desde 1983 muchos países han seguido las directivas presentes en el manual para elaborar los propios Manuales de Bioseguridad (OMS 2005).

Se define la Bioseguridad como el conjunto de normas o actitudes que tienen como objetivo prevenir los accidentes en el área de trabajo. También se puede definir como el conjunto de medidas preventivas que debe tomar el personal que trabaja en el área de la salud para evitar el contagio de enfermedades de riesgo profesional (Bakanidze et al.,2010; Augusto,2012; Miller et al.,2012).

Se ha elaborado una clasificación de agentes biológicos sobre la base de los riesgos que representan para el individuo que trabaja con ellos y para la comunidad. Se han establecido 4 grupos de riesgo en orden creciente de peligrosidad

- GRUPO I: agentes con bajo riesgo para el individuo y la comunidad
- GRUPO II: agentes con moderado riesgo individual y riesgo comunitario limitado
- GRUPO III: agentes con elevado riesgo individual y bajo riesgo para la comunidad
- GRUPO IV: agentes con alto riesgo para el individuo y para la comunidad



Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en una combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipos, prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo mencionados, según la Tabla 1.2 (Gronvall and Bouri,2008).

**TABLA 1.2.** Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas y el equipo (Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. OMS 2005).

Grupo de riesgo	Nivel de seguridad	Tipo de laboratorio	Prácticas de laboratorio	Equipo de seguridad
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica. Investigación	Técnicas microbiológicas apropiadas (TMA)	Ninguno. Trabajo en mesa de laboratorio al descubierto
2	Básico Nivel 2	Servicios de atención primaria, diagnóstico, investigación	TMA y protectora, señal de riesgo biológico	Trabajo en mesa de laboratorio al descubierto y gabinete de seguridad biológica (GSB) para posibles aerosoles
3	Contención Nivel 3	Diagnóstico especial, investigación	Práctica de nivel 2, ropa especial, acceso controlado y fluido direccional de aire	GSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades
4	Contención Nivel 4	Unidades de patógenos peligrosos	Prácticas de nivel 3, más cámara de entrada con cierre hermético, salidas con ducha y eliminación especial de residuos	GSB de clase III o trajes presurizados junto con GSB de clase II, autoclave de frontera, aire filtrado

Durante todas las etapas de este trabajo de tesis se cumplieron con las siguientes medidas de bioseguridad:

- Se trabajó en laboratorio de Nivel de Bioseguridad II, provisto de gabinete de seguridad biológica clase II.
- No se realizaron experimentos con diferentes cepas virales en simultáneo.

- Se tendió a realizar experimentos con el menor número posible de animales.
- Se trabajó con indumentaria de protección (camisolín, cofia, barbijo, guantes, cubrebotas, etc.). Esta indumentaria luego de ser utilizada fue descontaminada con 150 ppm de hipoclorito de sodio.
- La descontaminación del material reusable fue por autoclavado o por desinfección química: 10.000 ppm de hipoclorito de sodio, amonio cuaternario (dilución establecida por el fabricante) o 1 g/L de detergente de uso quirúrgico. La descontaminación del material descartable fue por autoclavado.
- Los residuos se autoclavarón y luego se descartaron como residuos patogénicos.

Las medidas de contención mencionadas están desarrolladas en:

- Normas de bioseguridad del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui. Versiones 1995 y 2000.
- Biosafety in Microbiological and biomedical Laboratories (BMBL) 5<sup>th</sup> Edition U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 5<sup>th</sup> Edition, Dec 2009.
- Ley N° 11.347 de la Provincia de Buenos Aires y su decreto Reglamentario N° 450/94. Manipulación y eliminación de residuos patogénicos en todo el territorio provincial.

**Justificación de la búsqueda de los contaminantes virales: virus Sendai, virus de la hepatitis murina (MHV) y del virus diminuto o minuto de ratón (MVM)**

La búsqueda permanente de todos los contaminantes mencionados en la Tabla 1.1 en las colonias de cría es de difícil abordaje, tanto desde el punto de vista técnico como económico. Por ello, el monitoreo regular para la detección de contaminantes virales se orienta a la detección de los agentes más frecuentemente encontrados y de aquellos que sean endémicos en la región.

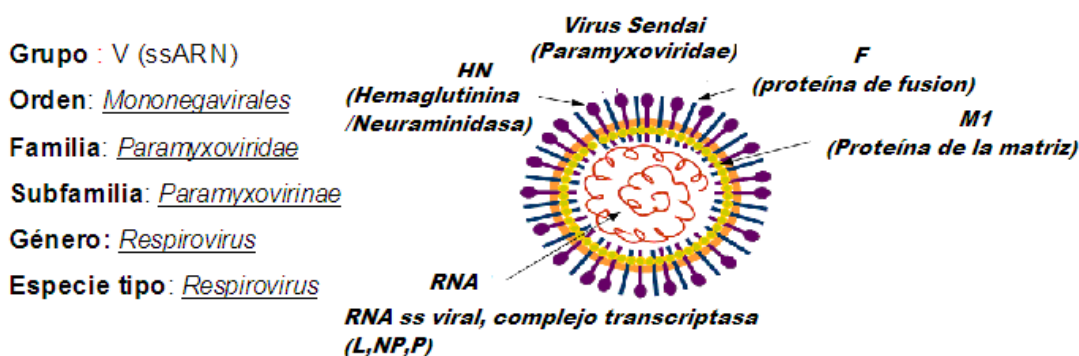
Los virus Sendai, virus de la Hepatitis Murina (MHV) y virus Minuto o Diminuto de ratón (MVM) son los contaminantes más frecuentemente encontrados en bioterios (Rottinghaus et al.,1986; Kraft and Meyer,1990;

Homberger et al.,1998). No es infrecuente hallarlos en las colonias de ratones mantenidas bajo estrictas barreras físicas, sobre todo cuando las instalaciones son compartidas por múltiples usuarios. Por ello a estos agentes se los investiga como indicadores de la presencia o no de contaminaciones virales en los bioterios.

En Argentina, la búsqueda de anticuerpos para estos virus se realiza mediante kits importados, que son de alto costo, baja estabilidad y para un número limitado de muestras. La totalidad del producto debe utilizarse dentro de los treinta días y se puede aplicar y monitorear un número relativamente pequeño de colonias. Actualmente, la encuesta serológica para virus se realiza en nuestros bioterios con materiales importados, recursos insuficientes y con menor frecuencia que la requerida. El trabajo desarrollado en esta tesis reviste la fundamental importancia de generar reactivos y metodologías serológicas confiables en Argentina que permitan el monitoreo de los animales y de los productos derivados de ellos, para la contaminación por los virus Sendai, MHV y MVM en colonias de cría de ratones (Kraft and Meyer,1986; Rottinghaus et al.,1986)

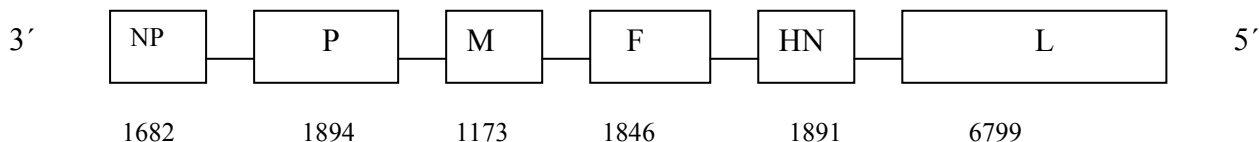
### 1.3. VIRUS SENDAI

Las características biológicas e infecciosas del virus Sendai permiten clasificarlo taxonómicamente como sigue (Parker and Reynolds,1968; Waggie,1994) :



El Sendai es un virus casi esférico de ARN hebra simple negativa (100 a 200 nm de diámetro) con una nucleocápside bastante rígida contenida en una envoltura lipídica con proyecciones, responsable de enfermedades en animales (Chanock,1979; Büchen-Osmond,1995) Esta envoltura es una bicapa de lípidos que contiene las proteínas de fusión (F), la hemaglutinina/neuraminidasa (HN) y las proteínas de la matriz (M).La glicoproteína F actúa en la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Para que la partícula viral sea biológicamente activa, la glicoproteína F debe ser clivada por una proteasa celular.La glicoproteína HN interviene en la primera etapa de la infección viral y en la unión a los receptores de la superficie celular. La glicoproteína M es central para la formación de viriones. La nucleocápside contiene el genoma viral con tres proteínas virales diferentes: la nucleoproteína (NP), la fosfoproteína (P) y la proteína larga (L).

Al igual que otros virus parainfluenza, el genoma está organizado por una región 3' líder corta seguida por 5-10 genes, y termina una región corta 5'. Este genoma codifica para las seis proteínas estructurales: las dos glicoproteínas de la superficie (HN y F), las tres proteínas de la nucleocápside (NP, P, L), y la proteína M según se muestra en la Figura 1.1.



**FIGURA 1.1.** Ilustración esquemática del mapa genético del virus Sendai (3'-5' RNA hebra simple negativa). El número debajo de cada cuadro indica la longitud de los nucleótidos del ARNm. Adaptación de Faísca y Desmecht, 2007.

El virus Sendai, no es estable a temperatura ambiente, es sensible al calor, éter, cloroformo y formaldehído. Es inactivado por exposición a 56°C durante dos horas, aunque estable a - 20°C.

### **Infección y patología**

El virus Sendai es uno de los patógenos contaminantes de roedores más frecuentes porque es altamente contagioso y difícil de controlar. La principal vía de transmisión es a través de la diseminación directa del virus por contacto y por vía respiratoria. Puede diseminarse de caja en caja e inclusive entre las habitaciones de los bioterios por fomites y aerosoles procedentes de descarga nasal.

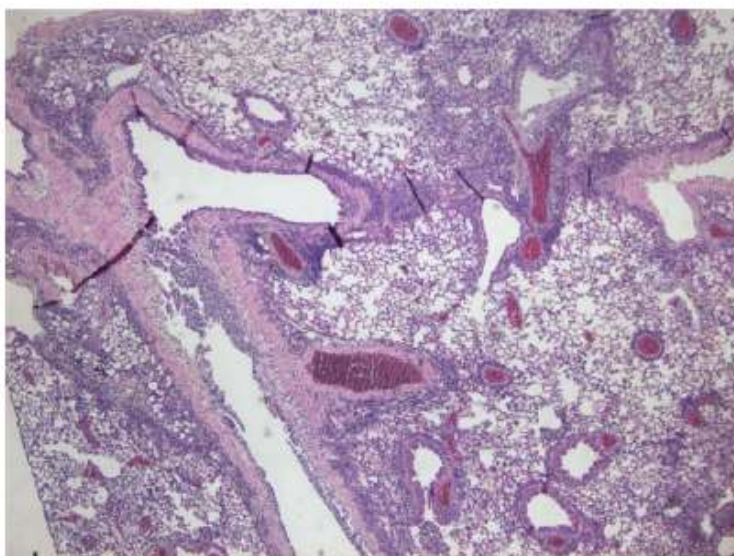
La infección por este virus fue detectada por primera vez en Japón por Fukumi y colaboradores en 1954, y más tarde en 1964 se diseminó a Estados Unidos. Trabajos previos han demostrado que la infección se puede presentar en colonias de ratones, hámsters, ratas y cobayos de laboratorio (Fujiwara et al.,1979; Grandien et al.,1985). Los ratones infectados pueden exhibir dificultades en las pariciones, disminución de la fecundidad, inconvenientes durante la lactancia y en el destete. En general no se observan signos clínicos en colonias de ratones endémicamente infectados (Parker et al.,1978). En la infección clínica aparente, los signos son variables incluyendo castañeteo, distress respiratorio durante el parto, disminución de la fecundidad en adultos, muerte en neonatos y recién nacidos y poco crecimiento en ratones de destete y adultos jóvenes.

Inicialmente se pensó que al virus Sendai originaba únicamente una infección enzoótica subclínica (virus en estado latente con una prolongada persistencia) y ocasionalmente infección epizoótica en ratones, siendo ésta generalmente aguda y acompañada de elevada mortalidad y contagio (Parker

et al.,1966; Grunert,1967; Parker and Reynolds,1968). Sólo unos años más tarde se lo reconoció como un patógeno respiratorio.

El virus Sendai se replica principalmente en el epitelio respiratorio en las infecciones naturales, con lesiones histopatológicas en las vías respiratorias (Faisca and Desmecht,2007). Este tropismo parece estar relacionado con la activación de la proteasa cuando el virus ingresa al tejido.

Las lesiones más graves están asociadas al segmento distal de la tráquea y los bronquios que presentan desorganización focal del epitelio, vacuolización, y la migración de neutrófilos. Las lesiones comienzan en áreas específicas del epitelio, avanzando luego a gran parte de las vías respiratorias inferiores. Hay un cuadro de bronquiolitis asociado con hiperplasia epitelial, pérdida de los cilios, formación de células gigantes, descamación, infiltración de mononucleares de la lámina propia y los vasos sanguíneos, infiltración de los alvéolos con células inflamatorias, restos celulares y material proteínico (Figura 1.2). En los animales gravemente enfermos los lóbulos del pulmón muestran hiperemia difusa, edema y consolidación.



**FIGURA1.2.** Infección por el virus Sendai en pulmón. Análisis histopatológico (H & E, 40x) que muestra una bronquitis proliferativa con hiperplasia epitelial marcada, pérdida de los cilios y descamación. Los vasos sanguíneos en la lámina propia están infiltrados por numerosas células linfoides y monocitoides. Algunos pozos están llenos de células inflamatorias, restos celulares y material proteínico. Ilustración de Demecht y Spark, 2007.

Es importante tener en cuenta que la interpretación de los resultados epidemiológicos y patológicos esta asociada en gran parte a las diferentes respuestas a la enfermedad clínica generadas en la variable sensibilidad de las cepas de ratones involucradas.

### **Respuesta inmune**

El virus Sendai es un potente inductor del interferón tipo 1, de los inhibidores de la replicación viral así como de las citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6) y reguladoras (IL-10), producidas principalmente por los linfocitos T CD4+. Éstos alcanzan sus niveles máximos en el período de eliminación del virus de los pulmones (Faisca and Desmecht,2007).

Éste virus tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune a través de la inhibición de la señalización del interferón, mecanismo mediado por la proteína C. Más aun, la infección por el virus Sendai induce una supresión de la respuesta inmune antibacteriana pudiendo predisponer a una infección secundaria por bacterias pulmonares. Ésta supresión puede estar relacionada con un defecto en la capacidad microbicida de los macrófagos alveolares , a la destrucción del sistema mucociliar ( según lo expuesto con anterioridad en las lesiones histopatológicas) y a la dificultad en el transporte de los nutrientes, debido al edema local (Faisca and Desmecht,2007).

Sin embargo, la inmunidad celular es fundamental en la protección contra las infecciones virales respiratorias. Las células T CD4 + son fundamentales en la inducción de la respuesta mediada por células T CD8 + citotóxicos y también en la inducción de la respuesta de las células B con producción de anticuerpos protectores.

En ratones experimentalmente infectados con el virus Sendai, fue demostrada la presencia de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> de memoria que persisten en los pulmones enfermos de los animales aun luego de la resolución de la infección (Hogan et al.,2001; Hogan et al.,2002).

Las células T CD8<sup>+</sup> efectoras primarias y de memoria son fundamentales en el reconocimiento antigénico y en la inducción de muerte por apoptosis de las células infectadas. Las células T CD4<sup>+</sup> de memoria responden de forma inmediata luego de la re-estimulación *in vitro* (con producción de IFN- $\gamma$ , una citoquina crucial tanto para la respuesta inmune celular, como para la

respuesta humoral), y también protegen contra la infección secundaria, en ensayos de transferencia adaptativa en animales deficientes en células T CD8<sup>+</sup> (Hogan et al.,2001).

En un modelo de vacuna con un péptido inmunodominante HN del virus Sendai y la posterior infección viral, originó la generación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de memoria que inducían un aumento de anticuerpos específicos y la eliminación viral además de la reducción de la actividad celular citotóxica (Zhong et al.,2000).

Los anticuerpos generados pueden atravesar la placenta, por lo que, los recién nacidos resultan protegidos durante las primeras semanas de vida (Faisca and Desmecht,2007).

La respuesta humoral con anticuerpos específicos de los isotipos IgM e IgG alcanzan un nivel significativo alrededor de una semana después de la infección, mientras que los títulos de IgG se mantienen elevados durante mucho tiempo. Los títulos de IgA también resultan significativamente altos en los ganglios linfáticos y en el bazo, respectivamente, después de los días 10 y 14 post infección (Faisca and Desmecht,2007) .

### **Búsqueda de infección por el virus Sendai: análisis serológico**

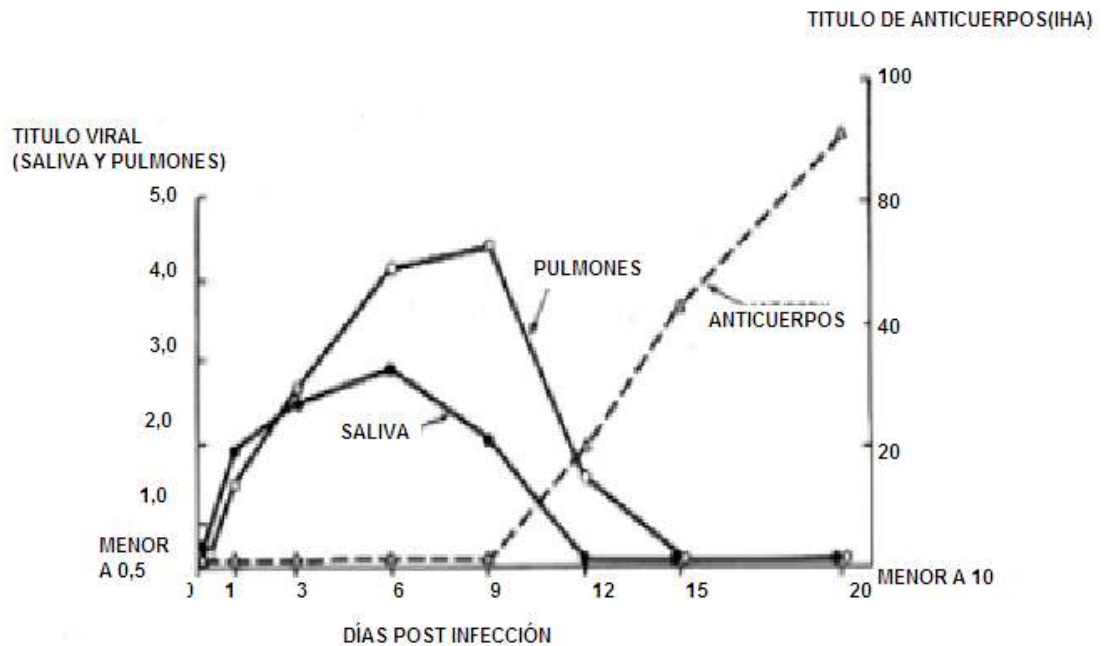
En un estudio realizado por Parker y Reynolds en 1968, se inocularon experimentalmente ratones con el virus Sendai. En la saliva y los pulmones se evaluó la presencia de la infección viral, mientras que en el suero se buscó anticuerpos específicos por inhibición de la hemoaglutinación (IHA).

Según se observa en la Figura 1.3, el virus Sendai pudo ser aislado durante las dos primeras semanas post inoculación (pi) de los ratones, pero no pudieron ser detectados los anticuerpos específicos en éste periodo. El título de anticuerpos fue detectable el día 12, mientras que el título viral disminuyó marcadamente. No hubo detección viral el día 15 pi aunque continúo elevado el título de anticuerpos. En éste periodo, un intento de aislamiento viral podría dar un resultado falso negativo. Las pruebas serológicas durante ésta fase de infección activa podrían también resultar en falsos negativos.

Se estudiaron por inmunofluorescencia (IFI) las diferentes clases de Igs que se hallaron en los pulmones de los ratones después de la infección

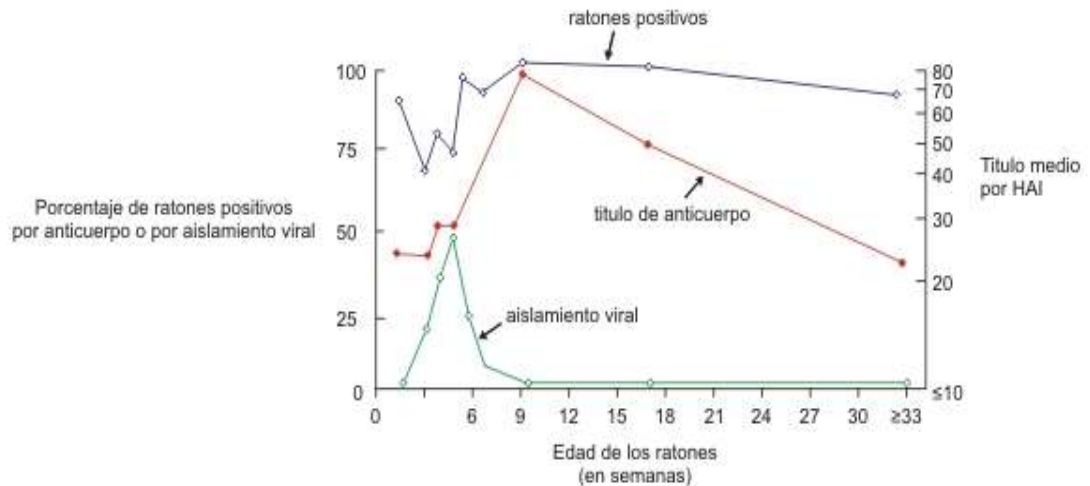


primaria con el virus Sendai. En los primeros 5 días pi hubo un gran aumento en todas las clases de Igs, con un predominio de IgA. Hacia el día 6 pi tanto las IgG como las IgA estuvieron presentes en igual número. Esa relación 1:1 persistió cerca de 30 días y estuvo seguida por una reversión gradual hacia un exceso de IgA. El contenido de células conteniendo IgM representó solo 1:15 a 1:30 del total de las Igs durante toda la infección (Blandford and Heath, 1974).



**FIGURA 1.3.** Título hallado para el virus Sendai en saliva y pulmones de ratones experimentalmente infectados. El título de anticuerpos fue expresado como la inversa de la máxima dilución en donde se observa IHA, mientras que el título viral fue expresado como  $-\log_{10}$  DICT50 por 0,05 ml. Adaptado de Am. J. Epidem, 88:112, 1968.

Cuando el mismo estudio fue efectuado en colonias de ratones enzoóticamente infectados (Figura 1.4), se observó que el virus pudo ser aislado de ratones de 3 a 6 semanas de edad. Los ratones fueron protegidos por los anticuerpos maternos hasta la semana 3. Posteriormente, a la 6 semana, los ratones desarrollaron inmunidad activa y se recuperaron de la infección. Los anticuerpos persisten y son detectables durante toda la vida.



**FIGURA 1.4.** Perfil de la infección por el virus Sendai en colonias de cría de ratones enzoóticamente infectados. Adaptado de Am. J. Epidem, 88:112, 1968.

Es interesante resaltar que la mayoría de los aislamientos del virus obtenidos de ratas y ratones son antigénicamente indistinguibles y de una patogenicidad muy similar (Kraft and Meyer, 1990).

### Interferencia con la investigación

La infección de una colonia de cría generará por lo menos alguno de los siguientes efectos sobre la investigación en animales infectados:

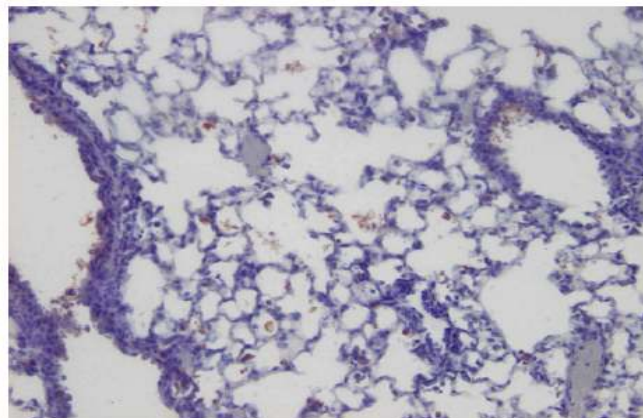
- Produce alteraciones sobre el sistema inmune
- Es un potente inhibidor de la inmunidad de base humoral
- Aumenta el número de células killer
- Induce un incremento en el nivel del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y otras citoquinas
- Aumentan los CD4 y CD8, además de las células T en el tracto respiratorio
- Altera la acción de los macrófagos causando retraso en la cicatrización
- Altera el crecimiento de los tumores transplantables

- Puede producir variantes de células tumorales
- Altera la respuesta a determinados agentes carcinogénicos químicos sobre el pulmón
- Como en general es inmunosupresor, favorece la aparición de infecciones bacterianas pulmonares

### Definición del problema

La infección de ratones por el virus Sendai puede sospecharse mediante la identificación de signos de enfermedad y cambios patológicos en los animales. Mientras que la confirmación se efectúa a través del aislamiento e identificación del patógeno por sí mismo mediante inoculación de un huésped específico (huevos embrionados, cultivos celulares y otros), técnicas de biología molecular (RT-PCR), y la detección de anticuerpos en respuesta a la infección.

El diagnóstico basado solamente en el análisis histopatológico es insuficiente ya que está limitado a las lesiones, las cuales no son patognomónicas de la infección por el virus Sendai. La especificidad y sensibilidad puede ser alcanzada mediante la asociación de técnicas de detección de partículas virales e identificación de anticuerpos específicos, tal como puede ser visualizado por una técnica de inmunohistoquímica en la Figura 1.5.



**FIGURA 1.5.** Marcación con inmunoperoxidasa para antígenos del virus Sendai .Células positivas en el epitelio bronquial y en el espacio alveolar de pulmones de ratón. Ilustración de Faísca y Demecht, 2007.

En la respuesta inmune se forman anticuerpos que persisten durante periodos variables de tiempo en la sangre de los roedores (Ito,1976; Fujiwara et al.,1979; Grandien et al.,1985; Magaly de Garmendia,2001) y por ello la detección de anticuerpos a menudo se convierte en el abordaje de elección. El desarrollo de ensayos serológicos rápidos, específicos y sensibles resulta necesario para los procedimientos de monitoreo de rutina del estado de salud de los animales (Ito,1976; Fujiwara et al.,1979; Grandien et al.,1985; Chiparelli et al.,1988; Weisbroth et al.,1998).

#### 1.4. VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV)

El virus MHV pertenece a la familia Coronaviridae y al género Coronavirus (Yamada et al.,2001). Su clasificación taxonómica, basada en sus características biológicas e infecciosas, es:

**Grupo:** IV (virus de ARN monocatenario positivo)

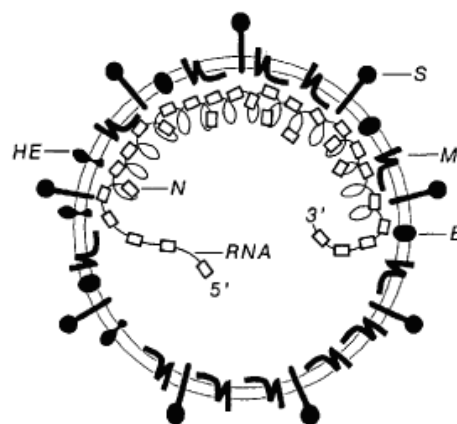
**Orden:** Nidovirales

**Familia:** Coronaviridae

**Subfamilia:** Coronavirinae

**Género:** Coronavirus

**Especie tipo :** Virus de la Hepatitis Murina (MHV)



Representación esquemática del virión de MHV

Los Coronaviridae son una familia de virus de ARN, donde se agrupan más de 12 patógenos específicos de mamíferos y aves. El ARN es de hélice simple, sentido positivo de 27 a 31 kilobases, con superficies reunidas semejanado una corona de 120 a 160 nm de diámetro. Ambos extremos 5' y 3' terminales del genoma tienen una cubierta y un politracto (A) respectivamente.

La cubierta consiste de dos estructuras glicoproteicas virales S y M. La glicoproteína S es ricamente glicosilada, de alto peso molecular y se ubica en la parte externa de la membrana de la envoltura y es responsable de las proyecciones abultadas (peplómeros) que caracterizan a los coronavirus, los cuales usan como ligandos en la fusión de membrana. La glicoproteína M

(proteína matricial) es una molécula transmembrana y se localiza en la parte interna de la cubierta. Otra importante estructura proteica es la fosfoproteína N (nucleoproteína), responsable de la simetría helicoidal de la nucleocápside que incluye al ARN genómico, difícil de discernir por microscopía electrónica (Büchen-Osmond,1995).

Los Coronavirus se transmiten por vía oro-fecal, por aerosoles procedentes de secreciones respiratorias, fomites, contacto directo y por canibalismo (Taguchi et al.,1979; Anton M. Allen,1986).La transmisión vertical fue reportada en infecciones experimentales pero no hay casos documentados de infecciones espontáneas (Barthold et al.,1988; Compton et al.,1993).Tiene un período de incubación de 2 días a una semana, con eliminación de partículas virales. Replica en el citoplasma de la célula hospedadora, gema en el retículo endoplasmático y pasa a las cisternas del aparato de Golgi, hasta que es finalmente liberado por exocitosis (Barthold and Smith,1984).

El virus MHV es estable a 37°C en un rango de pH entre 6,0 a 6,5. Es moderadamente resistente a pH 3 y al desoxicolato de sodio. Permanece viable en un medio fortificado con proteínas a la temperatura de 60°C así como es resistente a la temperatura de -70°C. Es inactivado por calentamiento a 56 °C durante 30 minutos de exposición. Es sensible al éter y al cloroformo.

### **Infeción y patología**

Las infecciones por Coronavirus fueron descubiertas al principio del año 1930. La primera cepa de MHV fue aislada en 1947 por Cheevers y colaboradores pero recién en 1975 se creó la familia Coronaviridae con un único género: Coronavirus. La relación entre los diferentes Coronavirus es muy compleja por lo que el género ha sido dividido en cuatro grupos diferentes en base a las características antigénicas y genéticas de los mismos (Hombberger,1997).

Los Coronavirus han sido aislados de la mayoría de las especies animales evaluadas, incluyendo la humana. En el año 2003 un Coronavirus emergente fue identificado como agente etiológico del brote epidemiológico del SARS (Ksiazek et al.,2003), previo a éste descubrimiento, los coronavirus humanos fueron típicamente asociados con infecciones respiratorias medias y

altas en la temporada invernal (Hamre and Procknow,1966; McIntosh et al.,1967).

La enfermedad en animales de gran porte suele afectar severa y significativamente la agricultura y economía (Baker,1998).

El ratón es el único hospedador de MHV. La infección natural ocurre solamente en los ratones aunque otras especies de roedores pueden tener anticuerpos específicos (anti- MHV) (Kraft and Meyer,1986).

Aunque mejorados los métodos para su control y detección sigue siendo un adversario difícil de eliminar de los animales de experimentación. En 1996 una publicación mencionó la infección por MHV en más del 10% de las colonias libres de patógenos específicos (SPF) de los centros de estudios biomédicos de la más alta complejidad (Magaly de Garmendia,2001) (CRL.Charles River Laboratories. Serological Testing to Monitor for Viral and Mycoplasmal Infeccion .On line 1990. URL: <http://www.criver.com/techdocs/hmresults.html>).

Se identificaron dos patrones de la enfermedad en ratones basados en su sitio inicial de replicación de la cepa del virus: politrópica o respiratoria y la enterotrópica (Kyuwa et al.,2000).

En el patrón politrópico o respiratorio se hallan las cepas MHV-1, MHV-3, MHV-5, JHM y A59, donde la replicación viral comienza a nivel de las cavidades nasales y los pulmones con viremia y diseminación a otros órganos. El compromiso intestinal es mínimo. El patrón enterotrópico de la enfermedad comprende las cepas MHV-Y y MHV-R1 quienes infectan las vías respiratorias altas y el tracto intestinal, con una diseminación variable o nula hacia otros órganos (Bond et al.,1979). Inclusive algunas cepas pueden diseminarse al cerebro. Existe un solapamiento entre éstos dos patrones de enfermedades dependiendo de cual de las cepas este involucrada (Barthold and Smith,1992).

En ratones recién nacidos es muy frecuente la hemorragia intestinal, exudado peritoneal sanguinolento, ictericia, lesiones hepáticas y muerte (Broderson et al.,1976). El periodo de incubación es de cuatro a siete días.

La edad, la cepa, la inmunocompetencia del hospedador y la cepa del virus involucrada son factores que deben ser considerados en la expresión de la infección por MHV(Barthold et al.,1993). En ratones inmunocompetentes la infección es generalmente subclínica pero altamente contagiosa. En estos animales la asociación con bacterias tales como Eperythrozoon coccoides

predispone a una infección activa. En recién nacidos se presenta con diarrea acuosa e importante mortalidad cuando se trata de una cepa enterotrópica (Broderson et al.,1976).

En ratones infectados es frecuente ver lesiones groseras durante una necropsia, mientras que se observa una distensión gaseosa del tracto intestinal en ratones recién nacidos y múltiples focos de lesiones en ratones adultos.

Presenta efecto citopatogénico (ECP) en líneas celulares procedentes de tejido de ratón, tales como las células hepáticas (NCTC 1469) o fibroblastos (L929) (Kyuwa et al.,2000).

### **Respuesta inmune**

La inmunidad humoral y celular son fundamentales en la recuperación de los ratones infectados con MHV, independientemente de la cepa de ratón o del biotipo viral. El virus MHV es un potente modulador de la respuesta inmune (Tamura et al.,1977) y ocasiona grandes complicaciones en los estudios inmunológicos (Smith et al.,1991; Smith et al.,1992). Los macrófagos activados por el interferón desempeñan un rol fundamental en la resistencia a la infección, la cual es genéticamente dependiente (Lucchiari and Pereira,1990).

Los anticuerpos pueden ser detectados en suero a los 10 días post inoculación experimental de los ratones (Barthold,1993; Barthold and Smith,1993) quienes tienen títulos elevados de IgG en suero por un periodo superior a los seis meses. La proliferación de las células T y la producción de citoquinas se halla alterada en la infección experimental in vitro de ratones BALB/cByJ con la cepa JHM de MHV (Smith et al.,1991; Smith et al.,1991). Los ratones centinelas colocados en las colonias enzoóticamente infectadas seroconvierten a los 14 días luego de su introducción en las mismas. Los anticuerpos maternos son significativamente protectores en los ratones recién nacidos en las colonias enzoóticamente infectadas.

### **Búsqueda de infección por el virus MHV: análisis serológico**

El diagnóstico de la infección puede ser realizado en los cuadros agudos mediante la observación de las lesiones típicas en hígado, intestino, etc. y una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar el antígeno viral. El virus puede ser aislado por inoculación intranasal de ratones infantiles o en cultivos celulares, pero el resultado de éste último no siempre se correlaciona con el resultado de la IFI. Existe una elevada reactividad cruzada de los anticuerpos dirigida a tres proteínas estructurales de MHV (Hombarger et al.,1991), pero los anticuerpos neutralizantes están dirigidos contra ciertos epitopes sobre la proteína S (Gallagher et al.,1990).

Es de elección la utilización de una prueba de ELISA o IFI. La prueba de fijación del complemento es de baja sensibilidad (Anton M. Allen,1986).

### **Interferencia en las investigaciones**

Cuando la colonia de cría está infectada con MVH aparecerán efectos en los animales infectados que se puede resumir como sigue. En ratones inmunocomprometidos genera:

- Alteraciones necróticas en hígado, pulmones, bazo, intestinos, cerebro, nódulos linfáticos y médula ósea.
- Diferenciación de células T portadoras de marcadores de linfocitos T
- Alteraciones en actividades enzimáticas, en la concentración de bilirrubina y en las respuestas de anticuerpos a eritrocitos de cordero en suero
- Incrementada actividad fagocítica en macrófagos
- Rechazo de tumores
- Disminuida regeneración hepática

En ratones inmunocompetentes ocasiona, entre muchos efectos:

- Inmunoestimulación transitoria seguida de inmunodepresión
- Involución tímica
- Anemia microcítica y cambios en la ferro cinética
- Decaimiento en la respuesta proliferativa de linfocitos, en la secreción de anticuerpos y en la actividad fagocítica



- Disminución de la regeneración hepática y en la producción de células de sangre
- Decrecimiento del número de células endoteliales fenestradas en el sinusoide hepático
- Menor incidencia de diabetes mellitus en ratones diabéticos no obesos
- Cambios apoptóticos en el timo
- Incrementada actividad tumoricida de macrófagos peritoneales
- Alteraciones en la susceptibilidad a patógenos y en la actividad hepática
- Producción aumentada de IL-12 e interferón
- Desmielinización nerviosa y baja producción de células B y pre B en médula ósea

### **Definición del problema**

El MHV es el agente viral infeccioso más importante de los ratones, debido al uso de éstos en las más diversas investigaciones y a su empleo como modelo experimental para la infección por Coronavirus en otros animales, incluido el hombre (Baker,1998; De Juan Herraez and Herraez,2004; Frese and Tuveson,2007). Afecta la respuesta inmune, altera el metabolismo hepático, puede contaminar productos biológicos como tumores transplantables, líneas celulares, líquido ascítico, y lotes virales obtenidos de cerebro, hígado, bazo y células óseas. La infección persistente por MHV reduce la incidencia de diabetes mellitus en ratones diabéticos no obesos (Wilberz et al.,1991).

La infección enzoótica subclínica es típica de las colonias convencionales de cría de ratones, en las cuales los ratones adultos son inmunes, los ratones lactantes están pasivamente protegidos y la infección se perpetua en los ratones de destete que sólo están parcialmente protegidos por los anticuerpos maternos. (Broderson et al.,1976; Broderson,1980; Homberger et al.,1998). Las ratas de destete son moderadamente susceptibles cuando se las inocula experimentalmente por vía intranasal.

La infección con MHV produce la seroconversión en todas las cepas de ratones. Los anticuerpos persisten durante toda la vida (Anton M. Allen,1986).

Por lo tanto, la detección de anticuerpos es el abordaje de elección. Por otro lado, los ensayos serológicos son rápidos y específicos cuando la técnica está desarrollada convenientemente y son de elección para los procedimientos de monitoreo de rutina del estado de salud de los animales (Ito,1976; Grandien et al.,1985; Chiparelli et al.,1988; Weisbroth et al.,1998).

### 1.5. VIRUS MINUTO O DIMINUTO DE RATON (MVM)

El virus MVM pertenece a la familia Parvoviridae y al género Parvovirus. Su clasificación taxonómica basada en sus características biológicas e infecciosas es (Ros et al.,2002):

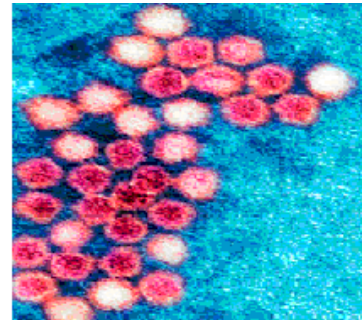
**Grupo:** II (ADN monocatenario)

**Familia:** Parvoviridae

**Subfamilia:** Parvovirinae

**Género:** Parvovirus

**Especie tipo :** Virus Diminuto o Minuto de ratón (MVM)



Cluster de Parvovirus.  
<http://uct.ac.za/depts/mmi/stannard/parvo-em.html>

Dentro de la familia de los Parvovirus se encuentran tres grupos: los densovirus que infectan insectos, y dos grupos restantes de virus estrechamente relacionados de parvovirus autónomos y adenoasociados los cuales se los ha hallado parasitando pájaros y mamíferos, incluyendo el hombre (Cornelis et al.,1988).

El MVM es un virus monocatenario de cadena única positiva de ADN, pequeño, de 20 nm de diámetro, de simetría icosaédrica, sin envoltura. Replica en el núcleo de las células en división (Ros et al.,2002). El genoma viral codifica para dos proteínas no estructurales NS-1 y NS-2 que están altamente conservadas en la mayoría de los parvovirus y son responsables de la reactividad cruzada en ensayos serológicos genéricos. Las proteínas de la cápside viral VP-1 y VP-2 son virus específicas y son las que permiten realizar la diferenciación serológica entre MVM y el parvovirus del ratón (MPV) (Parker et al.,1970).

La característica más sobresaliente de estos virus es que crecen rápidamente en tejidos en división, siendo dependientes para su propia replicación de que la célula se halle en la fase S del ciclo celular (Kimsey et al.,1986).

El proceso de penetración a la célula huésped ha sido bastante estudiado. El MVM emplea la fracción del ácido siálico de las glicoproteínas de la superficie celular como receptor para el ingreso a la célula seguida de una endocitosis en donde la acidez del medio, las vesículas endosómicas y el citoesqueleto celular es de fundamental importancia (Ros et al.,2002). Posee una replicación lítica (Koering et al.,1996). Replica en monocapas de fibroblastos de ratón (A9), células gliales de rata (C6), células embrionarias de ratas y ratones, etc. con producción de ECP que puede incluir el desarrollo de inclusiones intranucleares (Brownstein et al.,1992).

Es un contaminante frecuente en preparaciones de virus de la leucemia de ratón, tumores transplantables, hibridomas y líneas celulares.

El MVM comparte las características de todos los parvovirus en cuanto a que es estable en el medio ambiente, ya que es resistente a la desecación, al pH, a ciertos desinfectantes y a temperaturas extremas. Es resistente a solventes lipídicos. Se inactiva totalmente por calentamiento a 100°C por 15 minutos. La exposición a 60 °C durante 1 hora sólo resulta en una inactivación parcial. En condiciones experimentales, la exposición por periodos cortos de suspensiones virales en etanol al 70%, 0,5 % de formaldehído y 2% de glutaraldehído producen una reducción cercana a seis logaritmos en los títulos de infectividad (Harris et al.,1974).

### **Infección y patología**

Un estudio científico realizado en las instituciones dedicadas a la investigación con ratones de diferentes laboratorios en Estados Unidos en 1996, mostró una prevalencia para el MVM del 45%(Besselsen et al.,2006).

En el año 1997, en un foro de ciencia en USA se presentó la prevalencia para el virus MVM en las colonias de ratones convencionales, la misma alcanzaba el 40% (Jacoby and Lindsey,1997). Así mismo, en Venezuela se estudió la prevalencia del MVM en ratones de laboratorio hallándose una prevalencia del 66,7% con valores superiores al 50% en animales destetados y

de 78,6% en adultos (de Garmendia,2001). Es altamente contagioso en el ratón, su huésped natural, y se transmite principalmente por vía urinaria o fecal, alimentos contaminados y ropa de cama (Parker et al.,1970). La transmisión por aerosoles no es frecuente. La infección congénita no ha sido probada.

La primera de las cepas del virus MVM fue aislada en 1966 desde un preparado de adenovirus y fue considerada la cepa prototipo (MVMp). La segunda cepa fue aislada en 1976 desde linfocitos contaminados, más tarde se demostró que esta cepa era inmunosupresiva in vitro (MVMi). La tercera de las cepas llamada MVM-Cutter (MVMc) fue hallada como contaminante y aislada de células BHK2 empleadas para producir una proteína recombinante en 1980 (Besselsen et al.,2006).

Las cepas MVMp y MVMi son serológicamente indistinguibles pero poseen diferentes especificidades en las células blanco (Astell et al.,1986). Difieren en su capacidad para infectar diferentes cultivos celulares: el virus prototipo MVMp infecta únicamente fibroblastos mientras que la variante MVMi esta limitada a los linfocitos.

El resultado de la infección natural en ratones inmunocompetentes es esencialmente asintomática (Janus et al.,2008) y no se asocia con cambios histopatológicos específicos. Durante la infección aguda, la replicación del virus se produce en el intestino delgado, órganos linfáticos y el hígado. El virus puede persistir en los ganglios linfáticos mesentéricos por largos períodos.

Por otro lado, la infección enzoótica o epizootica por MVM no ha sido asociada con cambios patológicos específicos en ratones. Ratones experimentalmente inoculados con MVMi pueden desarrollar una enfermedad fatal. Para que esto ocurra los ratones deben tener menos de un día de edad y ser de un genotipo susceptible. En contraposición, la infección por MVMp realizada en condiciones similares no es letal y no produce morbilidad (Kimsey et al.,1986; Brownstein et al.,1992).

Defectos dentales y faciales han sido hallados en hamsters neonatos experimentalmente inoculados con MVMp o MVMi, pero este animal no es hospedador natural del virus (Kilham and Margolis,1970; Baer and Kilham,1974).

## **Respuesta inmune**

El contacto continuo con animales infectados o camas sucias induce una respuesta humoral dentro de las tres semanas post exposición, pero puede retardarse la seroconversión. Los ratones silvestres recién nacidos suelen infectarse durante el segundo y tercer año de vida (Parker et al.,1970).

Las colonias de ratones jóvenes enzoóticamente infectadas son protegidas por los anticuerpos maternos durante 2-4 semanas, luego de éste periodo disminuyen los anticuerpos maternos (Barthold et al.,1988; Barthold and Smith,1992; Homberger et al.,1998) y se desarrolla la inmunidad adquirida.

Las madres infectadas pueden excretar virus incluso en presencia de anticuerpos, lo cual plantea un riesgo para los otros ratones de la colonia.

El virus MVM en contraposición con el virus MPV, no causa una infección persistente. En ratones adultos inmunocompetentes dura menos de tres semanas (Jacoby et al.,1988) mientras que se extiende por menos de un mes en ratones recién nacidos inoculados experimentalmente por vía IN (Janus et al.,2008).

## **Búsqueda de infección por el virus MVM: análisis serológico**

Debido a que la infección por MVM carece de signos clínicos y de lesiones patológicas específicas, se requiere la realización de pruebas serológicas para el monitoreo de las colonias de ratones.

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta presentan reactividad cruzada con el parvovirus de ratón (MPV) y con otros parvovirus estrechamente relacionados, debido a la elevada conservación de proteínas no estructurales.

Los tests de ELISA e IFI son relativamente sencillos de interpretar, sensibles, de bajo costo y específicos. Tienen la ventaja adicional de no ser discriminadores de grupo viral, es decir pueden detectar otros parvovirus además del MVM, lo cual permite conocer la circulación de cualquiera de estos agentes en el monitoreo de los bioterios.

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) puede ser utilizada para detectar anticuerpos específicos de grupo (Janus et al. ; Smith,1983; Zuluaga,2003; Janus et al.,2008).

## **Interferencia en las investigaciones**

En los bioterios infectados con MVM se pueden esperar los siguientes efectos sobre la investigación en animales infectados:

- Presencia de cuerpos de inclusión intranucleares
- Débil inducción de interferón in vivo y, en determinadas situaciones experimentales, in vitro
- Algunas cepas inhiben la proliferación de linfocitos y la generación de linfocitos T citolíticos
- Depresión de la estimulación mitogénica en células B y T esplénicas
- La infección neonatal con algunas cepas puede tener efectos tardíos sobre la inmunocompetencia de los animales
- Disminuye la hematopoyesis en células de bazo y médula ósea
- Contamina líneas de células, leucémicas y tumores transplantables
- Infecta persistentemente líneas celulares
- Altera las funciones nucleolares
- Puede provocar malformaciones congénitas o muerte fetal
- Puede inhibir la transformación celular por SV40
- Diversas interferencias con estudios involucrando tumores

### **Definición del problema**

Los parvovirus murinos tienen un importante efecto deletéreo en los estudios científicos de investigación debido a la ausencia de una manifestación clínica de la enfermedad y a la ausencia de lesiones histopatológicas en ratones natural o experimentalmente infectados. Además, presentan efectos inmunomoduladores tanto in vivo como in vitro (Bonnard et al., 1976).

El virus MVM es un contaminante común de líneas de cultivos celulares, tejidos y otros materiales biológicos de origen murino (Collins and Parker, 1972; Bonnard et al., 1976; Nicklas et al., 1993). Su elevada estabilidad en el medio ambiente potencia su efecto nocivo y justifica aun más su búsqueda mediante métodos apropiados en las colonias de ratones haciendo crítica su identificación para poder minimizar el impacto en las investigaciones científicas.

## 1.6. OBJETIVO

Desarrollar y aplicar técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA para la detección en ratones de anticuerpos específicos para los virus Sendai, Hepatitis Murina (MHV) y Virus Minuto del Ratón (MVM). Para ello, se plantea el siguiente esquema experimental para cada virus, considerándose cada etapa un objetivo parcial:

1. Obtención de las cepas adecuadas y certificadas para cada virus a estudiar
2. Búsqueda de un sustrato que replique (amplifique) adecuadamente a cada cepa de virus original
3. Búsqueda de manifestaciones en el huésped seleccionado: signos clínicos en animales o efecto citopatogénico en cultivos celulares
4. Determinación de títulos virales logrados en los huéspedes seleccionados
5. Identificación de células infectadas por cada virus
6. Determinación de cinética de replicación viral en cada sistema virus-huesped, para fijar condiciones y momentos óptimos de obtención de los antígenos destinados a las pruebas serológicas a desarrollar
7. Obtención de anticuerpos específicos para cada virus
8. Demostración de la especificidad de los reactivos inmunes logrados para revelar cada virus.
9. Ajuste de las condiciones en que antígenos y antisueros para cada virus deben utilizarse en pruebas específicas de IFI
10. Ajuste de las condiciones en que antígenos y antisueros para cada virus deben utilizarse en pruebas específicas de ELISA
11. Aplicación de las pruebas serológicas desarrolladas al control sanitario del Bioterio de ratones del INEVH Dr. JI Maiztegui
12. Aplicación de las pruebas desarrolladas en bioterios de diferentes instituciones del país, para ofrecer servicio y obtener base de datos suficiente para la validación de los ensayos

Este proyecto se orienta al desarrollo y validación de un kit diagnóstico para el monitoreo serológico de colonias de cría de ratones, de origen nacional, de bajo costo y alta disponibilidad para todas las instituciones

comprometidas en la cría de ratones de laboratorio. Los datos que se espera obtener sobre la circulación de los virus Sendai, MHV y MVM en las colonias de cría de Argentina podrán utilizarse como indicadores subrogantes del estado sanitario de las mismas.



**CAPITULO N°2**

**MATERIALES**

**Y**

**METODOS**

## **2.1 OBTENCION DE LOS ANTIGENOS, SEMILLA MAESTRA (SM) Y DE TRABAJO (ST) PARA LOS VIRUS SENDAI, VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV) Y VIRUS DIMINUTO O MINUTO DE RATON (MVM)**

El desarrollo y la estandarización de pruebas serológicas reproducibles y confiables implica contar con un sistema controlado del material necesario como stock, tanto en cantidad como en calidad. El pasaje no controlado de un virus por un huésped cualquiera puede introducir cambios en el comportamiento del agente. Por ello cuando un virus va a ser utilizado como antígeno en una prueba serológica, el rango de replicaciones del agente en el sustrato seleccionado debe mantenerse dentro de un intervalo permanentemente. Para ello, los antígenos virales se manejan en un sistema de “banco” integrado por la Semilla Maestra (SM) y la Semilla de Trabajo (ST).

Se denomina SM al primer stock de virus obtenido en las condiciones óptimas encontradas experimentalmente. La ST se deriva por replicación de la SM y con ella (ST) se realizan todos los experimentos requeridos en el plan de trabajo. Para la generación de estas Semillas es imprescindible contar con el conocimiento previo de la cinética de replicación de los diferentes virus que permita seleccionar las condiciones y el momento óptimo de cosecha de los sustratos virales según el objetivo buscado.

### **2.1.1. Objetivo**

Generar una SM y ST para cada uno de los virus: Sendai, MHV y MVM y establecer que las mismas tengan un adecuado título viral.

### **2.1.2. Materiales**

#### **VIRUS SENDAI**

- La cepa ATCC VR- 105 de virus Sendai (Parainfluenza 1) obtenida desde el ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, EEUU) se utilizó como antígeno original para su amplificación en huéspedes adecuados.

- La línea celular LLCMK<sub>2</sub> (ATCC, CCL7, F11348), células de riñón de mono *Macaca mulatta* (Mono Rhesus) en monocapa, fue utilizada entre los pasajes 301 y 324 en todos los experimentos de replicación del virus Sendai.
- Gallos SPF se usaron para la extracción de sangre y posterior separación de la fracción de glóbulos rojos para las pruebas de hemoaglutinación. Estos animales fueron obtenidos por gentileza del Dr. Raúl Novella, Laboratorios INMUNER S.A.I.C, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.
- Se utilizaron huevos de pollo de diez días de embrionados (HE), provistos por el Laboratorio INMUNER, obtenidos de un criadero SPF, condición lograda por inmunización.

#### **VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV)**

- La cepa MHV 1 (Parkes), ATCC VR-261, aislada en 1950, a partir de hígado y riñón de un ratón enfermo se utilizó como antígeno original para su amplificación en huéspedes adecuados.
- La línea L929 (ATCC NCTC CI 929), monocapa epitelial de tejido conectivo de ratón, fue utilizada entre los pasajes 572 al 592 en todos los ensayos de replicación del virus MHV.

#### **VIRUS DIMINUTO O MINUTO DE RATON (MVM)**

- La cepa viral MVMp (ATCC VR-1346) se utilizó como antígeno original para su amplificación en huéspedes adecuados.
- La línea celular L 929 (ATCC, NCTC clone 929), de células de tejido conectivo de ratón en monocapa fue utilizada entre los pasajes 573 y 591, en todos los ensayos de replicación del virus MVM.

Las líneas celulares en las que se replicaron los tres agentes virales (Sendai, MHV y MVM) fueron certificadas en su identidad y esterilidad para bacterias, virus, hongos y micoplasma, en el nivel de ST. Las células fueron crecidas en Eagle's Minimal Essential Médium con sales de Earle (EMEM), suplementado con aminoácidos no esenciales (NEAA), 2% de suero

fetal bovino (SFB) inactivado por calor a 56 °C durante 30 minutos, 293 µg/ mL de L-glut 2mM, 100 UI de Penicilina/mL y 100 µg/ mL de estreptomicina.

Un resumen de la metodología para obtener las SM y ST de cada uno de tres virus en estudio es presentado en la Tabla 2.1

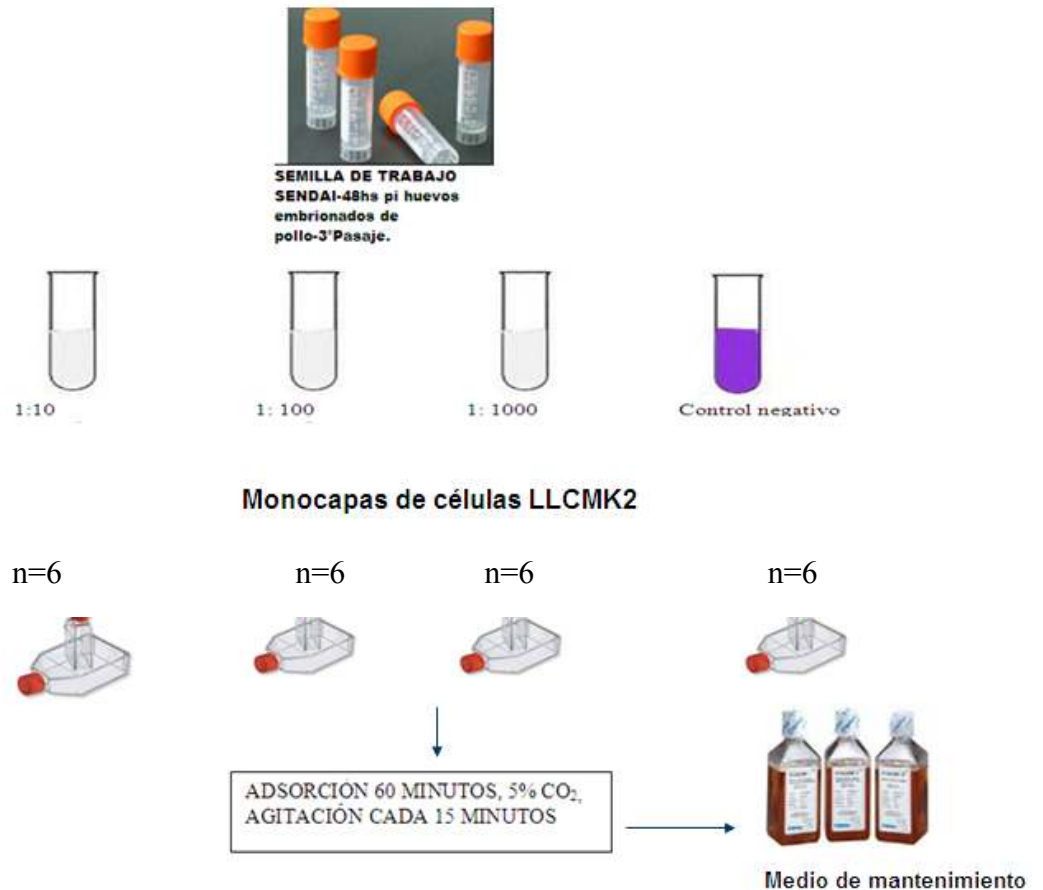
**TABLA 2.1.** Resumen de las condiciones y materiales empleados para obtener las SM y ST de los virus Sendai, MHV y MVM

Semillas	Características	Virus Sendai	Virus MHV	Virus MVM
<b>Semilla Maestra</b>	Origen del inóculo	Cepa Parainfluenza 1 (Sendai) ATCC VR-105+ 1 pasaje en HE	~DICT <sub>50</sub> /mL 10 <sup>6</sup> /ml de la cepa MHV 1 (Parkes, ATCC VR-261)+ 1 pasaje en células	~DICT <sub>50</sub> /mL 10 <sup>6</sup> /ml de la cepa MVMp, ATCC VR-1346
	Sustrato	Huevos SPF con 10 días de embrionados de pollo	L929 (ATCC NCTC CI 929)	L929 (ATCC NCTC CI 929)
	Día de cosecha pi.	48 hs	120 hs	48 hs
	N° de pasajes	<b>2 pasajes en HE</b>	<b>2 pasajes en células</b>	<b>1 pasaje en células</b>
<b>Semilla de Trabajo</b>	Origen del inóculo	Semilla Maestra	Semilla Maestra	Semilla Maestra
	Sustrato	Huevos SPF con 10 días de embrionados de pollo	L929	L929
	Día de cosecha pi.	48 hs	120 hs	48 hs
	N° de pasajes	<b>3 pasajes en HE</b>	<b>3 pasajes en células</b>	<b>2 pasajes en células</b>

### 2.1.3 Métodos

#### ◆ Obtención de la curva de replicación del virus Sendai

Para definir el momento óptimo de cosecha de virus Sendai, a utilizarse como antígeno en la implementación de una prueba de IFI y un ELISA para este agente, se inocularon diluciones desde 1:10 a 1:1000 de virus Sendai (Semilla de Trabajo) en monocapas de células LLCMK<sub>2</sub>. En cada experimento se utilizó un control negativo inoculado con el medio de mantenimiento de las células. Todas las inoculaciones se realizaron por seis réplicas (Figura 2.1). Luego de una adsorción de 60 minutos, los cultivos fueron mantenidos con medio conteniendo 5% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos.

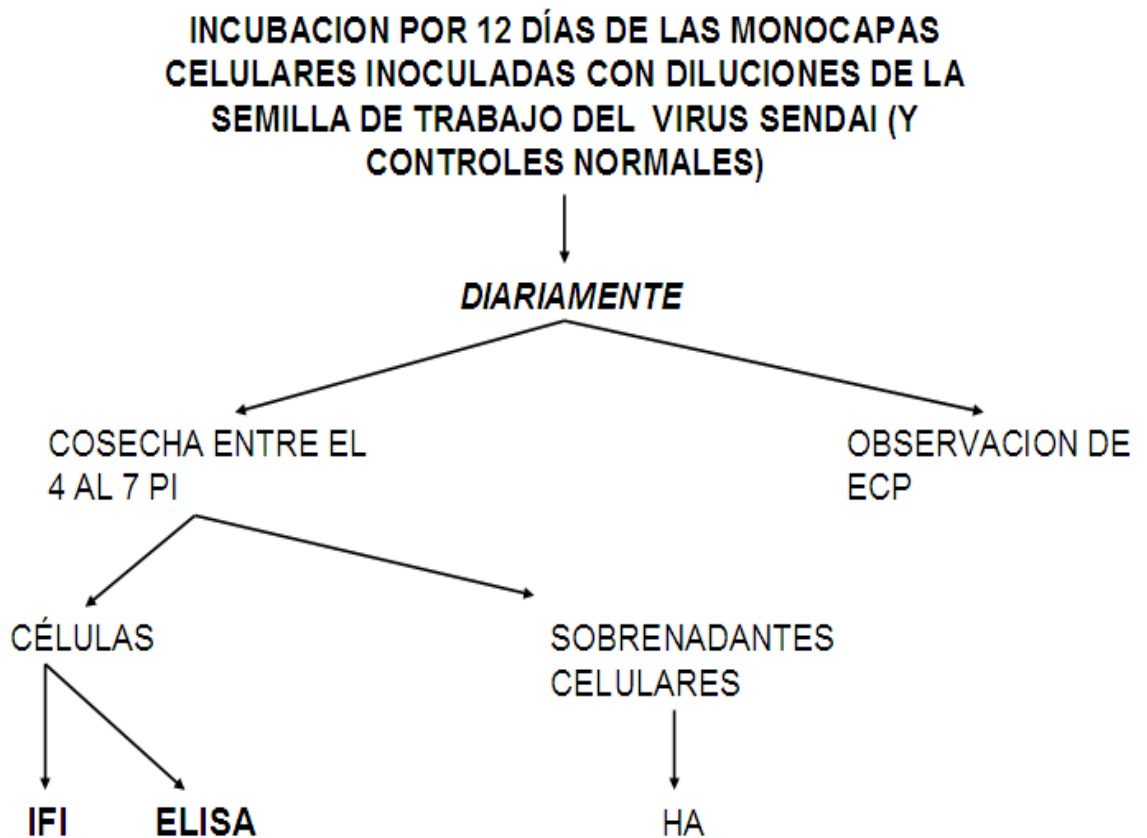


**Figura 2.1.** Esquema de inoculación de las monocapas de células LLCMK<sub>2</sub> con diferentes diluciones de la ST del virus Sendai.

Se buscó el día óptimo de cosecha viral mediante la obtención de muestras diarias de células infectadas y los sobrenadantes respectivos entre el

4° y el 12° día pi, se realizó un seguimiento por observación microscópica de ECP, el que se visualizó por la formación de sincicios (Células gigantes multinucleadas) y cuerpos de inclusión en el citoplasma eosinófilo.

Como se esquematiza en la Figura 2.2, se cosecharon simultáneamente sobrenadantes celulares y células infectadas y lo mismo se hizo con los cultivos control en los días 4 a 7 pi. Los sobrenadantes celulares fueron titulados por HA mientras que las células fueron adheridas a portaobjetos de vidrio para poder evaluar el porcentaje de células infectadas, al incubar dichas células en contacto con los reactivos inmunes.



**Figura 2.2.** Protocolo utilizado para la evaluación de: a) la acción del virus Sendai sobre las células LLCMK<sub>2</sub> por observación de ECP, b) la titulación del virus en el sobrenadante celular (HA), c) las cosechas de células como posibles antígenos en las pruebas de IFI y ELISA.

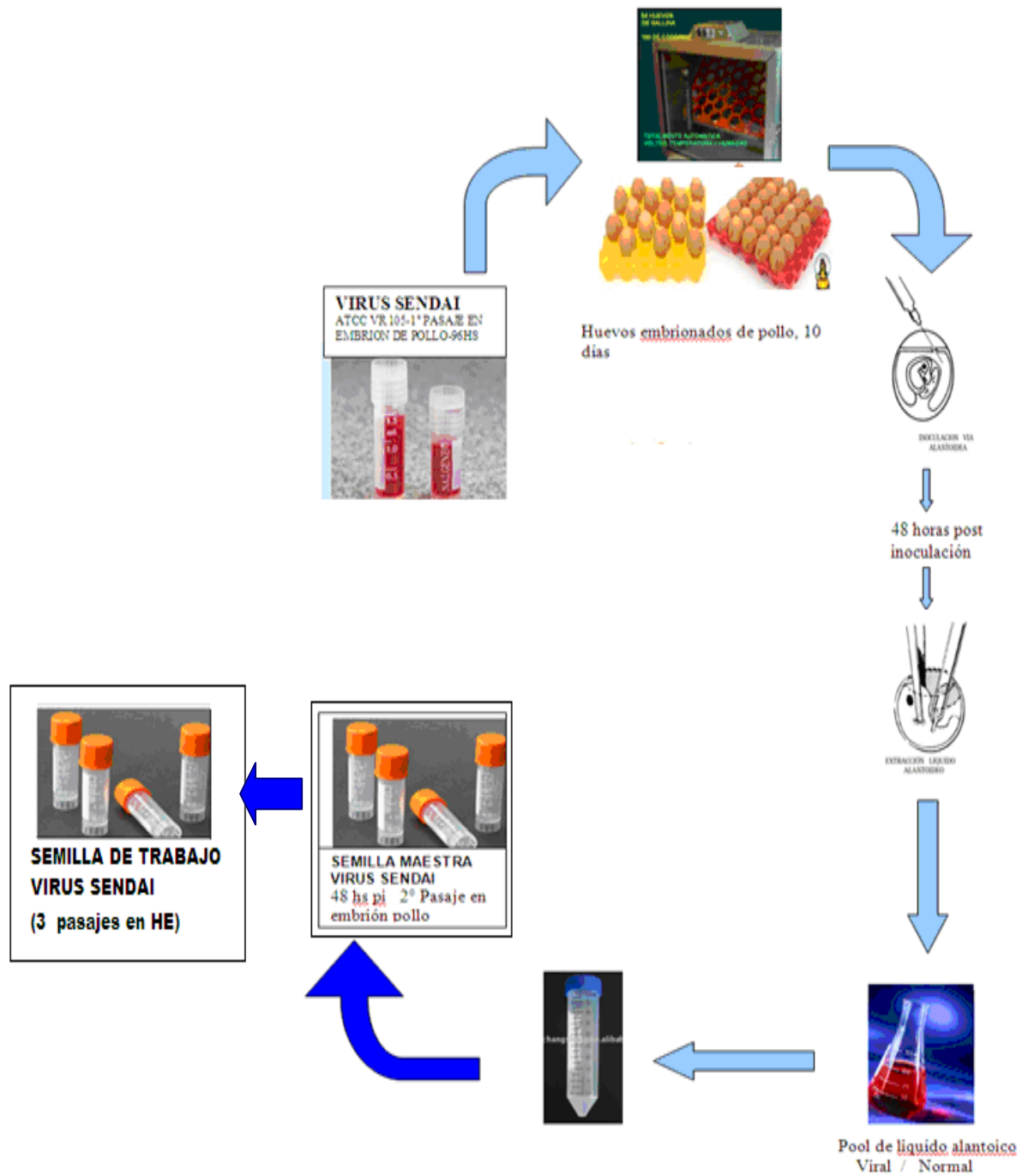
### **Obtención de las Semilla Maestra y de Trabajo del virus Sendai**

La SM y la ST del virus Sendai fueron obtenidas por inoculación de huevos embrionados de pollo SPF. Estos se mantuvieron durante diez días en la incubadora con volteo y control diario de temperatura (37°C) y humedad (35 %).

Los procedimientos realizados para la obtención de la SM y ST se esquematizan en la Figura 2.3. Previa descontaminación con alcohol 70 %, se perforó la cáscara y se inoculó en la cavidad alantoica 0.1 mL de Parainfluenza 1, Virus Sendai VR 105 con el 1° pasaje en embrión de pollo, cosechado a las 96 hs. Se selló el orificio con parafina y se incubó durante 48 horas a 37°C, 35 % de humedad sin volteo. A las 24 horas se practicó una ovoscopia exploratoria para evaluar la viabilidad de los embriones.

La cosecha de fluido alantoico se realizó con el agregado de amicacina (1g/L), sulfato de estreptomicina (2 g/L), nistatina (0.5 g/L), y penicilina (1000000UI/L). Las cosechas individuales se mezclaron para obtener dos lotes: 1) un lote de líquido alantoico obtenido de huevos embrionados vivos inoculados 2) líquido alantoico obtenido de huevos embrionados vivos no inoculados. Cada lote obtenido fue centrifugado a 4500 rpm, 30 minutos a 4°C y cada sobrenadante fue recogido en una botella. El sedimento fue reconstituido con PBS pH 7.4, sin calcio y sin magnesio, repitiéndose la centrifugación. El nuevo sobrenadante obtenido fue agregado a los anteriores. Enseguida, cada lote fue alicuotado en viales, a los que se rotuló y conservó a -70°C hasta su utilización. Estas cosechas, fueron tituladas y utilizadas como SM del virus Sendai y como Control Normal de la SM.

Con la metodología descrita, se realizó un nuevo pasaje de la SM, incorporándose nuevos controles normales, y el material cosechado se utilizó como ST del virus Sendai y su correspondiente Control Normal de la ST.



**FIGURA 2.3.** Esquema para la obtención de la SM y ST del virus Sendai a partir de la inoculación de HE, SPF de pollo. El mismo procedimiento, pero con un pasaje adicional en HE, se siguió para generar la ST para el virus Sendai.



## **Titulación del contenido viral en la SM y ST del virus Sendai**

- **Prueba de hemoaglutinación**

Las pruebas de aglutinación (HA) se realizaron según los métodos descriptos por Jacobs y Lunde, 1957, con modificaciones.

Los tests fueron realizados en placas con fondo en U. Las pruebas se leyeron a simple vista o con el microscopio óptico (Jacobs and Lunde, 1957; Behymer et al., 1973).

Se empleó el virus de la Enfermedad de Newcastle como control positivo. El mismo pertenece al serotipo paramixovirus aviar del tipo 1 (APMV-1). Es miembro del género Avulavirus en la familia Paramyxoviridae, cepa La Sota y fue obtenido por gentileza del Dr. Raúl Novella de los Laboratorios INMUNER S.A.I.C, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina. Su título por hemoaglutinación fue (HA) 1:64.

Como control negativo se utilizó una suspensión al 1% de una solución de glóbulos rojos de pollo.

Patrón de Hemaglutinación:

- No Hemaglutinación: Los glóbulos rojos sedimentan en el fondo del pozo observándose como un botón.
- Hemaglutinación completa: Los glóbulos dan una capa fina y bien distribuida en el pozo. Se lee como punto final. El título HA del virus fue expresado como la inversa de la última dilución en que se observó hemoaglutinación, ésta lectura es equivalente a una unidad hemoaglutinante (UHA).

- **Dosis infectiva 50 en cultivo de tejido ( DICT<sub>50</sub> ) para el virus Sendai**

Se tituló la ST del virus en base a la observación del efecto citopatogénico (ECP) y se evaluó mediante la adjudicación de una a cuatro cruces (menor a mayor efecto respectivamente). Los cultivos fueron observados durante varios días hasta no registrarse cambios por 48 hs.

Se calculó la DICT<sub>50</sub> por el método de Reed y Muench (1938).

#### ♦ **Obtención de la curva de replicación del virus MHV**

Se realizaron una serie de pruebas preliminares para estudiar las condiciones y características del material viral original para poder establecer una SM y ST a partir de la cual se pudieran realizar todos los experimentos.

Tomando como referencia la bibliografía y los aportes de científicos del bioterio de Cecal de FIOCRUZ (Brasil) se comenzó con la titulación y determinación del la  $DL_{50}$  en rrr. Estos animales responden con letalidad dentro de las primeras 72 horas de vida.

Con el conocimiento de la acción del virus MHV sobre los animales y teniendo presente el cumplimiento de las “3R: refinamiento, reducción y reemplazo”(Rowell,1986; Katahira,2001) se procedió a evaluar la acción del virus en las células y en el sobrenadante celular de la SM y la ST.

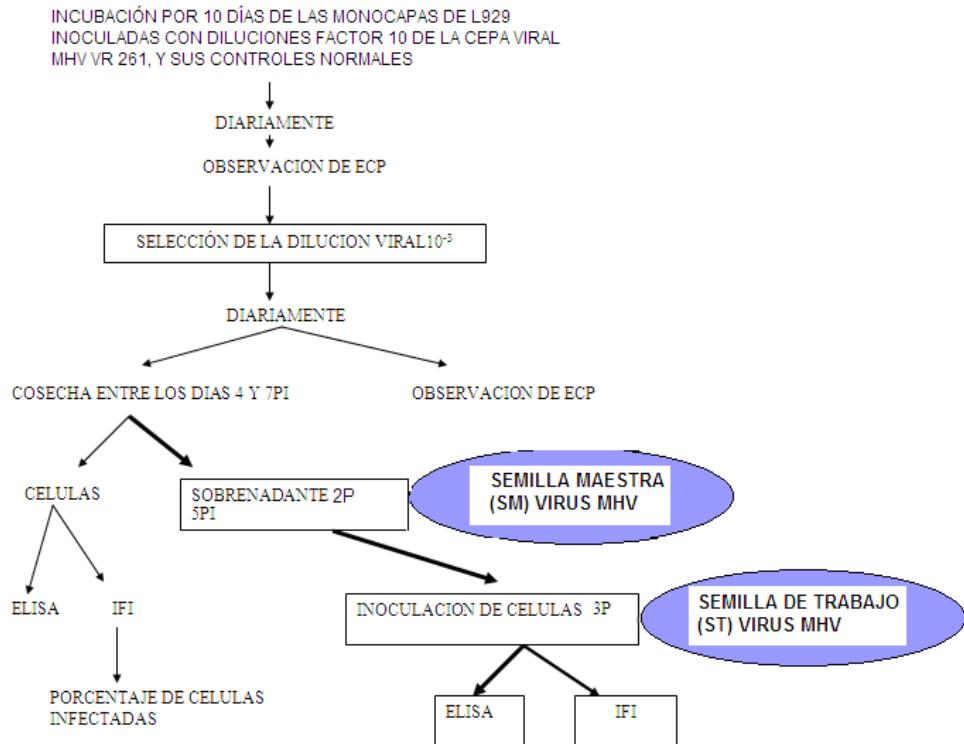
Se evaluó el efecto del virus sobre las células por observación del ECP mediante la adjudicación de una a cuatro cruces y se obtuvo el título por el método de Reed y Muench (1938).

Por otro lado, para definir el momento óptimo de cosecha del antígeno a utilizar en la implementación de una prueba de IFI y un ELISA, para el virus MHV, se inocularon diluciones factor 10 del virus MHV en monocapas de células L 929 con un 60% de confluencia. En cada experimento se utilizó un control negativo inoculado con medio de mantenimiento de células. Todas las inoculaciones se realizaron por diez réplicas.

Luego de una adsorción de 60 minutos a 37 °C, los cultivos fueron mantenidos con medio conteniendo 5% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos.

Se determinó el día óptimo de cosecha entre el 1° y el 7° día pi por observación de ECP, buscándose la aparición de células gigantes multinucleadas, y se procedió a realizar la cosecha diaria de sobrenadantes y células en los días 4 a 7pi según se muestra en la Figura 2.4.

Los sobrenadantes celulares fueron titulados por observación del ECP del virus en células L929 y expresado en  $DICT_{50}$  y por inoculación en rrr y posterior cálculo de la  $DL_{50}$ .

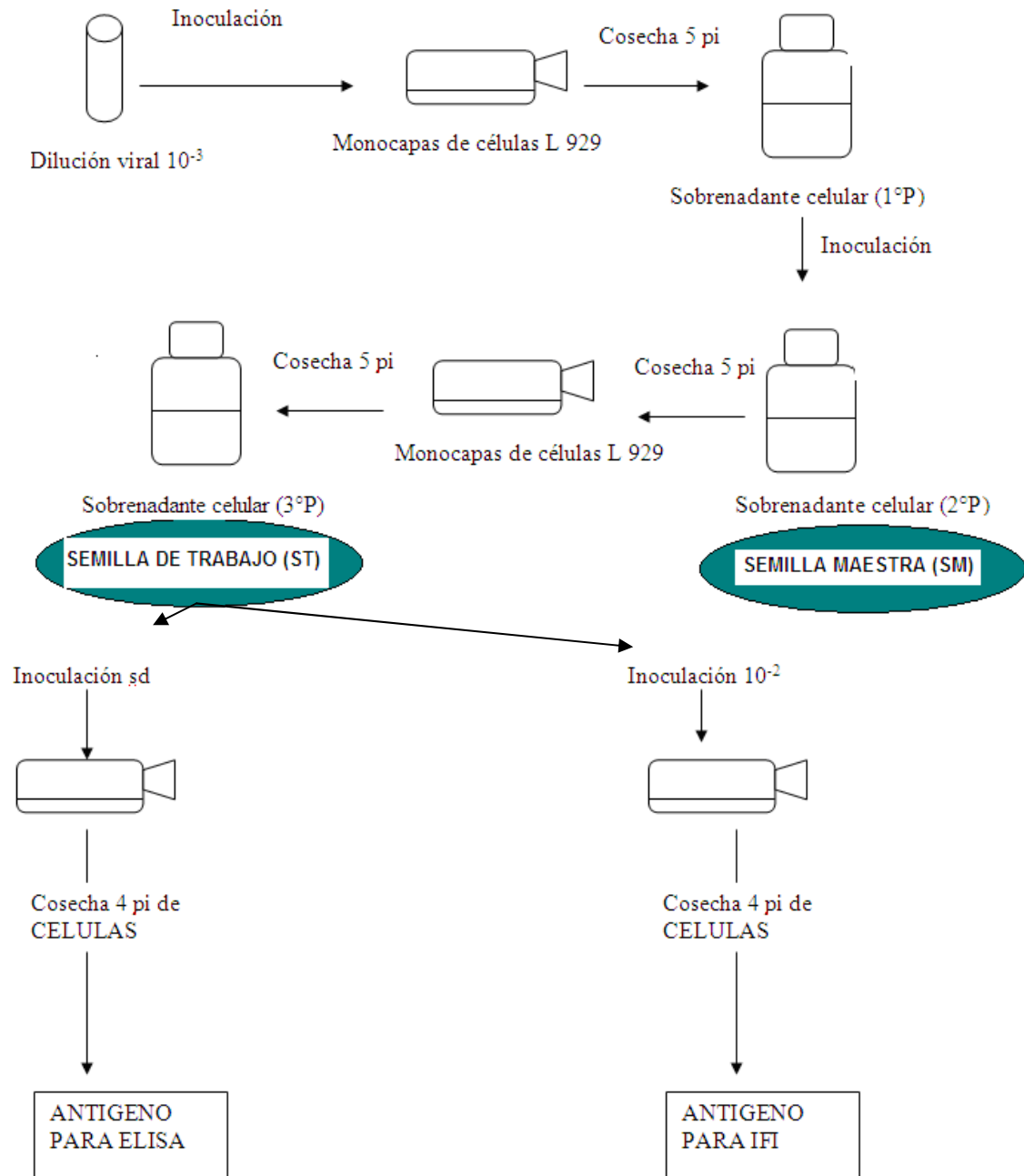


**FIGURA 2.4.** Protocolo utilizado para la evaluación de la acción de distintas diluciones del virus MHV VR 261 sobre las monocapas de células L929 en diferentes días pi por observación de ECP, así como la obtención de la SM y ST para las pruebas de ELISA e IFI.

### Obtención de la SM y ST del virus MHV

A partir del vial original de la cepa MHV 1 ( $10^{8,17}$  DICT<sub>50</sub> / mL) se hizo una dilución  $10^{-3}$  con E.MEM, 5% de SFB, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina + estreptomicina. Se inocularon monocapas de células L929 y el día 5 pi se cosecharon los sobrenadantes, Se realizó un segundo pasaje en células y los sobrenadantes reunidos en un pool, constituyeron la SM del virus MHV. Se fraccionó, rotuló y se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, la SM del virus MHV fue inoculada sin diluir (s/d) en monocapas de células L929 y mantenidas en E.MEM, 5% de SFB, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina + estreptomicina a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . El sobrenadante cosechado al día 5 pi fue inoculado nuevamente en monocapas de células L929. Por lo tanto el tercer pasaje en células del virus MHV constituyó la ST del virus MHV utilizada en todos los experimentos. Esta ST fraccionada en viales de 5 mL, y rotulados adecuadamente fue almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

En la Figura 2.5 se resume el protocolo utilizado para la obtención de las SM y ST de MHV.



**FIGURA 2.5.** Protocolo utilizado para la obtención de la SM y ST del virus MHV VR 261 sobre las monocapas de células L 929 y para las pruebas de ELISA e IFI.

#### ◆ **Titulación del contenido viral de la SM y ST del virus MHV**

Las Semillas fueron tituladas por dos metodologías diferentes:

1- inoculación de ratones recién nacidos, tomando como punto final la letalidad y calculando la DL<sub>50</sub> por el método de Reed y Muench (1938)

2- por observación del efecto citopatogénico (ECP) en células.

Se realizaron diluciones factor 10 de la semilla a titular, utilizando como diluyente Buffer fosfato, 1% de penicilina y estreptomicina y 10% de albúmina bovina.

Se inocularon grupos de 8 ratones en cada dilución (y sus correspondientes controles negativos) y se los observó diariamente, registrándose los animales muertos.

Se calculó la DL<sub>50</sub>, descartando los animales muertos durante las primeras 24 horas a los efectos del cálculo del título, dado que la muerte temprana es considerada no específica, producida por el trauma de las inoculaciones.

#### ◆ **Obtención de la curva de replicación del virus MVM**

Para definir el momento óptimo de cosecha del antígeno a utilizarse en la implementación de una prueba de IFI y un ELISA, ambos para la detección del virus MVM, se inocularon diluciones factor 10 desde desde  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  del virus, en monocapas de células L 929 con un 80% de confluencia. En cada experimento se utilizó un control negativo inoculado con medio de mantenimiento de células. Todas las inoculaciones se realizaron por siete réplicas.

Luego de una adsorción de 90 minutos a 37°C, los cultivos fueron mantenidos con medio conteniendo 5% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.

Se buscó el día óptimo de cosecha entre el 1° y el 7° día pi por observación microscópica del ECP.

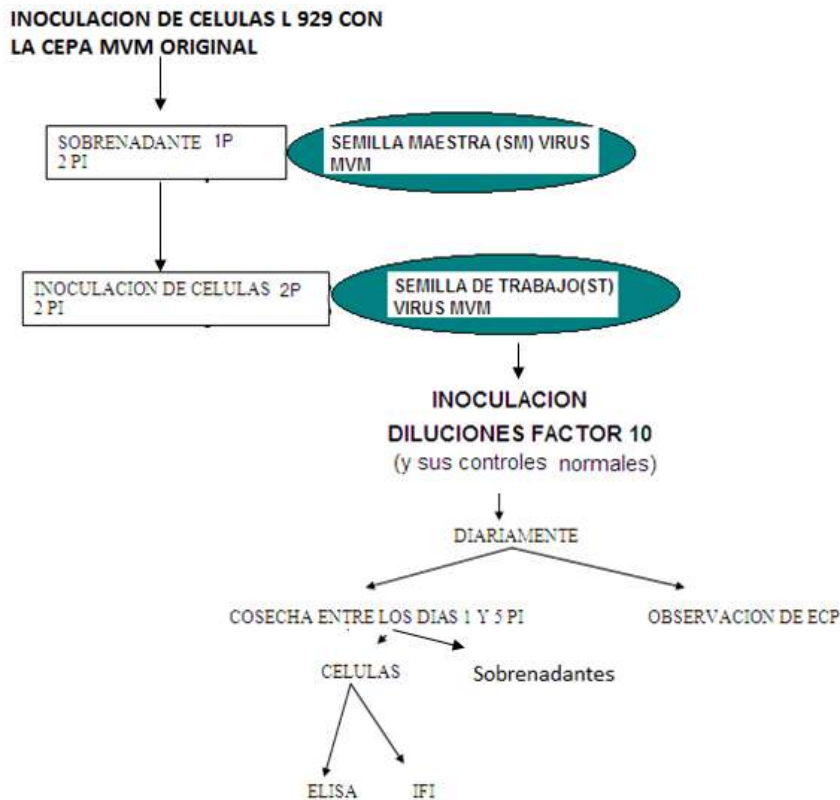
### Obtención de la SM y ST del virus MVM

El título se obtuvo en base a la observación del ECP mediante la adjudicación de 1 a 4 cruces y se calculó la  $DICT_{50}$  por el método de Reed y Muench (1938).

A partir del vial original de la cepa ATCC VR-1346 se realizó una dilución 1:100 con E.MEM, 5% de SFB, 1% de L-glutamina, 1% penicilina + estreptomicina. Se inocularon monocapas de células L929. Al día 2 pi se cosecharon los sobrenadantes (primer pasaje en células) para obtener la Semilla Maestra del virus. Se fraccionó, rotuló y conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

La Semilla Maestra se inoculó en células L 929 con el medio E.MEM ,5% de SFB, 1% de L-glutamina ,1% penicilina + estreptomicina, para obtener la ST. Se cosechó el sobrenadante del día 2 pi. Se fraccionó, rotuló y se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

En la Figura 2.6 se observa un resumen del protocolo seguido para la obtención de las SM y ST para el virus MVM.



**FIGURA 2.6** Protocolo utilizado para la evaluación de la acción de distintas diluciones del virus MVMp VR 1346 sobre monocapas de células L929, en diferentes días pi por observación de ECP, obtención de la SM, ST y para las pruebas de ELISA e IFI.

◆ **Titulación del contenido viral de la SM y ST del virus MVM**

Las Semillas fueron tituladas por observación del ECP del virus en diferentes días, sobre las monocapas de células L929, el que se evidenció por un redondeamiento gradual de las células y posterior desprendimiento de la monocapa celular. Se calculó la  $DICT_{50}$  por el método de Reed y Muench (1938)

## **2.2. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE REACTIVOS INMUNES: SUEROS Y LIQUIDOS ASCITICOS.**

El sistema Inmune surge en la evolución, como un conjunto de mecanismos para defender al organismo (lo “propio”) de infecciones (lo “extraño”).

Se denomina inmunógeno a toda sustancia capaz de inducir una respuesta inmune. La respuesta inmune humoral con anticuerpos específicos de los isotipos IgM e IgG alcanzan un nivel mensurable alrededor de una semana después de la infección, mientras que los títulos de IgG se mantienen elevados durante mucho tiempo. Los títulos de IgA también resultan significativamente altos en los ganglios linfáticos y en el bazo después de los días 10 y 14 post infección, respectivamente (Faisca and Desmecht,2007) .

Como ocurre en todos los mamíferos, la respuesta inmune en los roedores se detecta por la presencia de anticuerpos que persisten en circulación durante periodos variables de tiempo (Ito,1976; Fujiwara et al.,1979; Grandien et al.,1985; Magaly de Garmendia,2001) y la detección de anticuerpos específicos es una herramienta eficaz para verificar que un individuo y/o una población han detenido contacto con un inmunógeno inductor.

En el desarrollo de pruebas para detectar y medir la respuesta inmune a un inmunógeno resulta fundamental contar con antisueros específicos, de adecuado título, en preparaciones stock para la utilización de los mismos como estándares internos en los ensayos. Para lograr este fin, es imprescindible definir distintas variables como: la selección del modelo animal, el inmunógeno, la vía de inoculación, el número de inoculaciones, la utilización de adyuvantes y el momento de la seroconversión. La búsqueda de un esquema de inmunización implica una serie de experimentos preliminares de prueba y error en los que se busca con el menor número de estimulaciones, la respuesta inmune más específica, con el mayor título, en una muestra de fácil obtención y en volumen suficiente.

El modelo animal seleccionado en este trabajo para la obtención de sueros y líquidos ascíticos inmunes y normales fue el ratón, por las razones previamente mencionadas en el capítulo 1. De los datos recopilados en la búsqueda bibliográfica se probaron varios esquemas de inmunizaciones. Se



modificó la concentración de inmunógeno (virus), se empleó la vía intranasal para las inoculaciones de los distintos virus y se aplicó una única inoculación.

En ningún caso se utilizó un adyuvante. La cantidad del inmunógeno que se inoculó al ratón es de vital importancia, ya que dosis pequeñas o muy elevadas inducen tolerancia o respuestas alteradas. Por otro lado, un mayor número de inmunizaciones no necesariamente se traduce en un aumento en la cantidad de anticuerpos, ya que una de las características de la respuesta inmune adaptativa es la autolimitación de las moléculas.

Los ratones adultos (RA) inoculados por vía intranasal (IN) con los virus Sendai, MHV y MVM desarrollaron anticuerpos específicos en suero luego del día 21 pi de una dosis única de virus. Los sueros inmunes obtenidos resultaron útiles como controles positivos en las pruebas de ELISA e IFI, pero la limitación cuando se inmunizan ratones, es el pequeño volumen de suero que se puede obtener de cada animal sangrado a blanco. Frente a la necesidad de tener un reactivo inmune de mayor volumen, se generó líquido ascítico inmune agregando al esquema de inmunización una inoculación del Sarcoma 180 por vía intraperitoneal (IP). Esta línea tumoral generadora de líquido ascítico en ratones, tiene la particularidad que debe ser mantenida a través de pasajes en ratones. En el desarrollo del trabajo, luego del tercer pasaje en los ratones, el líquido ascítico normal fue transferido a un ratón inmune. De esta manera se puede extraer 10 mL de ascitis por cada punción intraperitoneal y repetir esta extracción dentro de los 5 días siguientes, mientras que en una extracción de sangre a blanco en un RA puede obtenerse en promedio 150  $\mu$ L de suero.

### **2.2.1 Objetivo**

Generar un reactivo inmune (suero y/o líquido ascítico inmune) en ratón para ser empleado como control positivo estándar en las pruebas de ELISA e IFI.

## **2.2.2 Materiales y métodos**

### **Ratones**

Ratones albinos suizos *Mus musculus* exocriados, libres de patógenos específicos (SPF), cepa CD 1. Estos animales son criados bajo barreras de bioseguridad controladas y monitoreados microbiológicamente para certificar su estado sanitario en el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Julio I. Maiztegui” y fueron certificados como libres de patógenos específicos al momento de su utilización. Se emplearon adultos de 45 días para la obtención de sueros y ascitis inmunes.

Todos los animales utilizados en este trabajo fueron criados, controlados y experimentalmente manejados según las recomendaciones de la Buenas Prácticas en el Uso de Animales de Laboratorio (T Nevalainen ; Parker et al.,1978; Rottinghaus et al.,1986; Waggie,1994; Nicklas et al.,2002; Croft,2004).

### **Sustrato celular**

Para la obtención de líquido ascítico inmune y normal se empleó la línea tumoral Sarcoma 180 (ATCC, TIB 66). Esta línea celular tiene la particularidad que debe ser mantenida mediante sucesivos pasajes por ratones, en los que se genera volúmenes importantes de líquido ascítico. Cuando el Sarcoma 180 es inoculado en animales inmunizados, la ascitis generada contiene también los anticuerpos buscados. Por ello, la cosecha de líquidos ascíticos inmunes representa una buena alternativa para incrementar el volumen de reactivo inmune obtenido de cada animal.

### **Inoculación intranasal (IN) de los virus Sendai, MHV y MVM**

Los RA SPF fueron anestesiados con una solución de 50 mg/mL de ketamina y 20 mg/ mL de clorhidrato de xilazina. El roedor fue sujetado por la nuca con las fosas nasales verticalmente hacia arriba. Luego se administró por vía IN diferentes diluciones del virus correspondiente. El virus fue depositado en pequeñas gotitas en ambas fosas nasales mediante una pipeta automática

cuyo orificio dispensador fue mantenido alrededor de 1 mm por encima de las fosas nasales.

### **Inoculación intraperitoneal (IP) de Sarcoma 180 en ratones**

Para inocular Sarcoma 180 vía IP se inmovilizó el animal tomándolo por la nuca con los dedos pulgar e índice y se sujetó la cola con el dedo meñique. Con la cabeza orientada hacia abajo se le inyectó 0.3 mL de una dilución 1:10 del Sarcoma 180 en la cavidad peritoneal a través de la pared abdominal. Entre la segunda y tercera semana pi, los ratones generaron líquido ascítico normal.

Esta técnica ha sido detalladamente descrita para ratas por Waynforth y Flecknell (1992).

### **Esquemas de inmunización de ratones**

#### **VIRUS SENDAI**

##### **Obtención de sueros anti-Sendai**

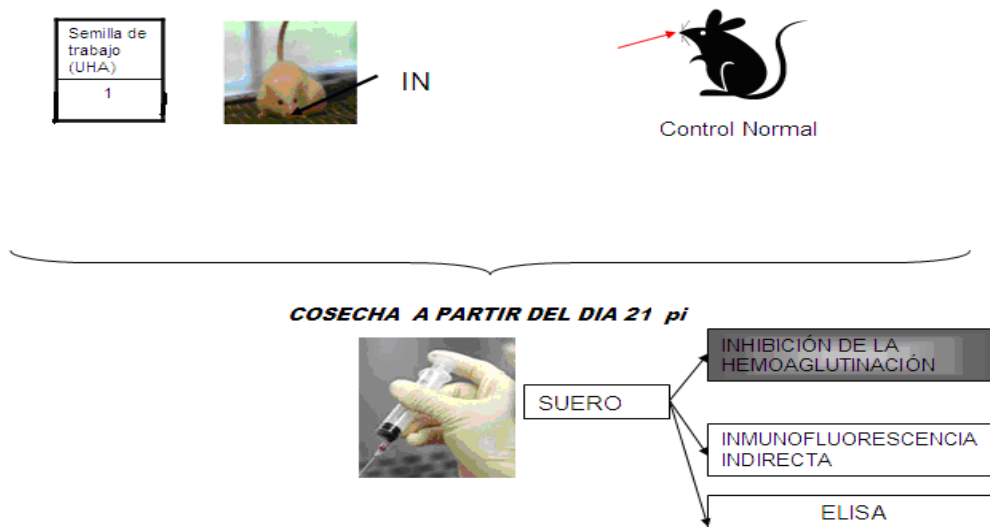
En la Tabla 2.2 y en la Figura 2.7 se muestran los diferentes esquemas de inmunización de ratones con virus Sendai, mediante la utilización de diferentes concentraciones, dosis y vías de inoculación del virus. Se utilizaron cinco grupos de cinco ratones en cada ensayo.

En el día 21 post inoculación, los animales fueron anestesiados y sangrados por punción intracardíaca. Los sueros individuales fueron separados, titulados por IHA, fraccionados y conservados a – 40 °C hasta su procesamiento por ELISA e IFI.

**TABLA 2.2.** Esquemas de inmunización con virus Sendai (antígeno) en ratones para la obtención de suero inmune anti Sendai

Unidades hemoaglutinantes inoculadas en el día 0 (1 UHA= 4096)	N° de inoculaciones		Volumen inoculado(ml)	Vía de inoculación
1	1		0.1	IN
0.10	1		0.1	IN
0.01	1		0.1	IN
4	1		0.1	IN
1	1		0.1	IP
1	3 *		0.1	IN

\*Las tres inoculaciones se hicieron en intervalos de siete días.



**FIGURA 2.7** Esquema de inmunización con el virus Sendai en RA. Los sueros de los ratones inoculados con 1UHA de la ST del virus Sendai y los controles normales

### Obtención de líquidos ascíticos normales

Se inocularon RA por vía IP con la dilución 1/10 del Sarcoma 180. Luego de tres pasajes consecutivos del líquido ascítico conteniendo células del Sarcoma

180 en RA, se extrajo el líquido ascítico normal de cada ratón y se realizó un pool.

### Obtención de líquidos ascíticos inmunes anti Sendai

Se inmunizaron RA con el esquema anteriormente descrito y el día 21 se inyectó 0.3 mL de una dilución 1:10 de líquido ascítico normal por vía IP (obtenido luego de haber realizado tres pasajes en RA), previa obtención de suero para tener certeza del estado inmune. En los días posteriores se extrajo ascitis de los ratones inmunizados y de los controles inoculados con diluyente. Se utilizaron tres grupos de cinco ratones en cada ensayo.

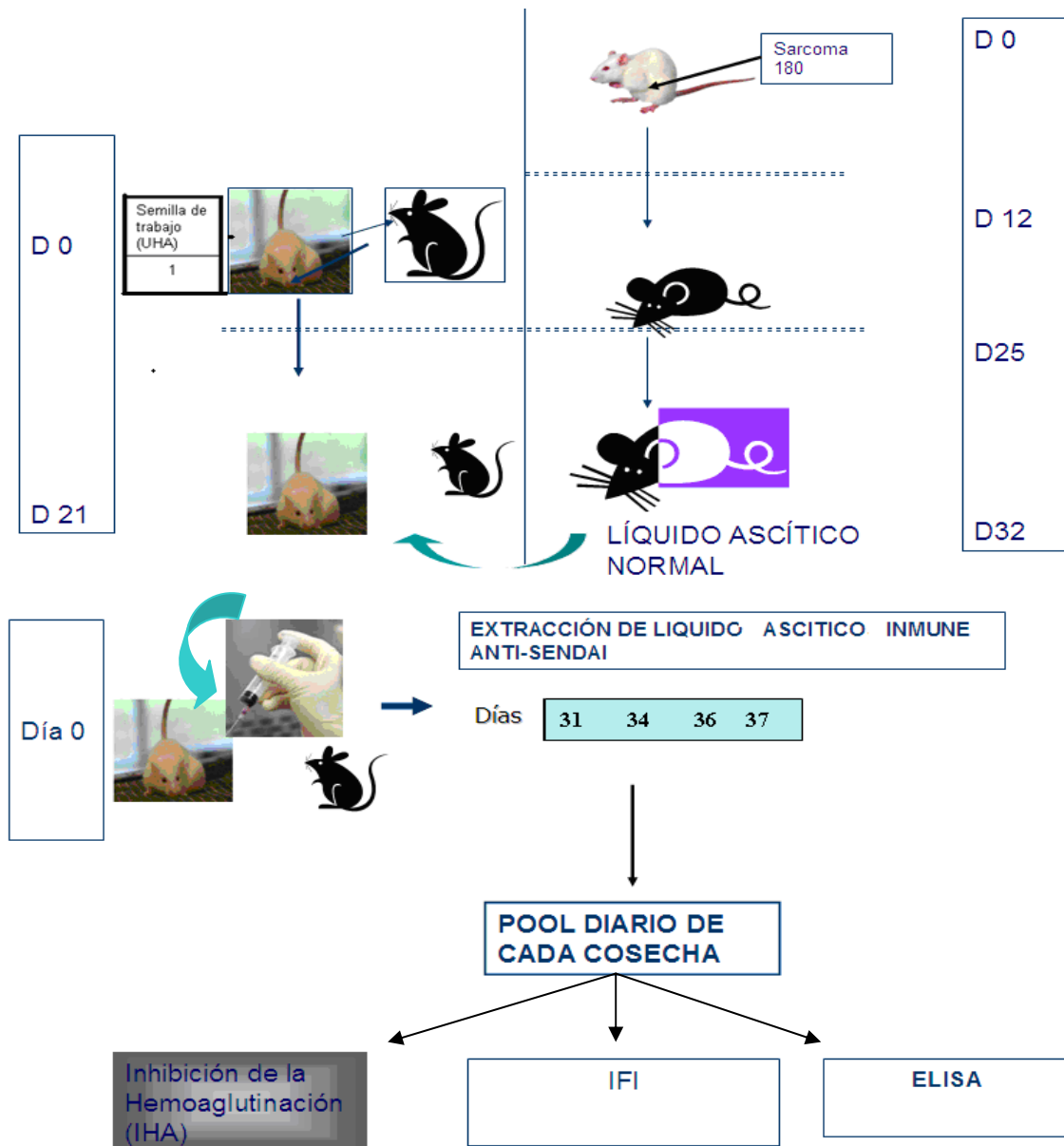
En la Tabla 2.3 se resume el procedimiento de inmunización de ratones con virus Sendai para la obtención de líquido ascítico inmune específico.

**TABLA 2.3.** Esquemas de inmunización con virus Sendai (antígeno) en ratones para la obtención de ascitis inmunes específicas

Día 0	Día 21	Día 31	Día 34	Día 36	Día 37
0.02 ml de Ag vía IN 1 UHA	Se extrae suero . 0.3 ml de sarcoma 180 vía IP	Extracción	Extracción	Extracción	Extracción
0.02 ml de Ag vía IN 0.10 UHA	Se extrae suero . 0.3 ml de sarcoma 180 vía IP	Extracción	Extracción	Extracción	Extracción
0.02 ml de Ag vía IN 0.01 UHA	Se extrae suero . 0.3 ml de sarcoma 180 vía IP	Extracción	Extracción	Extracción	Extracción
0.02 ml de Ag vía IN 4UHA=1024	Se extrae suero . 0.3 ml de sarcoma 180 vía IP	Extracción	Extracción	Extracción	Extracción
0.02 ml de Ag vía IP 1UHA	Se extrae suero . 0.3 ml de sarcoma 180 vía IP	Extracción	Extracción	Extracción	Extracción

Varios de los sueros y líquidos ascíticos obtenidos fueron procesados inmediatamente por IHA y conservados para ser utilizados en las pruebas de ELISA e IFI. Se procesaron junto a los controles normales e inmunes respectivos para corroborar la presencia de anticuerpos y establecer su título.

En el procesamiento de las muestras se priorizó aquellas obtenidas por una única inoculación IN, ya que resultó la menos traumática para los ratones. Los sueros y líquidos ascíticos obtenidos por inoculación IP o el triple esquema de inoculación IN no se procesaron. En la Figura 2.8 se presenta el esquema para la obtención de los líquidos ascíticos normales y anti-Sendai.



**FIGURA 2.8.** Esquema de obtención de líquido ascítico normal e inmune.

## VIRUS MHV

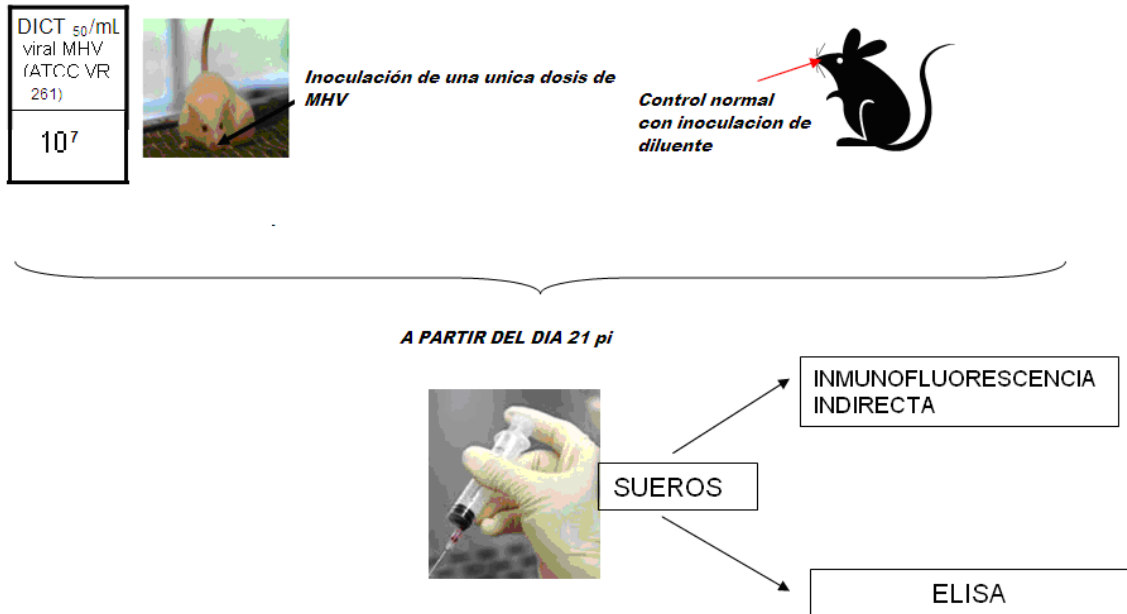
### Obtención de sueros inmunes específicos para el virus MHV

En la Tabla 2.4 y Figura 2.9 se resumen los esquemas de inoculaciones utilizados para la de inmunización de ratones con virus MHV (ATCC VR-261). Se utilizaron grupos de cinco RA en cada ensayo.

En el día 21 pi inoculación, los animales fueron anestesiados y sangrados por punción intracardiaca. Se colectaron las muestras de sueros individuales, se las fraccionó y conservó a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

**TABLA 2.4.** Esquemas de inoculación con virus MHV (antígeno) en ratones para la obtención de sueros inmunes específicos

Inóculo viral MHV ( ATCC VR-261) DICT <sub>50</sub> /mL	N° de inoculaciones	Volumen inoculado(mL)	Vía de inoculación
$10^7$	1	0.02	IN
$10^6$	1	0.02	IN
$10^5$	1	0.02	IN
$10^4$	1	0.02	IN
$10^3$	1	0.02	IN



**FIGURA 2.9.** Esquema de inoculación utilizado para la obtención de suero inmune específico. La  $DICT_{50} / mL 10^7$  del virus MHV se seleccionó para la inmunización de los ratones.

### Obtención de líquidos ascíticos inmunes específicos para MHV

Con la finalidad de obtener un reactivo inmune específico se utilizaron dos grupos de cinco ratones en cada ensayo. Se obtuvo una muestra de suero el día 21 post inoculación para corroborar la seroconversión. Posteriormente se los inyectó con una dilución 1:10 de líquido ascítico normal obtenido del tercer pasaje en RA. A partir del día 32 pi se cosecharon los líquidos ascíticos por vía IP, se realizó un pool de los mismos. Se clarificó por centrifugación (15 minutos a 2500 rpm) y las muestras se conservaron a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

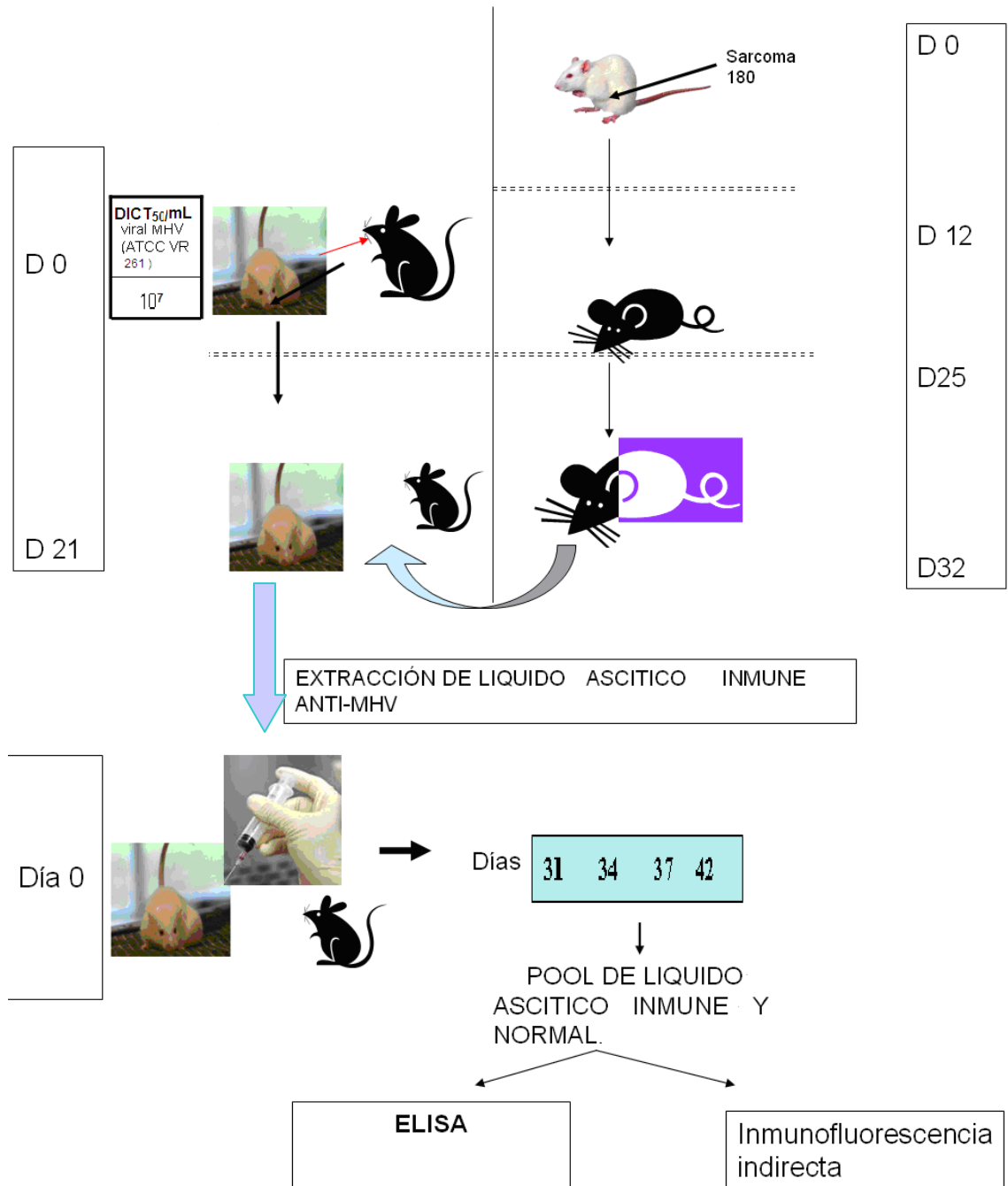
En la Tabla 2.5 se resume el procedimiento de inmunización de ratones con el virus MHV (ATCC VR-261) y la obtención de líquido ascítico.



**TABLA 2.5.** Esquemas de inoculación con el virus MHV (antígeno) en ratones para la obtención de ascitis inmunes específicas

Día 0	Día 21	Día 31	Día 34	Día 37	Día 42
0.02 mL de Ag $10^7$ DICT <sup>50</sup> / mL, via IN	Obtención de suero. Se transfiere 0.3 ml de ascitis normal (3 <sup>er</sup> pasaje) vía IP-	Extracción	Extracción	Extracción	Extracción
0.02 mL de Ag $10^6$ DICT <sup>50</sup> / mL, via IN	Obtención de suero. Se transfiere 0.3 ml de ascitis normal (3 <sup>er</sup> pasaje) vía IP-	Extracción	Extracción	Extracción	Extracción
0.02 mL de Ag $10^5$ DICT <sup>50</sup> / mL $10^5$ , via IN	Obtención de suero. Se transfiere 0.3 ml de ascitis normal (3 <sup>er</sup> pasaje) vía IP-	Extracción	Extracción	Extracción	Extracción

Todos los sueros y líquidos ascíticos obtenidos fueron conservados a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizados en las pruebas de ELISA e IFI. Se procesaron junto a los controles normales e inmunes respectivos para corroborar la presencia de anticuerpos y establecer su título. En la Figura 2.10 se presenta el esquema de obtención de los líquidos ascíticos normales e inmunes para MHV.



**FIGURA 2.10.** Esquema para la obtención de líquido ascítico inmune (anti-MHV) y normal en ratones adultos

## VIRUS MVM

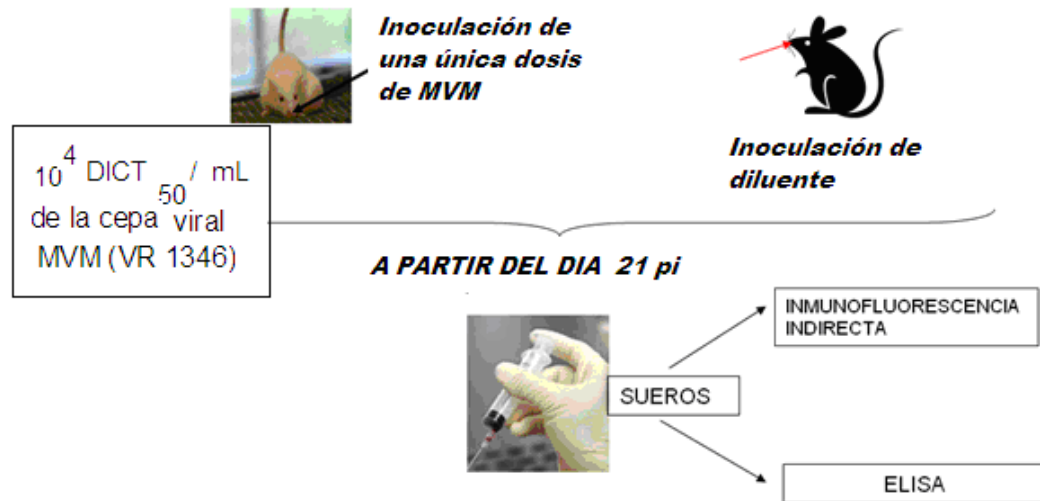
### Obtención de sueros inmunes

En la Tabla 2.6 y en la Figura 2.11 se resumen los esquemas de inmunización de ratones con virus MVM. Se utilizaron grupos de cinco ratones en cada ensayo.

En el día 21 post inoculación, los animales fueron anestesiados y sangrados por punción intracardíaca. Los sueros individuales fueron separados, fraccionados y conservados a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

**TABLA 2.6.** Esquemas de inoculación con virus MVM (antígeno) en ratones para la obtención de sueros inmunes específicos

Inóculo DICT <sub>50</sub> /mL	N° de inoculaciones	Volumen inoculado(ml)	Vía de inoculación
$10^4$ de la cepa viral MVM (VR 1346)	1	0.02	IN
$10^3$ de la cepa viral MVM (VR 1346)	1	0.02	IN
$10^6$ de la ST cosechada el día 2 pi	1	0.02	IN
$10^6$ de la ST cosechada el día 3 pi	1	0.02	IN
$10^6$ de la ST cosechada el día 5 pi	1	0.02	IN



**FIGURA 2.11.** Esquema para la obtención de suero inmune (anti-MVM) y normal en RA.

### Obtención de líquidos ascíticos inmunes específicos para MVM

Con la finalidad de obtener un reactivo inmune específico de mayor volumen que el suero inmune, el día 21 post inoculación del virus se les transfirió una dilución 1:5 de células de Sarcoma 180 en solución fisiológica.

En los días posteriores se extrajo ascitis por punción IP. Se utilizaron grupos de cinco ratones previamente anestesiados para el ensayo.

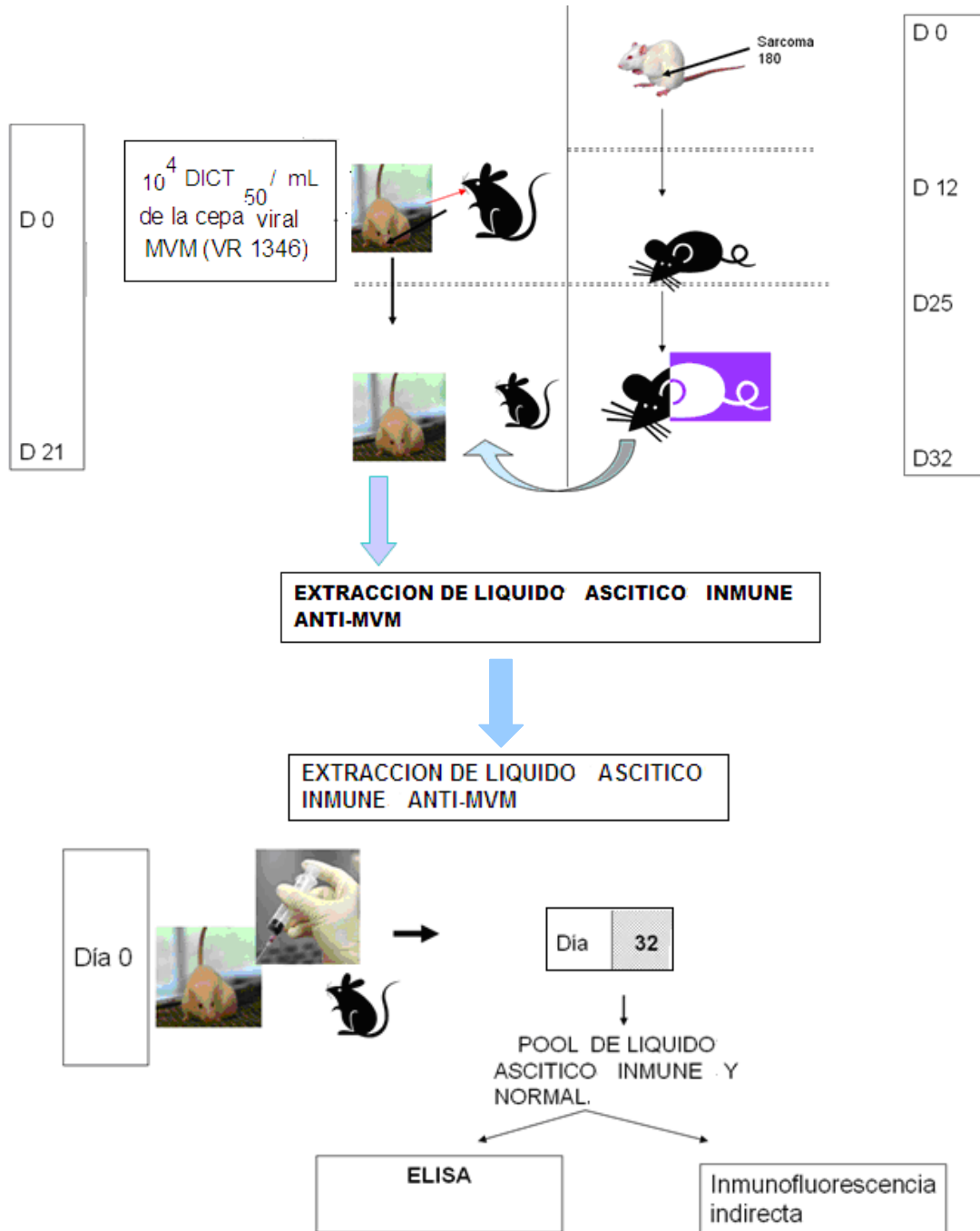
En la Tabla 2.7 se resume el procedimiento de inmunización de ratones con el virus MVM y la obtención de líquido ascítico.

**TABLA 2.7.** Esquemas de inoculación con el virus MVM (antígeno) en ratones para la obtención de ascitis inmunes específicas

Día 0 (inoculación viral)	Día 21	Día 32
0.02 mL de $10^4$ DICT <sub>50</sub> /mL del virus MVM via IN	Se transfiere 0.3 ml de sarcoma 180 via IP	Extracción de líquido ascítico
0.02 ml de la $10^3$ DICT <sub>50</sub> /mL del virus MVM via IN	Se transfiere 0.3 ml de sarcoma 180 via IP	Extracción de líquido ascítico
0.02 ml del sdte 5 pi, $10^2$ DICT <sub>50</sub> /mL vía IN	Se transfiere 0.3 ml de sarcoma 180 via IP	Extracción de líquido ascítico

Todos los sueros y líquidos ascíticos obtenidos fueron conservados para ser utilizados en las pruebas de ELISA e IFI. Se procesaron junto a los controles normales e inmunes respectivos para corroborar la presencia de

anticuerpos y establecer su título. En la Figura 2.12 se presenta el esquema para la obtención de los líquidos ascíticos normales e inmunes para MVM.

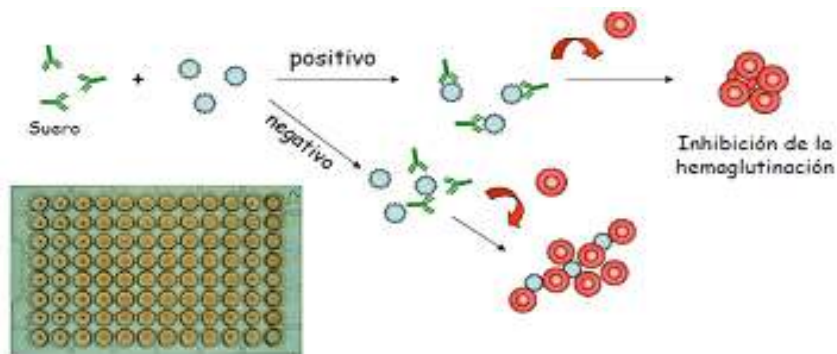


**FIGURA 2.12.** Esquema para la obtención de líquido ascítico inmune (anti-MVM) y normal en RA. Se seleccionó la inmunización de los ratones con  $10^4$  DICT<sub>50</sub>/mL del virus MVM

### Prueba de inhibición de la hemoaglutinación

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) se realizó según los métodos descritos por (Jacobs and Lunde,1957),con modificaciones (Figura 2.13).

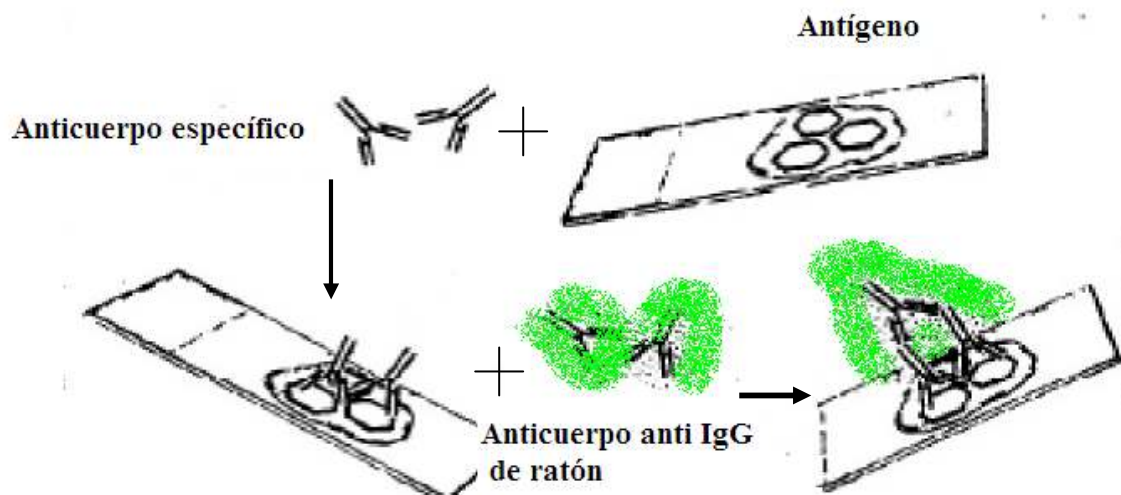
Los tests fueron realizados en placas con fondo en U. Para la IHA se utilizó 4 unidades hemoaglutinantes (UHA) de la ST del virus Sendai y una suspensión al 1 % de eritrocitos de pollo SPF. Las pruebas se leyeron a simple vista o con el microscopio óptico (Jacobs and Lunde,1957; Behymer et al.,1973).



**FIGURA 2.13.** Esquema del procedimiento de la prueba de IHA

### 2.3 DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE IFI PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS PARA LOS VIRUS SENDAI, MHV Y MVM

La inmunofluorescencia (IF) es una técnica serológica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos marcados con moléculas fluorescentes contra antígenos de superficie de células y tejidos. La fluorescencia es una propiedad de ciertas moléculas que, al ser irradiadas con energía electromagnética de longitud de onda adecuada, emiten radiación de longitud de onda característica permitiendo su cuantificación. Las moléculas de un colorante fluorescente absorben luz en una longitud de onda y convierten la luz absorbida de alta energía (longitud de onda más corta) en luz de menor energía (longitud de onda más larga). Cada fluorocromo tiene un espectro de emisión y excitación característico. Este mecanismo de marcación viene utilizándose durante décadas para revelar reacciones antígeno-anticuerpo específico. La técnica de IF se utiliza en dos modalidades: inmunofluorescencia directa (donde el anticuerpo específico está conjugado con el fluorocromo) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) que hace uso de dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se une a la molécula blanco, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo, reconoce al primario y se une a él. Implica un efecto de amplificación que también aumenta la sensibilidad de la técnica (Figura 2.14).



**FIGURA 2.14.** Esquema de una prueba de IFI. Los portaobjetos con el antígeno adherido son sembrados con diferentes diluciones de suero y luego revelada la unión antígeno-anticuerpo por el empleo de un conjugado fluorescente.

Es una técnica rápida (si se cuenta con los portaobjetos montados con el antígeno) y reproducible. Las desventajas son su baja sensibilidad, que las reacciones no son permanentes y que es necesario fotografiar las reacciones positivas para documentar los casos. Además, requiere microscopio de fluorescencia, que es un instrumento de relativo alto costo.

### **2.3.1 Objetivo**

Desarrollar pruebas de IFI para los virus Sendai, MHV y MVM que permitan el monitoreo de las colonias de cría de ratones y de los productos derivados de ellos.

### **2.3.2 Materiales y métodos**

#### **Obtención de los antígenos**

Monocapas con un 60-80% de confluencia de células LLCMK<sub>2</sub> para el virus Sendai ó L929 para los virus MHV y MVM fueron infectadas con diluciones factor 10 de la ST del virus Sendai ó la ST cepa MHV 1 ó la cepa MVMp, respectivamente. Igual cantidad de cultivo celular fue conservado sin inocular para su utilización como control normal.

Las células fueron cultivadas en Eagle´s Minimal Essential Médium con sales de Earle (EMEM), suplementado con aminoácidos no esenciales (NEAA), 5 % de suero fetal bovino ( inactivado por calor a 56 °C durante 30 minutos) , 293 µg/ mL de L-glutamina 2mM, 100 UI de Penicilina/mL y 100 µg/ mL de estreptomicina. Para la obtención de ascitis se empleó la línea tumoral Sarcoma 180 (ATCC, TIB 66). Las líneas celulares utilizadas fueron certificadas en su identidad y esterilidad para bacterias, virus, hongos y micoplasma, en el nivel de Semilla de Trabajo.

En la Tabla 2.8 se presenta un esquema de las condiciones empleadas para la obtención de los antígenos para la prueba de IFI para los virus Sendai, MHV y MVM.

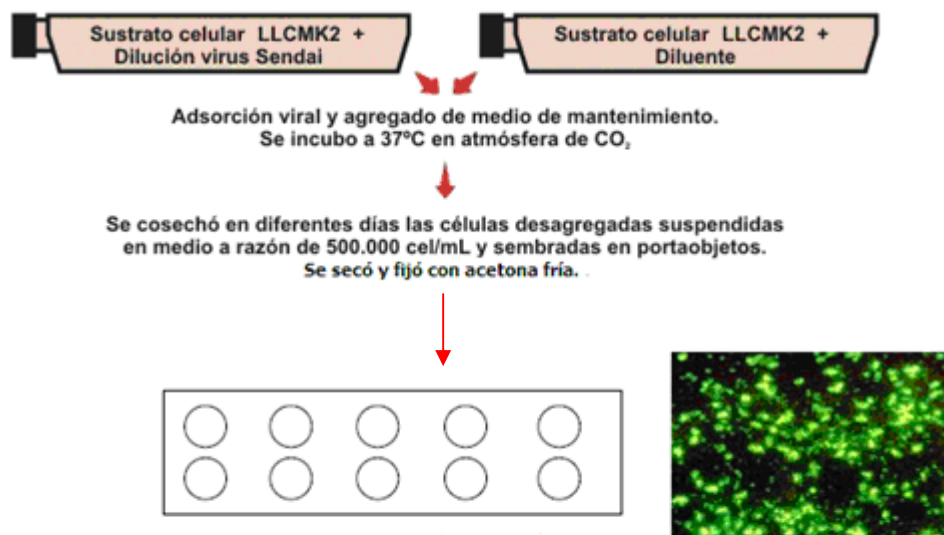


**TABLA 2.8.** Condiciones para la obtención de antígenos para la prueba de IFI para los virus Sendai, MHV y MVM.

CONDICIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ANTIGENO	VIRUS SENDAI	MHV	MVM
Sustrato celular	LLCMK <sub>2</sub>	L929	L929
Medio de Mantenimiento	Medio de mantenimiento (E.MEM) descrito anteriormente con 5 % de suero fetal bovino y antibióticos		
Inóculo viral	ST sin diluir	~10 <sup>6</sup> DICT <sub>50</sub> /mL de la ST	~10 <sup>6</sup> DICT <sub>50</sub> /mL de la ST
Condiciones para la adsorción viral	37°C durante 60 minutos, 5% de CO <sub>2</sub>	37°C durante 60 minutos, 5% de CO <sub>2</sub>	37°C durante 90 minutos, 5% de CO <sub>2</sub>
Día de cosecha de las células pi	7	4	1

### Prueba de IFI

Las células normales e infectadas fueron tripsinizadas y sembradas en spots para IFI según la técnica descrita por Parker, Cross et al. 1970, con modificaciones. Se ajustó la suspensión celular a una concentración de 500.000 células viables/mL. Una gota de dicha suspensión de células infectadas se distribuyó en cada uno de los 10 pocillos de los portaobjetos para IFI, en los pocillos restantes se inoculó las células sin infectar como control negativo (Figura 2.15).



**FIGURA 2.15.** Procedimiento empleado para obtener los spots con células normales e infectadas con el virus Sendai para realizar pruebas de IFI

Los portaobjetos fueron secados al aire y sumergidos en acetona fría para su fijación durante 30 minutos a -40°C. Se secaron con aire frío y se conservaron a -70 °C.

Los sueros y ascitis inmunes a probar, en diluciones factor dos, desde 1:4, fueron probados sobre los pocillos con células. Se inoculó 10 µL de cada dilución en los spots preparados con células normales y en los spots preparados con células infectadas con el virus respectivo. Se utilizó un suero control positivo cedido por la Dra. Simone Ramos (Control de Calidad de FIOCRUZ, Brasil). El revelado se realizó con un anticuerpo anti Ig totales de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (marca GIBCO. GOAT ANTI MOUSE GLOBULINE CONJUGATE, Catálogo #660-3432.USA). Se observó fluorescencia citoplasmática en las muestras positivas, semejante a lo observado en los controles positivos y fueron evaluadas mediante la asignación de una a cuatro cruces (de menor a mayor intensidad). Los títulos se expresaron como la inversa de la máxima dilución que mostró fluorescencia específica. Las diluciones de las muestras No se detectó inmunofluorescencia positiva en las células no infectadas.

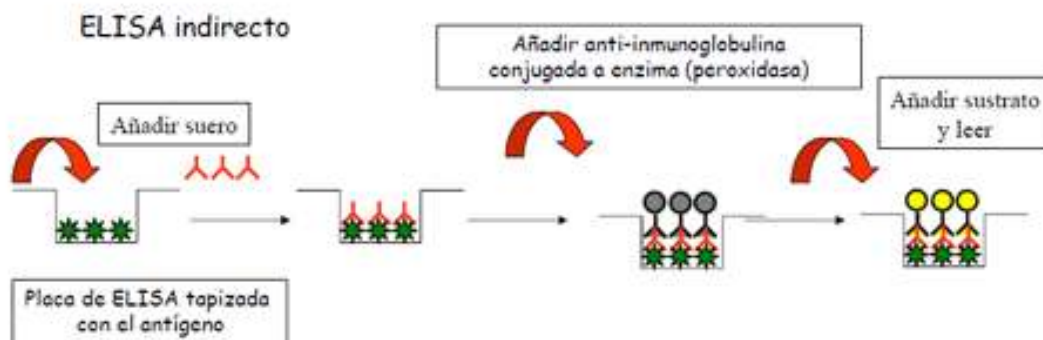
**Reproducibilidad de las pruebas de IFI**

Para establecer la reproducibilidad de los resultados se realizaron más de quince pruebas consecutivas de IFI con sueros y ascitis inmunes seleccionados, obtenidos por inmunización de RA.

## 2.4 DESARROLLO UNA PRUEBA DE ELISA PARA LA DETECCIÓN ANTICUERPOS ESPECIFICOS PARA LOS VIRUS SENDAI, MHV Y MVM.

Las técnicas serológicas utilizan la respuesta de anticuerpos para detectar y medir, in vitro, la respuesta a diferentes antígenos (Landsteiner,1936; Landsteiner and Chase,1936; Landsteiner and Jacobs,1936; Landsteiner and Jacobs,1936; Landsteiner and van der Scheer,1936).

Entre los años 1920 y 1930 se realizaron una serie de estudios en los que se demostró la especificidad de la respuesta de los anticuerpos y la capacidad de utilizar esta propiedad como una herramienta analítica. Los anticuerpos pueden ser detectados y cuantificados de muchas maneras. No todos los métodos detectan los mismos tipos de anticuerpos, ni con la misma sensibilidad. Generalmente es necesario aplicar más de un método serológico para concluir un resultado. En este trabajo de tesis se abordaron las pruebas de ELISA e IFI. La prueba de ELISA es la técnica serológica más utilizada por su alta sensibilidad y especificidad, así como por su fácil automatización (Figura 2.16).



**FIGURA 2.16.** Esquema de una prueba de ELISA

Este sistema se basa en la utilización de anticuerpos marcados con una enzima que reconocen a los anticuerpos problema como sus antígenos. Se adhiere a una superficie inerte el antígeno del anticuerpo que se busca y si en el suero existe cantidad suficiente de este anticuerpo, éste unirá al soporte sólido. En un segundo paso se lava el anticuerpo no unido y se aplica luego el anticuerpo marcado. Este reconoce específicamente al primer anticuerpo y se une al complejo. Como está unido a una enzima la concentración de anticuerpo problema es proporcional a la actividad enzimática. La actividad enzimática se

mide a través de un sustrato que adquiere color cuando es hidrolizado y la intensidad de color es proporcional al título de anticuerpo en la muestra inicial. Suele desarrollarse en formato de microplaca para poder desarrollar gran cantidad de muestras al mismo tiempo.

#### 2.4.1. Objetivo

Desarrollar pruebas de ELISA para los virus Sendai, MHV y MVM que permitan el monitoreo de las colonias de cría de ratones y de los productos derivados de ellos.

#### 2.4.2. Materiales y métodos

##### Obtención de los antígenos

Todos los antígenos para utilizarse en las pruebas de ELISA para los virus Sendai, MHV y MVM se obtuvieron por inoculación de cultivos celulares en monocapas con un 60-80% de confluencia según lo esquematizado en la Tabla 2.9

**TABLA 2.9.** Esquema de obtención de AG para los virus Sendai, MHV y MVM

Virus	Línea celular	Condiciones para la incubación(1)	Resultado
Dilución 1:100 de la ST del virus Sendai	LLCMK <sub>2</sub>	7 pi a 37°C, 5% de CO <sub>2</sub>	Cosecha de antígeno Sendai
~10 <sup>6</sup> DICT <sub>50</sub> /mL de la ST de MHV	L929	4 pi a 37°C, 5% de CO <sub>2</sub>	Cosecha de antígeno MHV
~10 <sup>6</sup> DICT <sub>50</sub> /mL de la ST de MVM	L929	24 hs a 37°C, 5% de CO <sub>2</sub>	Cosecha de antígeno MVM

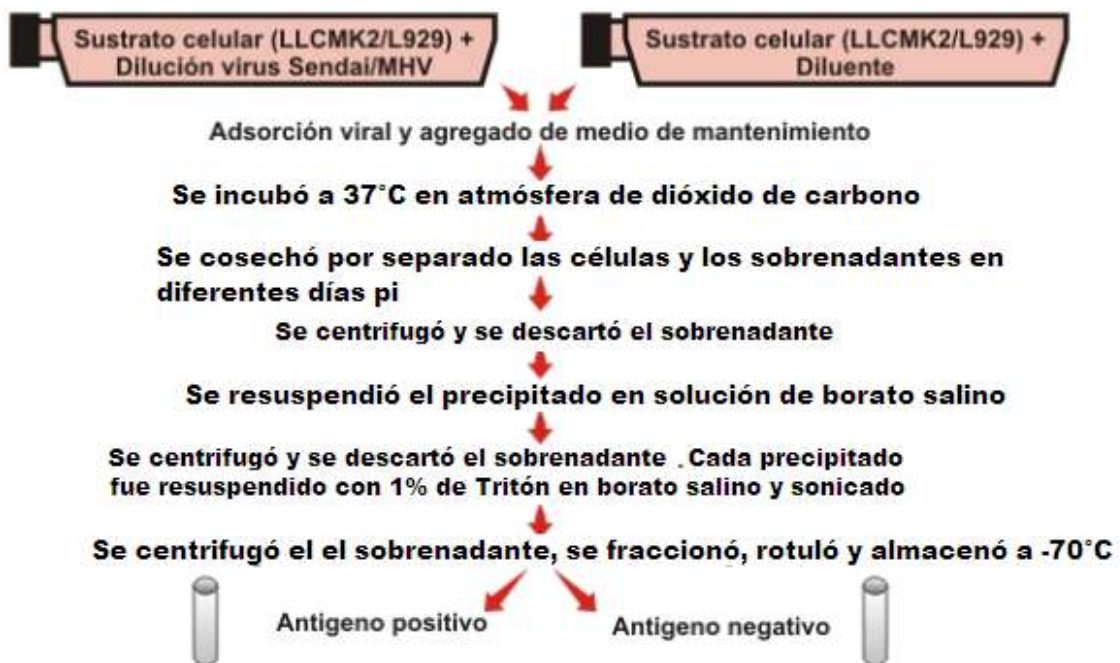
(1) El momento de cosecha de la monocapa celular infectada con virus y sin infectar fue establecido previa realización de la curva de replicación para cada virus, según se presenta en los capítulos correspondientes a resultados para cada agente viral.

Las células fueron cultivadas en Eagle's Minimal Essential Medium con sales de Earle (EMEM), suplementado con aminoácidos no esenciales (NEAA), 5 % de suero fetal bovino (inactivado por calor a 56 °C durante 30 minutos), 293 µg/ mL de L-glutamina 2mM, 100 UI de Penicilina/mL y 100 µg/ mL de estreptomycin. Para la obtención de ascitis se empleó la línea tumoral Sarcoma 180. Las líneas celulares utilizadas fueron certificadas en su identidad y esterilidad para bacterias, virus, hongos y micoplasma, en el nivel de Semilla de Trabajo.

Las diferentes condiciones evaluadas para poder obtener el mejor antígeno para la prueba de ELISA se describen seguidamente.

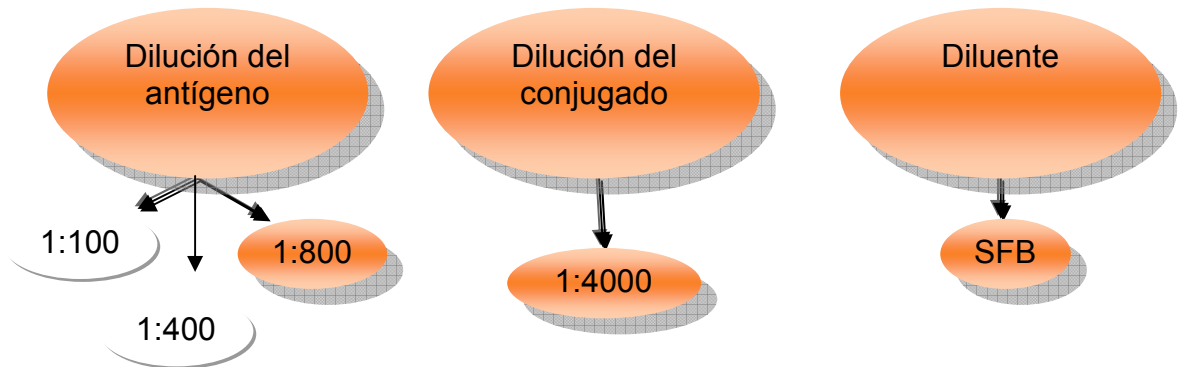
### VIRUS SENDAI

Luego de la adsorción viral a 37°C durante 60 minutos, los cultivos celulares LLCMK<sub>2</sub> inoculados y control fueron mantenidos con el medio de mantenimiento descrito anteriormente. En el día 7 pi las células fueron cosechadas como se describe en la Figura 2.17.



**FIGURA 2.17.** Esquema del procedimiento para la obtención de antígenos. Antígenos Sendai cuando se utiliza como sustrato celular monocapas de células LLCMK<sub>2</sub>, antígenos MHV y MVM cuando se utiliza como sustrato celular monocapas de células L929.

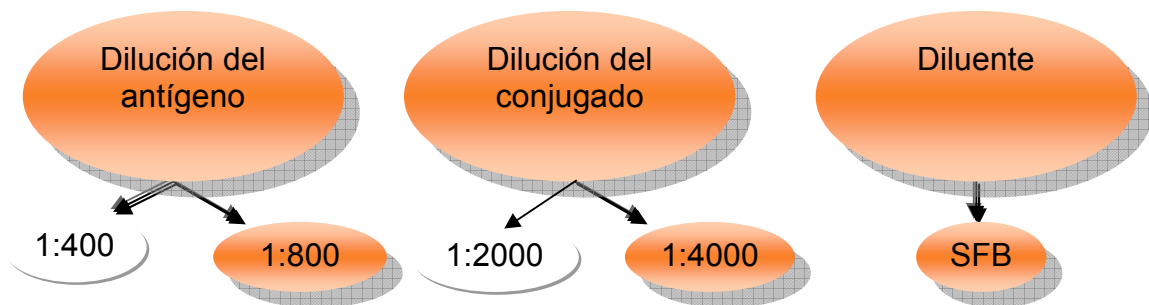
Los antígenos generados fueron probados en diluciones 1:100, 1:200 y 1:400 con PBS sin calcio y sin magnesio (pH 7.4) utilizándose un conjugado comercial anti-ratón diluido 1:4000 (Figura 2.18).



**FIGURA 2.18.** Condiciones evaluadas para la prueba de ELISA para el virus Sendai

## VIRUS MHV

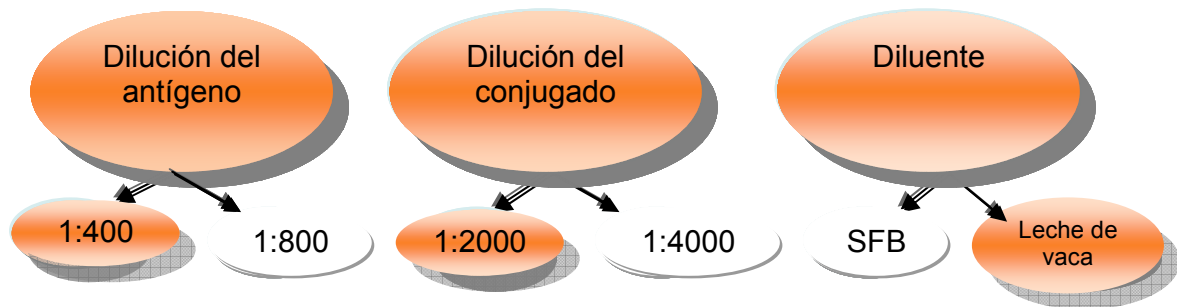
Luego de la adsorción viral a 37°C durante 60 minutos, los cultivos celulares L929 inoculados y controles fueron mantenidos con el medio de mantenimiento descrito anteriormente. El día 4 pi las células fueron cosechadas como se describe en la Figura 2.17. El antígeno generado fue probado en diluciones 1:400 y 1:800 utilizándose un conjugado comercial anti-ratón diluido 1:2000 y 1:4000. Se probó como diluyente de los antígenos suero fetal bovino (SFB). Ver Figura 2.19.



**FIGURA 2.19.** Condiciones evaluadas para la prueba de ELISA para el virus MHV

## VIRUS MVM

Luego de la adsorción viral a 37°C durante 90 minutos, los cultivos celulares L929 inoculados y control fueron incubados con el medio de mantenimiento anteriormente descrito a 37°C durante varios días. Los días 1 y 2 pi las células fueron cosechadas, como se describe en la Figura 2.16. Los antígenos generados fueron probados en diluciones 1:400 y 1:800 utilizándose un conjugado comercial anti-ratón diluido 1:2000 y 1:4000. Se probó como diluyente de los antígenos SFB y leche de vaca (Figura 2.20).



**FIGURA 2.20.** Condiciones evaluadas para la prueba de ELISA para el virus MVM

### Prueba de ELISA

La prueba de ELISA se desarrolló en base a los principios descritos por Engvall y Van Weemen BK (1971), con algunas modificaciones.

Los componentes del ELISA estudiados fueron:

Fase sólida: placas de polivinilo de 96 pocillos, fondo redondeado( "U" Bottom Microtiter ® Plates, # 290713)

Antígeno (+) Lisado de células infectadas.

Control (-) Lisado de células sin infectar.

Solución de lavado: Buffer fosfato salino (PBS) con Tween 20 (0.1%) y como agente bloqueante se utilizó suero fetal bovino al 5 % o leche de vaca, según el antígeno.

Sueros y ascitis en estudio: se ensayaron a partir de una dilución 1/100.

Sueros controles positivos: confirmados por IFI.

Ascitis inmunes

Sueros controles de ratones negativos.



Conjugado: anti IgG (FC) de ratón obtenida en cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (KPL, catálogo N°074-1806, lote N° 111129. USA)

Sustrato ABTS (2.2.-azino-di (3-etil-benzotiazolin sulfonato (6)) 1:1 con agua oxigenada (KPL, lote WC009. USA)

### Formato general para la prueba de ELISA

El antígeno positivo fue adsorbido, a razón de 100 µl por cavidad, en las placas de 96 pozos (fase sólida) desde la fila A hasta la fila D. De la misma manera el antígeno negativo fue adsorbido en las hileras E a H. Luego de una incubación durante toda la noche a 4 °C, las placas fueron lavadas seis veces con PBS, utilizándose un lavador manual. Inmediatamente, para realizar un primer screening, se sembraron en las placas los sueros y ascitis a los que se les realizaron diluciones factor 2 ( de 1:100 a 1:800), comenzando con una dilución inicial en tubo ,de 1:50, desde la hilera A hasta D. Se repitió el mismo esquema desde la fila E hasta H. Se incubó durante una hora, repitiéndose luego los seis lavados con PBS. Se colocaron 100 µl de conjugado por cavidad y se incubaron las placas a 37°C durante una hora, repitiéndose los lavados con PBS. Se agregó a cada pozo 100 µl de sustrato y se realizó la lectura de las pruebas de ELISA con un espectrofotómetro con dos filtros de longitud de onda de 405-450 nm. Al valor obtenido se le restaron los valores de las filas I a L. según la Figura 2.21.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	↓	ANTIGENO POSITIVO Sueros normales diluidos desde 1:100 a 1:800										
B												
C												
D												
E	ANTIGENO NEGATIVO Sueros normales diluidos desde 1:100 a 1:800											
F												
G												
H												
I	DIFERENCIAS DE ABSORBANCIAS ENTRE Ag+ y Ag -											
J												
K												
L												

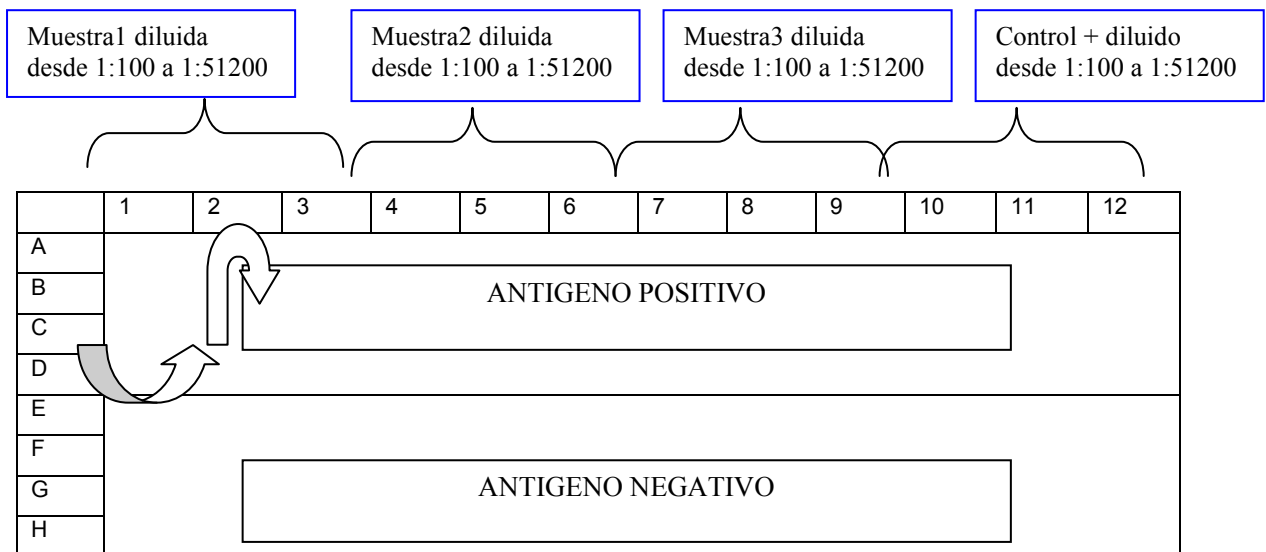
**FIGURA 2.21.** Disposición de los antígenos y muestras en las planillas de lectura del software para hallar el valor de corte para la prueba de ELISA

Utilizando un software “ad hoc” se calculó el promedio de las lecturas de absorbancia y su desvío estándar. Con los valores de absorbancia de las muestras negativas se obtuvo el valor de corte de la prueba mediante la siguiente fórmula:

Valor de corte : valor promedio de  $X + 3 SD$ .

Los títulos de los sueros y ascitis problema se calcularon como la máxima dilución de los mismos que mostraron una diferencia de absorbancia entre el antígeno positivo y el antígeno control negativo mayor al valor de corte, y se expresaron como la inversa de la dilución correspondiente.

En todos los casos los títulos de los sueros y ascitis fueron superiores a 800. Para hallar el título final, con los mismos reactivos inmunes se realizaron diluciones en placa factor 2 (de 1:100 a 1:51200), comenzando con una dilución inicial en tubo de 1:50, según se muestra en la Figura 2.22.



**FIGURA 2.22.** Disposición de los antígenos y de las diluciones de sueros y ascitis empleados en las placas, para realizar la prueba de ELISA

Para cada reactivo inmune cuyo título superó el valor de 51200 se efectuó en próximo ensayo en diluciones superiores para hallar el punto final.

La linealidad en los valores de los títulos de anticuerpos fue buscada mediante la titulación de al menos tres sueros y ascitis correspondientes a cada

virus en estudio. Se ensayaron las mismas muestras sin diluir y diluidas en factor 10 en las tres pruebas: IHA, IFI, ELISA para el virus Sendai y ELISA e IFI para MHV y MVM.

## **2.5 BÚSQUEDA DE LOS VIRUS SENDAI, MHV Y MVM EN DIFERENTES BIOTERIOS DE ARGENTINA**

Se realizó una invitación formal, por medio del correo electrónico, a 35 bioterios de la República Argentina para participar de la búsqueda de anticuerpos para los virus Sendai, MHV y MVM. Cada institución podía optar entre enviar al menos treinta muestras de sueros de ratones o los ratones vivos para ser sangrados en el Instituto. Sólo 5 bioterios distribuidos en la provincia de Santa Fé y Buenos Aires respondieron satisfactoriamente. Tanto los bioterios como las muestras fueron codificados para mantener la confidencialidad de los datos. Las muestras fueron procesadas por las pruebas de ELISA e IFI desarrolladas en el presente trabajo.

## **CAPITULO N°3.**

# **RESULTADOS**

### 3.1. VIRUS SENDAI

En el presente trabajo, para la obtención de los antígenos empleados en las técnicas de ELISA e IFI para detectar anticuerpos anti-Sendai se siguió el esquema que se presenta a continuación:



**FIGURA 3.1.** Esquema del procedimiento para obtener la SM, ST y AG para las pruebas de ELISA e IFI para detectar anticuerpos específicos. P1, P2 y P3 corresponden a los pasajes 1, 2 y 3 en huevos embrionados de pollo, respectivamente.

### Determinación del título del virus Sendai por HA

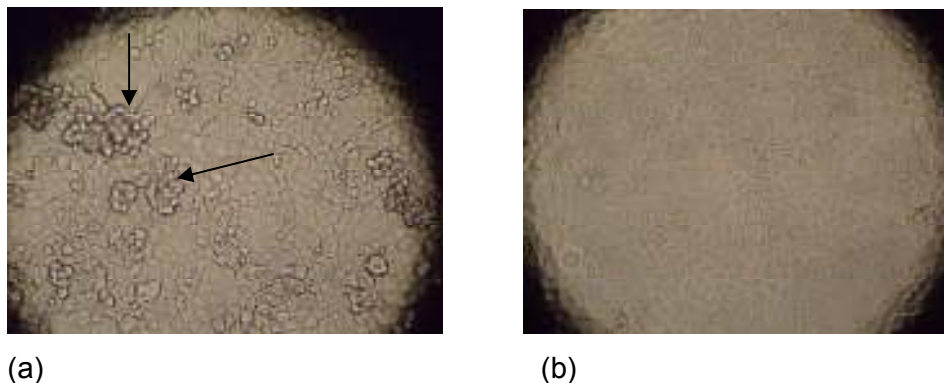
La SM y la ST del virus Sendai fueron tituladas inicialmente por HA, técnica transferida a nuestros laboratorios y ya estandarizada al momento de iniciar con el desarrollo del trabajo. Los datos se presentan en la Tabla 3.1.

**TABLA 3.1.** Título las semillas virales obtenidos por HA.

Variable	1 UHA
Control de glóbulos rojos	(-)
C(+)virus New Castle La Sota inactivado	64
Semilla Maestra Sendai -2°Pasaje en huevos embrionados de pollo -cosecha 48hs pi	1024
Semilla Trabajo Sendai-3°Pasaje en huevos embrionados de pollo -cosecha 48hs pi	4096

Con el conocimiento previo del título HA de la ST y con el objetivo de observar el efecto del virus sobre las células, se tituló la ST del virus en base a la observación del ECP. Se observó desde el día 8 pi .la formación progresiva de sincicios. Este ECP, que se correlacionó con la dilución de virus inoculada, permitió el cálculo del título viral en  $DICT_{50} / mL$ . El título obtenido en el día 9 pi en células LLCMK<sub>2</sub> fue  $10^{7.29} DICT_{50} / mL$ . Las células conservaron su morfología hasta el día 8 pi y partir del día 9 pi comenzaron a desprenderse gradualmente de la fase sólida con un deterioro total en el día 12 pi.

En la Figura 3.2 se observa, (a) ECP del virus Sendai. La flecha indica una estructura celular multinuclear con aspecto de ovillo (b) monocapa de células LLCMK<sub>2</sub> controles normales.



**FIGURA 3.2.** Observación de monocapas de células LLCMK<sub>2</sub> en microscopio óptico (400X).

### **Obtención de la curva de replicación viral**

Los sobrenadantes celulares fueron titulados por HA mientras que las células fueron adheridas a portaobjetos de vidrio para poder evaluar el porcentaje de células infectadas por IFI (según lo descrito en materiales y métodos). A continuación se describen los resultados hallados con las dos metodologías:

1. Titulación del virus en sobrenadante. Se realizó mediante la inoculación de las cosechas de sobrenadantes de cultivos celulares infectados y controles, en huevos embrionados SPF y la posterior determinación del título por HA de los líquidos amnióticos infectados y normales. Se obtuvieron títulos de 64 a 4096 UHA. Los datos se presentan en la Tabla 3.2



**TABLA 3.2.** Título de virus en sobrenadantes celulares de diferentes días de cosecha hallados por HA.

Días de cosecha pi Dil. de la ST del virus inoculada en LLCMK <sub>2</sub>	4	5	6	7
	Virus en el sobrenadante (HA)			
1/10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1/100	256	128	64	64
1/1000	64	512	512	1024
Control de glóbulos rojos	Ausencia de HA			
Semilla Trabajo Sendai 3° Pasaje en huevos embrionados de pollo - cosecha 48hs pi	4096			
C(+)virus New Castle La Sota inactivado	64			

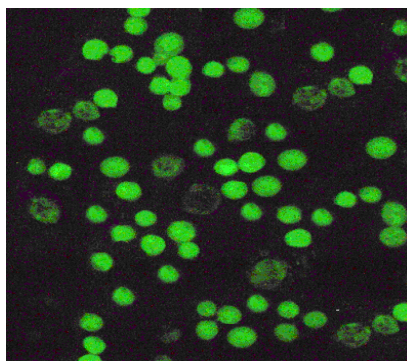
2. El porcentaje de células infectadas se estableció por medio de una prueba de IFI (Figura 2.15) empleando antisueros específicos de ratones obtenidos según las tablas 2.2 y 2.3. En la Tabla 3.3 se observan los títulos obtenidos por IFI frente a un antisuero específico de ratón obtenido por inoculación intranasal de 1 UHA de la ST del virus Sendai.

**TABLA 3.3.** Resultados de una prueba de IFI para evaluar las células infectadas en diferentes días de cosecha.

Días pi Dil.de la ST viral	4	5	6	7
	Título(Porcentaje de células infectadas)			
1/10	77	78	80	90
1/100	50	56	55	55
1/1000	10	10	10	10

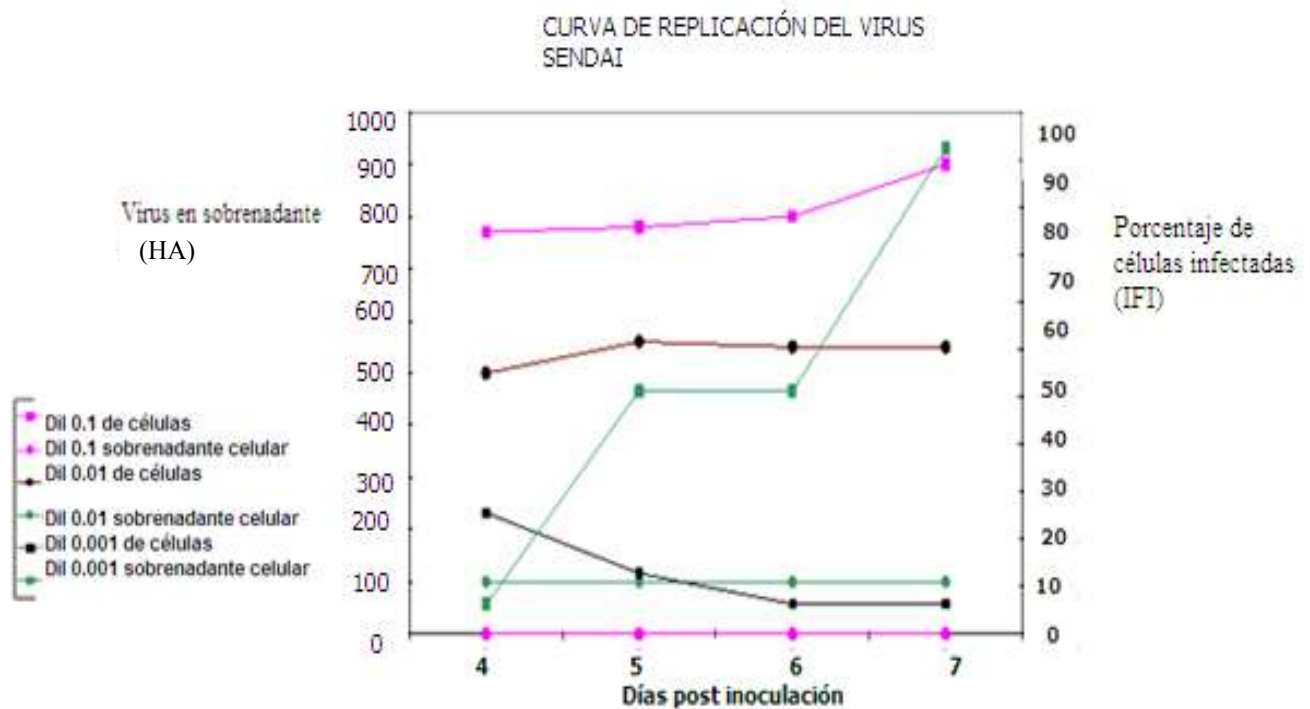
Como es de esperar, las células LLCMK<sub>2</sub> positivas presentaron fluorescencia verdosa intracelular al ser incubadas con el antisuero específico el día 7 pi. No se observó tinción en las células no infectadas con el virus Sendai.

En la Figura 3.3 se muestra una imagen obtenida por IFI en la que se observa tinción específica para anticuerpos anti-Sendai en el 90 % de las células LLCMK<sub>2</sub> inoculadas con la ST en la dilución 1/10, al día 7 pi.



**FIGURA 3.3.** Células LLCMK<sub>2</sub> positivas por la prueba de IFI para detectar Ac. Anti-Sendai. Las células tienen tinción específica en un patrón granular, más acentuado hacia la periferia celular. El antisuero utilizado fue obtenido en RA inoculado con la ST del virus Sendai (400X)

En la Figura 3.4 se representan los porcentajes de células con fluorescencia positiva y los títulos de virus Sendai en los respectivos sobrenadantes obtenidos en cosechas diarias entre los días 4 y 7 pi, y que permitieron obtener la curva de replicación viral.



**FIGURA 3.4.** Curva de replicación del virus Sendai. El efecto del virus en los sobrenadantes fue evaluado por HA mientras que las células cosechadas simultáneamente, se utilizaron para evaluar el porcentaje de células infectadas (IFI).

Las células (—■—) y el sobrenadante celular (—●—) obtenidos luego de la inoculación de una dilución 1/10 de la ST, permitieron definir el día 7 pi como el momento óptimo para la cosecha de antígenos para utilizar en IFI y ELISA. En ese momento la mayor concentración de virus se encuentra en las células (aproximadamente un 90 %) y se detecta escasa cantidad de virus en sobrenadante. Por otro lado, las células (—■—) obtenidas de la inoculación de una dilución 1/100 de la ST, y cosechadas el día 7 pi también resultaron un antígeno adecuado para ELISA aun cuando el porcentaje de células infectadas fue del 55%.

### **Determinación del título de anticuerpos específicos por IFI en los antisueros y líquidos ascíticos obtenidos a partir de ratones inmunizados con el virus Sendai**

Los antisueros y líquidos ascíticos obtenidos por los diferentes esquemas de inoculación (Tablas 2.2 y 2.3) se titularon inicialmente por el método de IHA y luego se utilizaron para evaluar la prueba de IFI. En primer

lugar se procesaron para obtener el título de anticuerpos en aquellas muestras que se obtuvieron por una única inoculación IN, ya que los datos bibliográficos indican a esta vía como la ideal para la seroconversión de los ratones. Los resultados se muestran en la Tabla 3.4. Para facilitar la lectura de las tablas siguientes se le otorgó un código referencial a cada esquema de inmunización.

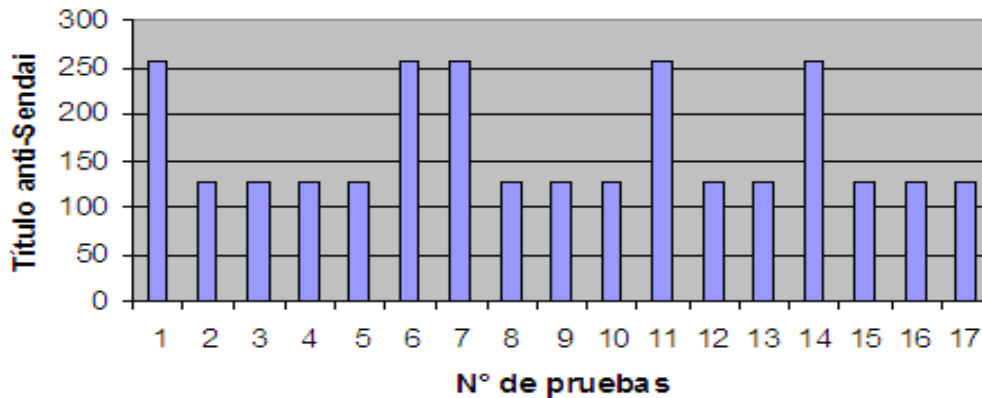
**TABLA 3.4.** Título hallado por IHA e IFI en muestras de sueros y líquidos ascíticos de ratones inmunizados, donde 1 UHA equivale a 4096.

Muestra obtenida (Código de referencia)	UHA inoculada (1UHA=4096)	Nº de inmunizaciones	Vía de inoculación	Título por IHA	Título por IFI
Suero (AA)	1	1	IN	128	128
Líquido ascítico (extracción el día 10 pi) (A1)	1	1	IN	256	256
Líquido ascítico (extracción el día 15 pi) (A2)				256	16
Líquido ascítico (extracción el día 13 pi) (A3)				256	16
Suero (BB)	0.1	1	IN	256	64
Líquido ascítico (extracción el día 16 pi) (B1)	0.1	1	IN	256	64
Líquido ascítico (extracción el día 9 pi) (B2)				256	64
Suero (CC)	0.01	1	IN	64	8
Suero (DD)	4	1	IN	64	128
Líquido ascítico (extracción el día 13 pi) (D1)	4	1	IN	256	256
Suero (EE)	1	1	IP	8	NH
Suero (FF)	1	3	IN	16	4

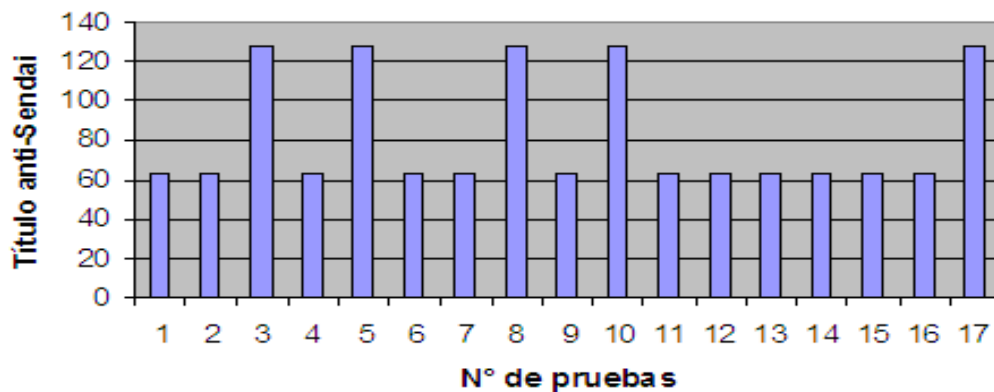
Mediante el análisis de los datos de la Tabla 3.4 se decidió no utilizar los sueros que resultaron de una única inoculación IP (EE) o de tres inoculaciones IN (FF) para las pruebas de ELISA, ya que los resultados por IFI e IHA fueron los menos satisfactorios. También se discontinuó estos esquemas de inoculación en RA.

### Reproducibilidad de la prueba de IFI

Para establecer la reproducibilidad de estos resultados se realizaron diecisiete pruebas consecutivas de IFI (Figuras 3.5 y 3.6) con sueros y ascitis conteniendo anticuerpos específicos para el virus Sendai, obtenidos por inmunización de RA.



**FIGURA 3.5.** Título de anticuerpos para el virus Sendai por IFI. Se procesó la misma muestra de suero AA de RA por IFI en días diferentes y en las mismas condiciones.



**FIGURA 3.6.** Título de anticuerpos para el virus Sendai por IFI. Se procesó la misma muestra de líquido ascítico B1 de RA por IFI en días diferentes y en las mismas condiciones

Los reactivos inmunes procesados por la prueba de IFI tienen un título esperable entre 128 y 256 para el suero y entre 64 y 128 para el líquido ascítico. En ambos casos se observa una variación no mayor de una dilución entre las sucesivas pruebas.

### **Determinación del título de anticuerpos específicos por ELISA en los reactivos inmunes obtenidos a partir de ratones inmunizados con el virus Sendai**

Con el conocimiento previo de la presencia de anticuerpos específicos en los reactivos inmunes, sueros y ascitis de RA, se procedió a titularlos por la prueba de ELISA desarrollada.

Los resultados se observan en la Tabla 3.5

**TABLA 3.5.** Título de sueros y ascitis inmunes específicas para el virus Sendai por ELISA

Muestra	N° de repetición- Título		
	1	2	3
AA	102400	102400	102400
BB	204800	204800	204800
CC	51200	51200	51200
A1	12800	12800	12800
B1	6400	6400	6400
D1	6400	6400	12800
A2	3200	3200	3200
B2	6400	6400	6400

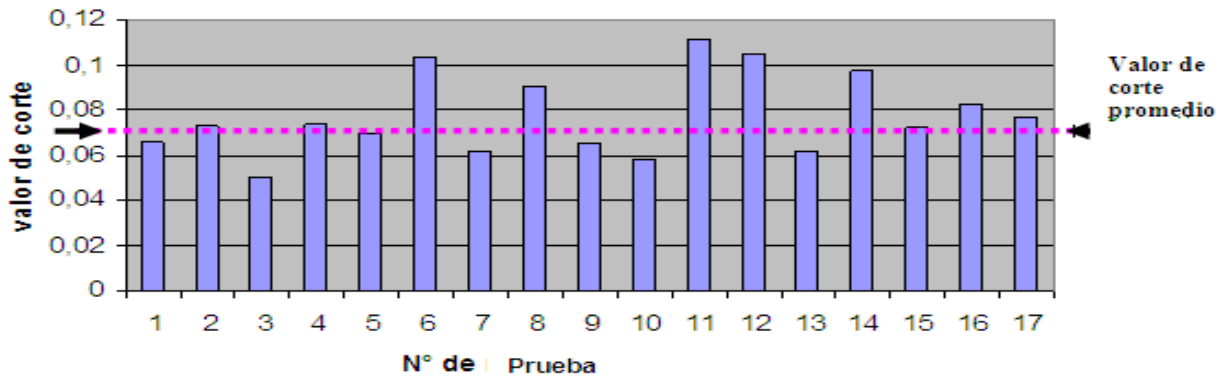
### **Condiciones para realizar la prueba de ELISA para el virus Sendai**

Los resultados presentados en la Tabla 3.5 se obtuvieron con una dilución del virus de 1/100, adsorción 60 minutos y cosecha el día 7 post inoculación. La dilución del antígeno en la prueba fue 1/400, la dilución del conjugado 1/4000 con PBS pH 7.4 sin calcio y sin magnesio, 0,1 % de Tween 20 y 5 % de SFB. Éstas resultaron las condiciones óptimas para realizar el test.

Todas las ascitis, independientemente del esquema de inoculación empleado, mostraron títulos  $\geq 3200$ . Cuando se probaron los sueros inmunes, los títulos resultaron  $\geq 12800$ . Sin embargo, se seleccionó para ser usado como control positivo en las pruebas el suero y el líquido ascítico obtenido por inmunización de los RA con la ST sin diluir (AA) (Tabla 3.5), ya que se obtuvieron los mayores títulos en todas las pruebas realizadas y la inoculación resultó menos estresante para los RA.

La comparación de los títulos obtenidos en ensayos consecutivos (Tabla 3.5) empleando las mismas muestras de ascitis, demostró una variación no mayor que un factor dos de dilución. Cuando las muestras se descongelan por segunda vez la variación observada fue de una o dos diluciones factor dos para las ascitis ensayadas. Por esto, es recomendable que este material se almacene en alícuotas equivalentes al volumen necesario a usar en cada prueba.

Para la evaluación del antígeno en las distintas condiciones de prueba, se demostró que el 95 % de los valores de corte se encuentran en el intervalo (0,068-0,086) con el antígeno obtenido en células LLCMK<sub>2</sub>, ya que el valor de corte promedio fue 0,0775, con un desvío estándar de 0,0179 según se muestra en la Figura 3.7. Se desarrolló una elevada absorbancia con los controles positivos y no se detectó reacción inespecífica con los controles negativos.



**FIGURA 3.7.** Valores de corte obtenidos de las muestras negativas en diferentes pruebas de ELISA

### **Estimación preliminar del valor de corte para títulos de anticuerpos específicos obtenidos por ELISA**

La linealidad en los valores de los títulos de anticuerpos fue buscada mediante la titulación de tres sueros y ascitis inmunes (anti-Sendai). Se ensayaron las mismas muestras sin diluir y diluidas en factor 10 en las tres pruebas: IHA, IFI, ELISA según se muestra en la Tabla 3.6.



**TABLA 3.6.** Comparación de los títulos correspondientes a muestras de sueros y ascitis inmunes procesados por las tres técnicas.

Muestra	Dilución del reactivo inmune	IHA	ELISA	IFI
AA	s/d	512	204800	128
	1:10	64	25600	128
	1:100	8	800	Neg
	1:1000	4	100	Neg
BB	s/d	2048	25600	128
	1:10	128	12800	32
	1:100	8	100	Neg
	1:1000	4	Neg	Neg
CC	s/d	2048	12800	128
	1:10	128	1600	8
	1:100	8	200	Neg
	1:1000	4	Neg	Neg
A2	s/d	256	25600	16
	1:10	32	1600	Neg
	1:100	8	100	Neg
	1:1000	4	Neg	Neg
A3	s/d	256	25600	16
	1:10	64	3200	Neg
	1:100	8	400	Neg
	1:1000	4	Neg	Neg
B1	s/d	256	3200	64
	1:10	16	200	Neg
	1:100	8	Neg	Neg
	1:1000	4	Neg	Neg

Se realizó una estimación preliminar de un valor de corte para los títulos de anticuerpos específicos obtenidos por ELISA en base a las discordancias encontradas entre los tres ensayos, como se presenta en la Tabla 3.7.

**TABLA 3.7.** Títulos obtenidos por ELISA, IHA e IFI para diferentes muestras de sueros y líquidos ascíticos inmunes de ratón

MUESTRAS	ELISA	HAI	IFI
AA	≥ 800	8	Negativo
BB		128	32
CC		128	8
A2		32	Negativo
A3		64	Negativo
B1		256	64

Estos datos permitieron proponer preliminarmente como valor de corte la dilución  $\geq 1:800$  para considerar un resultado positivo, ya que un número adecuado de muestras positivas permitirá validar las pruebas de ELISA e IFI contra el estándar de IHA.

### **Reproducibilidad, consistencia y estabilidad de los antígenos obtenidos para ELISA**

La reproducibilidad de cada lote de antígeno fue establecida por la realización de al menos tres pruebas consecutivas de ELISA en un número elevado de muestras. Las muestras que se utilizaron fueron obtenidas por inmunización de RA.

Se produjeron cuatro lotes (Tabla 3.8) de antígenos para el virus Sendai siguiendo el protocolo descrito en la Figura 2.17. Los lotes 1 y 2 se produjeron en julio de 2005 y el lote 3 en agosto de 2005, mientras que el lote 4 en julio de 2010.

Los resultados de cada nuevo lote fueron comparados con los resultados del procesamiento de las mismas muestras con un lote de antígeno anterior.

El lote 4 está disponible y en uso para pruebas futuras.

**TABLA 3.8.** Determinaciones de estabilidad del antígeno para ELISA (a -70°C)

Lotes de antígenos	Fecha de producción	Título de Ac. Anti-Sendai	Estabilidad demostrada	Título
1	Julio 2005	25600	4 meses	25600± 1 dilucion
2	Julio 2005	25600	65 meses	25600± 1 dilucion
3	Agosto 2005	25600	67 meses	25600± 1 dilucion
4	Julio 2010	25600	24 meses (aún en uso)	25600± 1 dilucion

Los resultados obtenidos (Tabla 3.8) permitieron hasta el presente verificar una estabilidad de 67 meses para los antígenos utilizados en la prueba de ELISA para titular anticuerpos inducidos por el virus Sendai.

#### **Cálculo aproximado del rendimiento de los antígenos de IFI y ELISA para el virus Sendai**

La SM del virus Sendai se fraccionó en viales de 1,3 mL. Con tres viales de la SM se inocularon 30 huevos de pollo embrionados de 10 días. Se cosechó en promedio 10 mL de líquido amniótico de cada huevo (ST). Esta ST fue fraccionada en viales de 1.3 mL. Con tres viales de la ST se inoculó una

botella T150 y se recuperaron 10 mL de sobrenadante y lisado celular de cada botella para ser utilizadas como antígeno para IFI y para ELISA.

El número final de portaobjetos que se obtuvieron para la prueba de IFI dependió del recuento de células infectadas al momento de la cosecha. En promedio, por cada 20 mL de suspensión celular se sembraron 100 portaobjetos a razón de 0.015 mL por spot. Mientras que para la prueba de ELISA, el material fue fraccionado en viales de 0.05 mL. Un vial es suficiente para realizar el coating de 8 placas de antígeno positivo. En cada placa pueden procesarse 11 muestras y un control positivo. Por lo tanto en una prueba de 8 placas pueden procesarse 95 muestras y un control positivo (diluidas factor dos desde 100 a 800).

### Búsqueda del virus Sendai en diferentes bioterios de Argentina

Se trabajó con muestras de sueros de ratones de diferentes especies obtenidos de distintos bioterios de Argentina. Tanto los bioterios como las muestras fueron codificados para mantener la confidencialidad de los datos. Hasta la fecha se han procesado las muestras procedentes de cinco bioterios y los resultados se presentan en la Tabla 3.9. No se encontraron muestras positivas para virus Sendai.

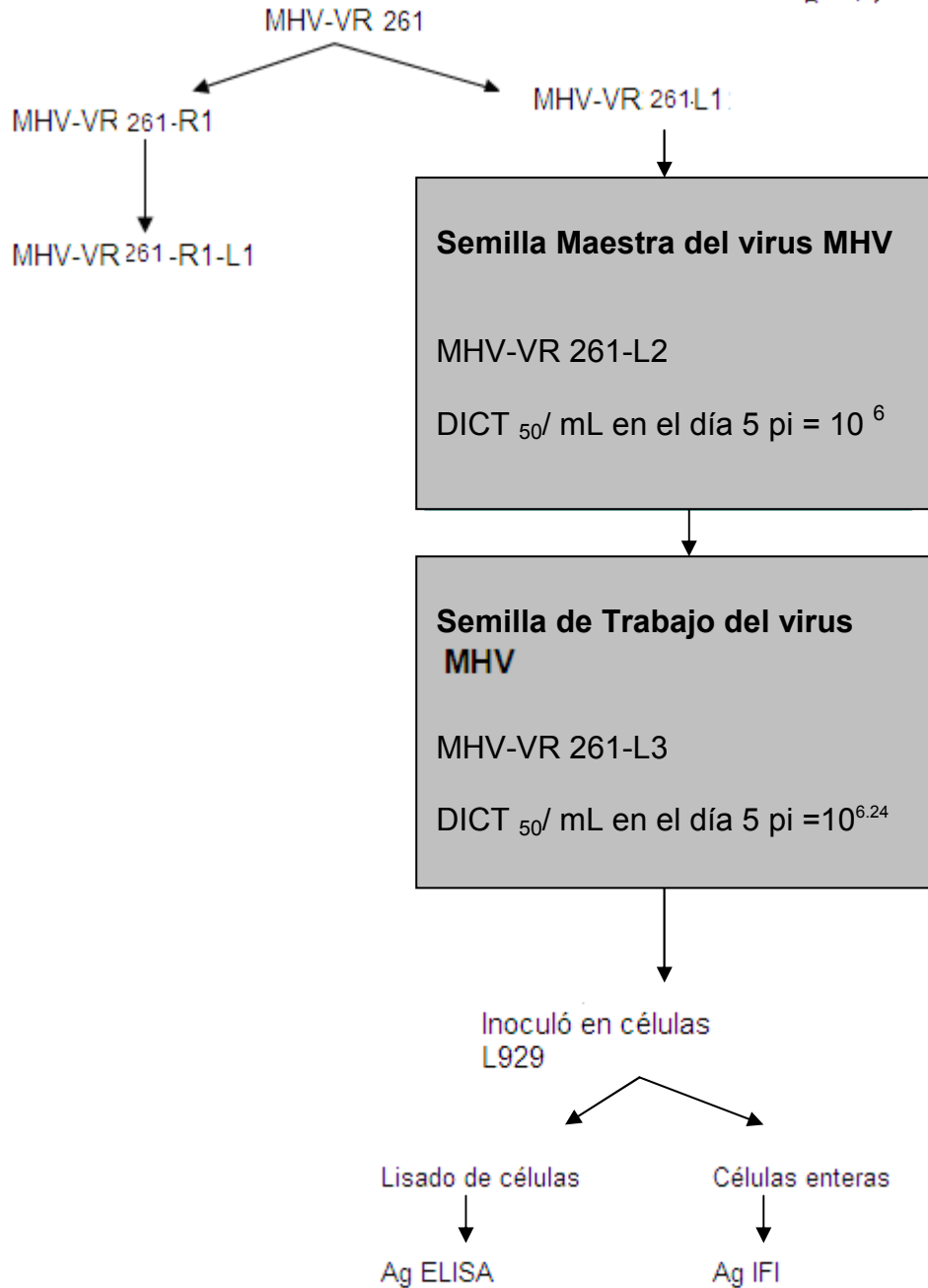
**TABLA 3.9.** Resultados de la prueba de ELISA Sendai para muestras de sueros de ratones de diferentes bioterios distribuidos en la provincia de Buenos Aires y Santa Fe.

Bioterio	Positivos/ estudiados	
Código del bioterio	IFI	ELISA
01	0/10	0/10
02	0/8	0/8
03 (*)	0/24	0/24
04	0/11	0/11
05	0/11	0/11

(\*) Colonia convencional

### 3.2. VIRUS MHV

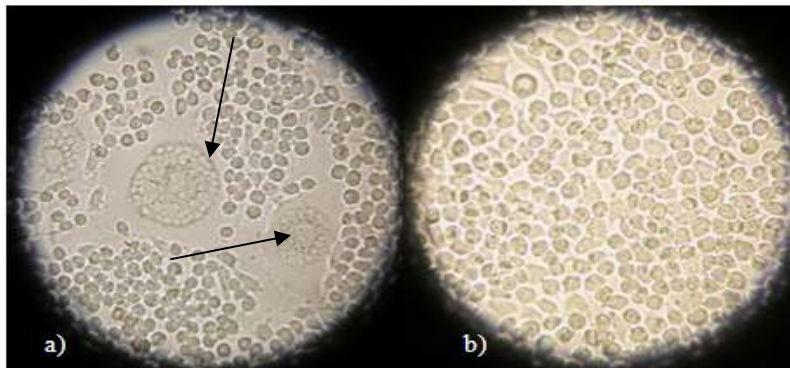
En el presente trabajo, para la obtención de los antígenos empleados en las técnicas de ELISA e IFI para detectar anticuerpos para el virus MHV se siguió el esquema que se presenta a continuación:



**FIGURA 3.8.** Esquema de la historia de pasajes del virus MHV en todas las aplicaciones de este antígeno en el presente trabajo. L1, L2 y L3 corresponden a los pasajes 1, 2 y 3 en células L929, respectivamente. R1 corresponde al pasaje 1 en ratón adulto.

### Título de la SM y ST del virus MHV

La inoculación de MHV en monocapas de células L929 generó una progresiva aparición de ECP a partir del día 4 pi que consistió en la formación de cuerpos multinucleados (Figura 3.9).



**FIGURA 3.9.** Observación de monocapas de células L929 en microscopio óptico (400X). (a) ECP del virus MHV. La flecha indica una estructura celular multinuclear (b) monocapa de células L929 controles normales.

La lectura del ECP descrito permitió la titulación del contenido viral en los diferentes materiales. En la Tabla 3.10 se presenta un resumen del título viral presente en la carta de certificación de ATCC para el virus MHV en células NCTC 1469 (MHV-NCTC 1469) y los correspondientes a la SM y ST expresados en  $DICT_{50}/mL$  y  $DL_{50}$ .

**TABLA 3.10.** Título viral de MHV

Sustrato(*)	Título expresado en :	Título viral
MHV-VR 261	$DICT_{50}/0.2 mL$	$10^{5.25}$ el día 3 pi
MHV-VR261-L1	$DICT_{50}/mL$	$10^{8.17}$ el día 5 pi
MHV-VR261-L2 (SM)	$DICT_{50}/mL$	$10^6$ el día 5 pi
MHV-VR261-L3(ST)	$DICT_{50}/mL$	$10^{6.24}$ el día 5 pi
MHV-VR261-R1	$DL_{50}/mL$	$10^{7.2}$

(\*)L1, L2 y L3 corresponden a los pasajes 1, 2 y 3 en células L929, respectivamente.  
R1 corresponde al pasaje 1 en ratón adulto

### Obtención de la curva de replicación viral.

Se estudió el comportamiento de distintas diluciones factor 10 del virus MHV, según lo descrito en materiales y métodos, mediante:

1. Titulación del virus en el sobrenadante. Los sobrenadantes de los cultivos celulares inoculados con la ST de MHV fueron colectados en diferentes días (1 al 7 pi) para ser titulados por observación de ECP (Tabla 3.11 y Figura 3.11) y letalidad en *rrn* (Tabla 3.12)

2. Determinación del número de células infectadas. Las células fueron adheridas a portaobjetos de vidrio para poder enumerar las células infectadas por IFI

A continuación se describen los resultados hallados con las dos metodologías:

**TABLA 3.11.** Título de MHV en sobrenadantes celulares

Cosecha (Días pi)  Dilución de la ST viral (DICT <sub>50</sub> /mL)	4	5	6	7
	Título (DICT <sub>50</sub> /mL)			
1/10	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
1/100	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	Neg
1/1000	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	Neg	Neg
1/10000	Neg	Neg	Neg	Neg



**TABLA 3.12.** Título de MHV en rrn

Inoculo	Título (DL <sub>50</sub> / mL)
MHV-1L Cosechado 5 pi	10 <sup>5</sup> (MHV-VR261-L1-1rrn)
MHV-1L Cosechado 6 pi	10 <sup>4</sup> (MHV-VR261-L1-1rrn)
MHV-1L Cosechado 7 pi	No se obtuvo título viral

Cómo es de esperar, cuanto más tardíamente se cosechan los sobrenadantes es menor la presencia de virus y la DL<sub>50</sub> disminuye, como se desprende de la Tabla 3.11 y 3.12

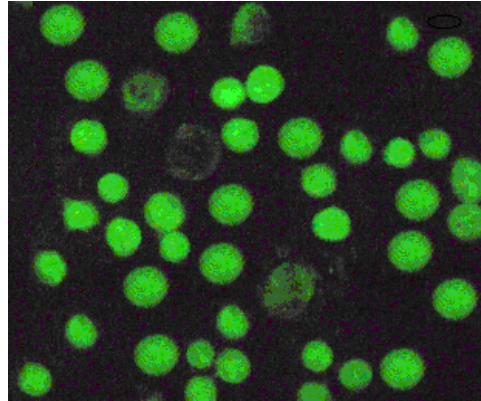
El porcentaje de células infectadas se calculó en las sucesivas cosechas mediante pruebas de IFI, empleando un antisuero específico de ratón (AA) obtenido por inmunización (Tabla 3.13).

**TABLA 3.13.** Porcentaje de células L929 infectadas por el virus MHV por IFI

Cosecha (Días pi)  Título de la ST viral (DICT <sub>50</sub> / mL)	4	5	6	7
	Porcentaje de células infectadas			
10 <sup>5</sup>	95	90	90*	*
10 <sup>4</sup>	90	85	50	50
10 <sup>3</sup>	45	45	50	50
10 <sup>2</sup>	10	15	15	15

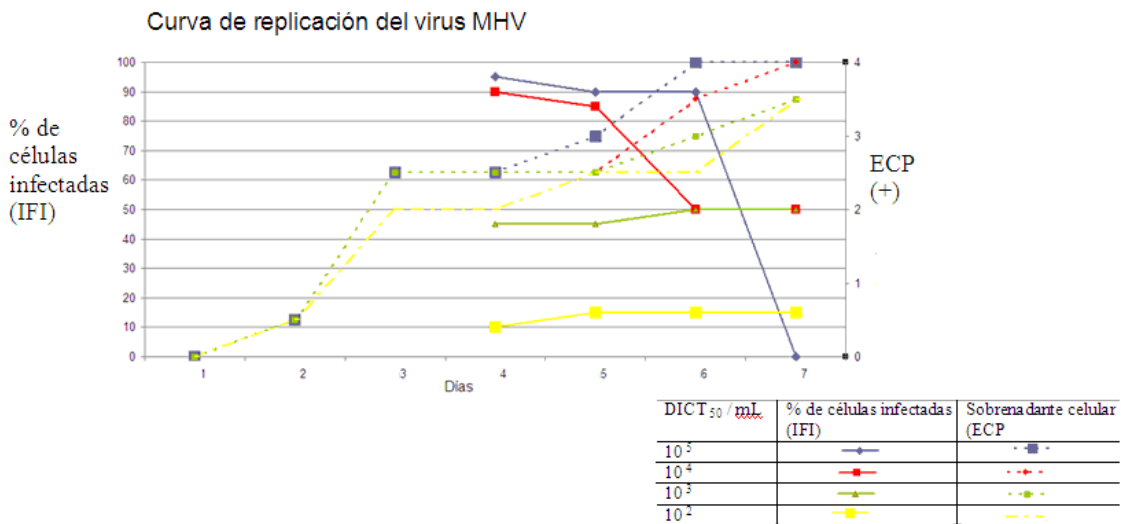
\*Deterioro de la monocapa celular.

Las células L929 positivas presentaron fluorescencia verdosa intracelular (Figura 3.10) al ser incubadas con el reactivo inmune específico el día 4pi. No se observó tinción en las células no infectadas con el virus MHV.








**FIGURA 3.10** Las células L929 positivas presentaron fluorescencia verdosa intracelular el día 4pi (400X)

Como surge de la Tabla 3.13 y Figura 3.11, las  $DICT_{50}/mL$   $10^5$  y  $10^4$  inoculadas con la ST y las células cosechadas los días 4 y 5, tuvieron un porcentaje de células infectadas superior al 85 %. El conjugado anti-ratón se utilizó diluído 1:20.



**FIGURA 3.11.** Curva de replicación del virus MHV. El efecto del virus en los sobrenadantes fue evaluado por ECP mientras que las células cosechadas simultáneamente, se utilizaron para evaluar el porcentaje de células infectadas.

El porcentaje de células infectadas para la dilución viral 1:10 (  ) y 1:100 (  ) de MHV en el día 4pi fue superior al 90% y el contenido de virus en sobrenadante (  ,  ) fue escaso, de manera que las células se observaban íntegras en su morfología. En contraposición con lo hallado el día 7 pi, en donde el porcentaje de células infectadas para la dilución viral 1:10 (  ) no pudo evaluarse por encontrarse las células totalmente desprendidas de la fase sólida.

Por lo tanto los resultados luego de titular los distintos materiales virales por observación de ECP y de establecer el porcentaje de células infectadas al ser expuestas a un reactivo inmune específico determinaron que el momento adecuado para la cosecha de células para ser utilizadas como antígeno para las pruebas de ELISA e IFI para el virus MHV es el día 4 pi de la ST.

Por otro lado y debido a la necesidad de cumplimentar con el criterio de las 3R, se discontinuó la línea de experimentación con los animales.

### **Determinación por IFI del título de anticuerpos específicos en los reactivos inmunes obtenidos a partir de ratones inmunizados con el virus MHV**

Diferentes antisueros y los líquidos ascíticos obtenidos por los esquemas de inoculación (Tablas 2.4 y 2.5) se utilizaron para evaluar el mayor porcentaje de células infectadas para la prueba de IFI. Los resultados se muestran en la Tabla 3.14

**TABLA 3.14** Título hallado por IFI en muestras de sueros y ascitis de ratones inmunes para el virus MHV

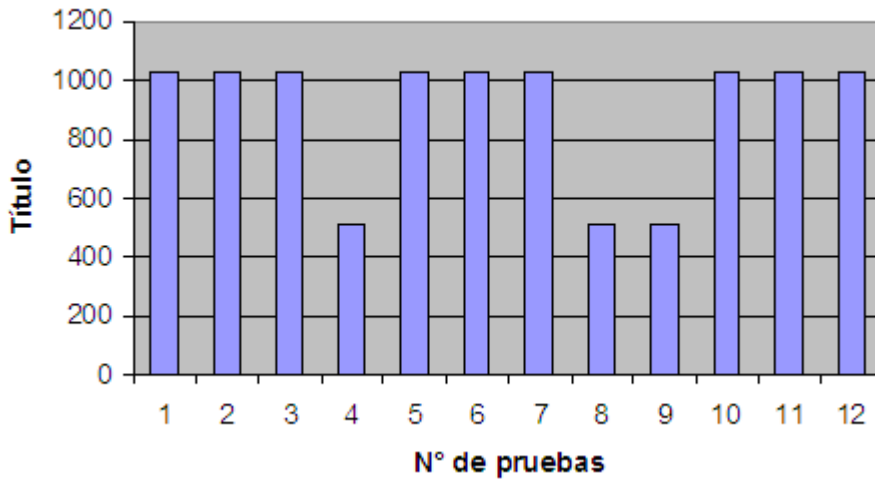
Inóculo en ratón de la cepa MHV original (DICT <sub>50</sub> / mL)	Muestra obtenida (Código de referencia)	Título de Ac. por IFI
10 <sup>5</sup>	Suero (AA)	1024
	Ascitis (A1)	2048
10 <sup>4</sup>	Suero (BB)	256
	Ascitis (B1)	256
10 <sup>3</sup>	Suero (CC)	32
	Ascitis (C1)	32

En todos los esquemas se inmunizó una única vez 20 µL de cada dilución viral de MHV a cada RA por vía IN.

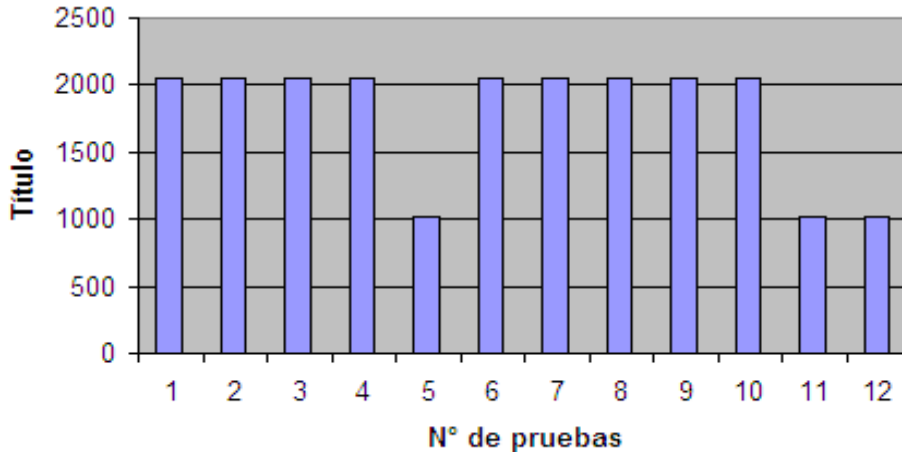
El suero CC y el líquido ascítico C1 obtenidos a partir de la inmunización de RA con 10<sup>3</sup> DICT<sub>50</sub>/ mL de MHV tuvieron menor título de anticuerpos por IFI por lo tanto no se los utilizó para evaluar la reproducibilidad de la prueba.

### Reproducibilidad de la prueba de IFI

Para establecer la reproducibilidad de estos resultados se realizaron pruebas consecutivas de IFI con el suero AA y el líquido ascítico A1 obtenidos por inmunización de RA (Figuras 3.12 y 3.13).



**FIGURA 3.12.** Título de anticuerpos en suero para el virus MHV por IFI. Se procesó la misma muestra de suero AA de RA por IFI en días diferentes y en las mismas condiciones



**FIGURA 3.13.** Título de anticuerpos en LAI para el virus MHV por IFI. Se procesó la misma muestra de líquido ascítico A1 de RA por IFI en días diferentes y en las mismas condiciones

Los reactivos inmunes procesados por la prueba de IFI tienen un título esperable entre 1024 y 512 para el suero y entre 1024 y 2048 para el líquido ascítico. En ambos casos se observa una variación en el título no mayor de una dilución entre las sucesivas pruebas

### Determinación del título por ELISA de anticuerpos específicos en los reactivos inmunes obtenidos a partir de ratones inmunizados con el virus MHV

Con el conocimiento previo de la presencia de anticuerpos específicos inducidos por el virus MHV en los reactivos inmunes, sueros y ascitis de RA, se procedió a titularlos por la prueba de ELISA desarrollada. Los resultados se observan en la Tabla 3.15.

**TABLA 3.15.** Títulos de sueros y ascitis específicos para el virus MHV por ELISA

Muestra	N° de repetición- Título		
	1	2	3
AA	6400	3200	3200
AA (**)	12800	12800	12800
AA(***)	6400	6400	6400
A1	6400	6400	3200
BB	3200	3200	3200
B1	1600	1600	1600
C1	200	200	200

AA, AA(\*\*), AA(\*\*\*): sueros obtenidos por punción intracardíaca el día 21, 23 y 36 pi, de RA inoculados con  $10^5$  DICT<sub>50</sub>/mL de la cepa MHV

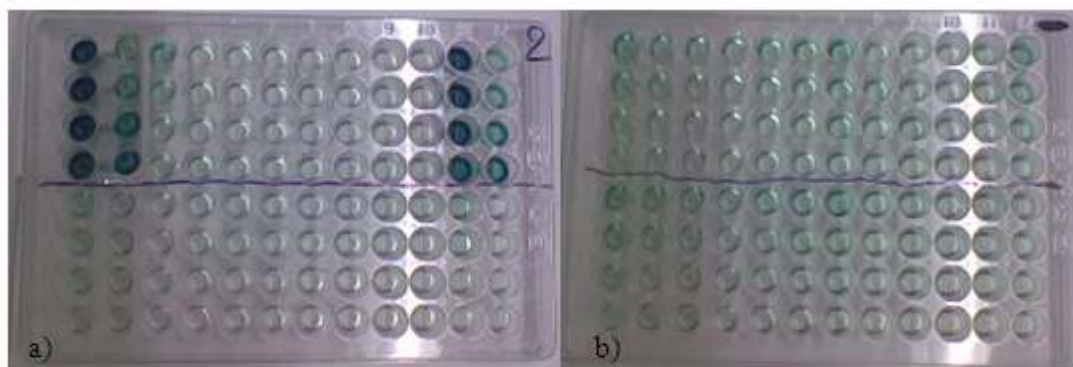
La comparación de los títulos obtenidos en ensayos consecutivos empleando las mismas muestras de suero y líquidos ascíticos permitió demostrar la reproducibilidad de la técnica de ELISA utilizando dicho reactivo

biológico. Por otro lado, de acuerdo a los títulos de anticuerpos específicos para el virus MHV obtenidos por IFI y ELISA se seleccionaron las muestras AA y A1 como las adecuadas para ser utilizadas como controles positivos en las sucesivas pruebas.

### Condiciones para realizar la prueba de ELISA para el virus MHV

Los resultados presentados en la Tabla 3.15 se obtuvieron por inoculación de la ST del virus sd ( $10^{6,24}$  DICT 50 / mL), en las células L929 y el día 4 pi se colectaron las células para ser sonicadas y utilizadas como antígeno para la prueba de ELISA. La dilución del antígeno en la prueba fue 1/800, la dilución del conjugado 1/4000 con PBS, pH 7.4, sin calcio y sin magnesio, 0,1 % de Tween 20 y 5 % de SFB .

En la Figura 3.14 se observa el resultado obtenido de una prueba de ELISA para MHV.

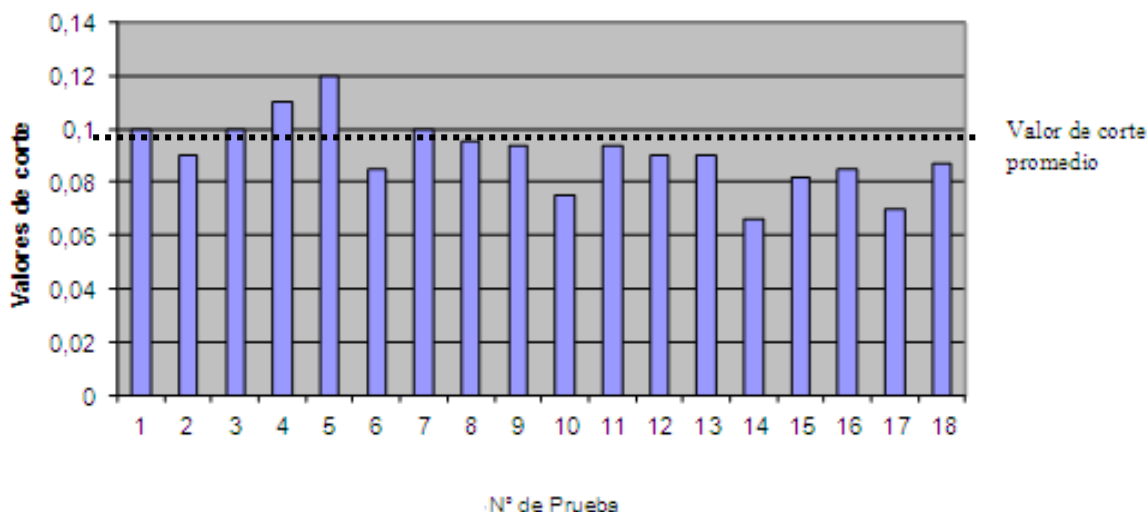


**FIGURA 3.14** a) Placa de ELISA para el virus MHV. Muestra de suero positivo de ratón b) Placa control

La reproducibilidad demostrada por los reactivos inmunes (Tabla N°3.14.) permitió la selección y empleo del suero (AA) y del líquido ascítico (A1) obtenido por inmunización de los RA con  $10^5$  DICT<sub>50</sub>/ mL de la cepa MHV y posterior extracción del LAI por punción IP luego de la transferencia del sarcoma 180 y del líquido ascítico normal, como control positivo en los diferentes tests.

Asimismo, mediante la evaluación de los resultados obtenidos de 18 pruebas de ELISA para el virus MHV ( realizadas en diferentes momentos, en

las condiciones mencionadas con el mismo lote de antígeno) se demostró que el 95% de los valores de corte se encuentran en el intervalo (0,071-0,123) con el antígeno obtenido en las células L929, ya que el valor de corte promedio fue 0.097, con un desvío estándar de 0,013 según se muestra en la Figura 3.15. Se desarrolló una elevada absorbancia con los controles positivos y no se produjo reacción inespecífica con los controles negativos.



**FIGURA 3.15.** Valores de corte obtenidos de las muestras negativas en diferentes pruebas de ELISA de MHV

### **Estimación preliminar del valor de corte para títulos de anticuerpos específicos obtenidos por ELISA MHV**

Se determinó el título por ELISA e IFI para diferentes muestras de sueros y líquidos ascíticos específicos para el virus MHV diluidas factor 10 y sin diluir, como se indica en la Tabla 3.16



**TABLA 3.16.** Comparación de los títulos correspondientes a muestras de sueros y ascitis inmunes procesados por ELISA e IFI para el virus MHV.

Muestras	Dilución	ELISA	IFI
AA(*)	s/d	6400	1024
	1:10	800	128
	1:100	200	16
	1:1000	NEG	NEG
AA(**)	s/d	6400	2048
	1:10	800	32
	1:100	200	16
	1:1000	NEG	NEG
AA(***)	s/d	6400	128
	1:10	1600	32
	1:100	400	4
	1:1000	NEG	NEG
A1	s/d	12800	256
	1:10	3200	128
	1:100	400	16
	1:1000	200	NEG
B1	s/d	12800	256
	1:10	800	32
	1:100	400	16
	1:1000	100	NEG
C1	s/d	200	NEG
	1:10	100	NEG
	1:100	NEG	NEG
	1:1000	NEG	NEG

AA(\*), AA(\*\*), AA(\*\*\*): sueros obtenidos por punción intracardíaca el día 21, 23 y 36 pi, de RA inoculados con  $10^5$  DICT<sub>50</sub>/mL de la cepa MHV

A partir de estas comparaciones se realizó una estimación preliminar de un valor de corte para los títulos de anticuerpos específicos obtenidos por ELISA basándose en las discordancias encontradas entre los dos ensayos, como se presenta en la Tabla 3.17.

**TABLA 3.17.** Títulos obtenidos por ELISA e IFI para diferentes muestras de sueros y líquidos ascíticos inmunes de ratón para el virus MHV

MUESTRAS	ELISA	IFI
AA(*)	≥400	16
AA(**)		32
AA(***)		4
A1		16
B1		16
C1		Neg

Estos datos permitieron proponer preliminarmente como valor de corte a la dilución  $\geq 1:400$  para considerar un resultado positivo, ya que todo título cuyo valor sea  $\geq 400$  se observa acompañado de un resultado positivo en IFI. Con un número suficiente de muestras, estos pares de valores permitirán la validación de ELISA e IFI

### **Reproducibilidad, consistencia y estabilidad de los antígenos obtenidos para la prueba de ELISA**

La reproducibilidad de cada lote de antígeno fue establecida por la realización de al menos tres pruebas consecutivas en un número elevado de muestras. Las muestras que se utilizaron fueron obtenidas por inmunización de RA.

Entre noviembre de 2007 y junio de 2009 se produjeron siete lotes de antígenos siguiendo el protocolo descrito en la Figura 2.17.

Los resultados de cada nuevo lote fueron controlados con los resultados del procesamiento de las mismas muestras con un lote de antígeno anterior.

Los lotes 6 y 7 están disponibles y en uso para pruebas futuras.

En cada una de las pruebas de ELISA se utilizó el líquido ascítico A1 obtenido por inmunización de los RA con la dilución  $10^{-3}$  de la cepa MHV y posterior extracción del LAI por IP luego de la transferencia del sarcoma 180 .

Los resultados obtenidos (Tabla 3.18) permitieron verificar la reproducibilidad y estabilidad de los antígenos para la prueba de ELISA para el virus MHV cuando son alicuotados y conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**TABLA 3.18.** Prueba de estabilidad del antígeno MHV para la prueba de ELISA (a  $-70^{\circ}\text{C}$ )

Lotes de antígenos MHV	Fecha de producción	Título de Ac. Anti-MHV	Estabilidad demostrada	Título
1	Marzo 2007	12800	17 meses	12800± 1 dilucion
2	Diciembre 2007	12800	9 meses	12800± 1 dilucion
3	Abril 2008	12800	10 meses	12800± 1 dilucion
4	Octubre 2008	12800	19 meses	12800± 1 dilucion
5	Abril 2009	12800	20 meses	12800± 1 dilucion
6	Agosto 2010	12800	4 meses	12800± 1 dilucion
7	Noviembre 2010	12800	17 meses	12800± 1 dilucion

### **Cálculo aproximado del rendimiento en la obtención de los AG para las pruebas de IFI y ELISA para el virus MHV.**

La SM del virus MHV se fraccionó en viales de 0.250 mL. Con dos viales de la SM se inocularon 5 botellas T25. De cada T25 se recuperó tres mL de sobrenadante para obtener la ST (volumen total de 15 mL). La ST se inoculó a razón de 0.1 mL por botella T25, resultando en la inoculación de 150 botellas.

Las monocapas celulares se colectaron para ser utilizadas como antígeno para IFI y para antígeno para ELISA.

El número final de portaobjetos que se obtuvieron para la prueba de IFI dependió del recuento del número de células infectadas al momento de la cosecha. En promedio por cada 20 mL de suspensión celular se sembraron 100 portaobjetos a razón de 0.015 mL por spot. Mientras que para la prueba de ELISA, se recuperaron 2 mL de lisado celular por cada botella T25 los cuales son fraccionados en viales de 0.05 mL, obteniéndose un total de 40 viales de antígeno positivo. Un vial es suficiente para realizar el coating de 8 placas de antígeno positivo. En cada placa pueden procesarse 11 muestras y un control positivo. Por lo tanto en una prueba de 8 placas pueden procesarse 95 muestras y un control positivo (diluidas factor dos desde 100 a 800).

### Búsqueda del virus MHV en diferentes bioterios de Argentina

Se trabajó con muestras de sueros de ratones de diferentes especies obtenidos de distintos bioterios de Argentina. Tanto los bioterios como las muestras fueron codificados para mantener la confidencialidad de los datos. En la Tabla 3.19 se muestran los resultados hallados.

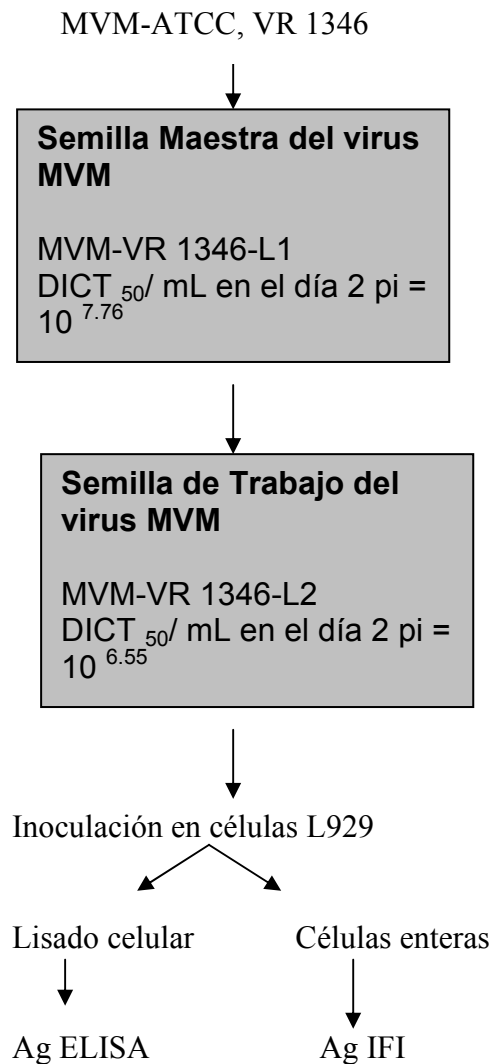
**TABLA 3.19.** Resultados de la prueba de ELISA MHV para muestras de sueros de ratones de diferentes bioterios distribuidos en la provincia de Buenos Aires y Santa Fe.

Bioterio	Positivos/Totales	
Código del bioterio	IFI	ELISA
01	0/9	0/9
02	17/21	24/27
03 (*)	0/9	0/10
04	0/12	0/12
05	13/17	15/18

(\*)Colonia convencional

### 3.3. VIRUS MVM

La cepa original de Virus Minuto de Ratón (MVM), adquirida en ATCC como se ha enunciado en Materiales y Métodos (Cap 3) fue inoculada en células L929 para su amplificación y, desde ésta, obtener el “banco” de MVM requerido para todos los ensayos comprendidos en el presente trabajo. Los procedimientos de expansión del virus se sintetizan en la Figura 3.16

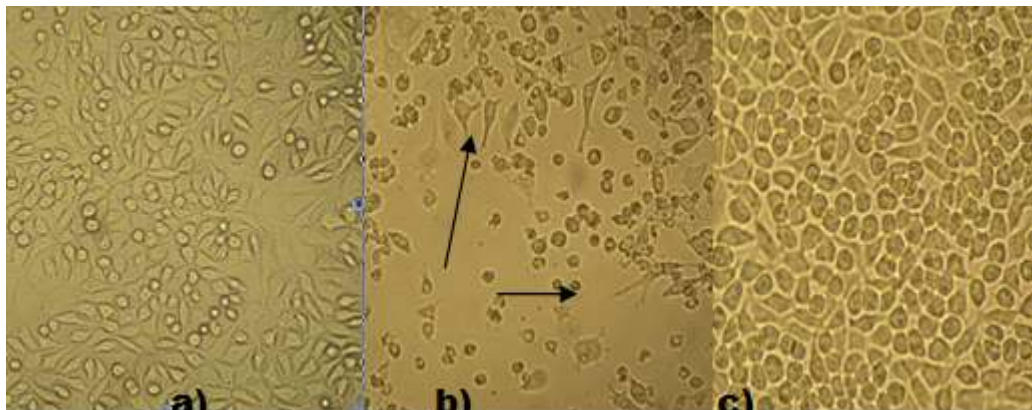


**FIGURA 3.16.** Esquema de la historia de pasajes del virus MVM utilizado para obtener los antígenos de las pruebas a desarrolladas. L1 y L2 corresponden a los pasajes 1 y 2 en células L929, respectivamente

El MVM produce en células L929 un ECP consistente en el redondeamiento y despegado progresivo de las células en función proporcional a la dilución del virus inoculado y del tiempo transcurrido desde la inoculación.

La evaluación de este ECP mediante la asignación de una a cuatro cruces, permitió la titulación de pasajes posteriores del virus, entre los que se cosecharon la SM y la ST del virus MVM utilizadas en los ensayos aquí presentados. Los títulos de la SM y ST se observan en la Figura 3.19.

En la Figura 3.17 se observa la progresión del ECP característico del MVM en las células L929, que consiste en el redondeamiento y despegado de la monocapa celular infectada con el virus.



**FIGURA 3.17.** Observación de ECP en células L929 con el virus MVM a) Día 2 pi b) Día 5 pi c) control de células sin inocular (X 400)

El título obtenido en el día 4 pi en células L 929 fue  $10^{5.75}$  DICT<sub>50</sub> / mL. Se corroboró y verificó en un próximo experimento por ECP la acción de  $10^4$  DICT<sub>50</sub>/ mL sobre las monocapas de células L929 entre los días 1 y 5 pi, seleccionándose esta dilución como inóculo para obtener la SM. De esta manera, luego de un primer pasaje en células, las monocapas de L929 se encontraron con escasa pérdida de su morfología por la acción del virus en el día 2pi. El título viral obtenido fue  $10^{7.76}$ / mL, en el día 2pi.

Al realizarse un segundo pasaje en células el título viral obtenido fue  $10^{6.55}$ / mL en el día 2pi.

### Curva de replicación del virus MVM

Se inocularon diluciones factor 10 de la ST del virus en las monocapas de células L929 y se cosecharon simultáneamente los sobrenadantes y células en diferentes días para realizar los siguientes procedimientos para la obtención de la curva de replicación viral (de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos):

- 1) Titulación del virus en el sobrenadante. Los sobrenadantes de los cultivos celulares inoculados con la ST de MVM fueron colectados en diferentes días (1 al 5 pi) para ser titulados por observación de ECP (Tabla 3.20).

**TABLA 3.20.** Título del virus MVM en sobrenadantes celulares por observación de ECP

Cosecha (Días pi)  Título de la ST viral (DICT <sub>50</sub> / mL)	1	2	3	4	5
	DICT <sub>50</sub> / mL				
10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	Neg
10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	Neg	Neg
10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	Neg	Neg	Neg
10 <sup>2</sup>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

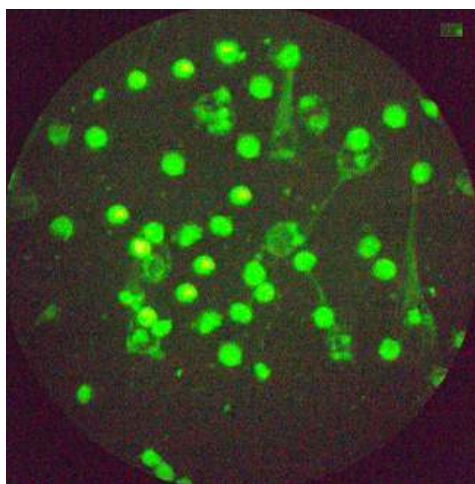
- 2) Determinación del porcentaje de células infectadas. El porcentaje de células infectadas se estableció por medio de una prueba de IFI empleando el reactivo inmune específico como se presenta en la Tabla 3.21.



**Tabla 3.21.** Porcentaje de células L929 infectadas por el virus MVM por IFI

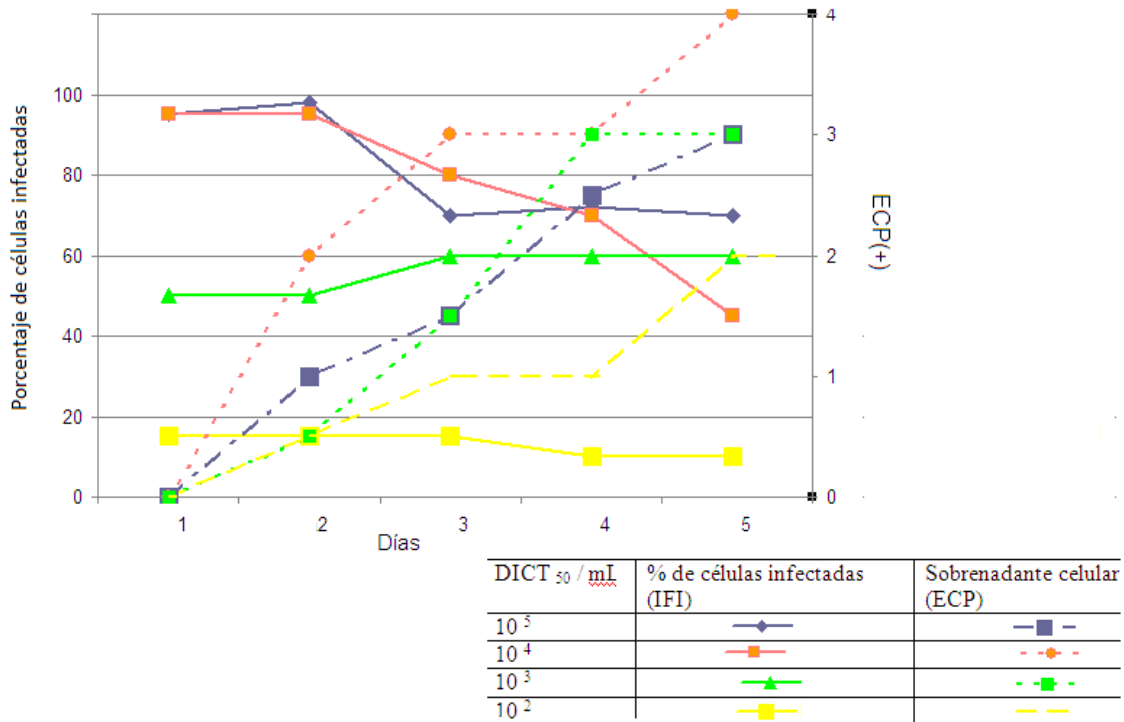
Cosecha (Días pi)	1	2	3	4	5
Título de la ST viral (DICT <sub>50</sub> /mL)	Porcentaje de células infectadas				
10 <sup>5</sup>	95	98	70	72	70
10 <sup>4</sup>	95	95	80	70	45
10 <sup>3</sup>	50	50	60	60	60
10 <sup>2</sup>	15	15	15	10	10

Según lo esperado, las células L929 obtenidas al 2do día pi positivas presentaron fluorescencia verdosa intracelular (Figura 3.18) al ser incubadas con el líquido ascítico inmune específico (A1) diluido 1:16. No se observó tinción en las células no infectadas con el virus MVM. El conjugado anti-ratón se utilizó diluido 1:20.



**FIGURA 3.18.** Células L929 positivas para el virus MVM por IFI al ser incubadas con el reactivo inmune específico el día 2pi (400X)

**Curva de replicación del virus MVM**



**FIGURA 3.19.** Curva de replicación del virus MVM. El efecto del virus en los sobrenadantes fue evaluado por ECP mientras que las células cosechadas simultáneamente, se utilizaron para evaluar el porcentaje de células infectadas (IFI).

En el día 2pi el porcentaje de células infectadas para las diluciones 1:10 ( ◆ ) y 1:100 ( ■ ) fue superior al 90% mientras que el ECP observado en los sobrenadantes respectivos ( ■ — , - -◆- - ) fue inferior a 2 + por lo que las células conservaron su integridad con escasa acción del virus sobre las mismas. En contraposición con lo ocurrido en el día 5 pi, cuando los porcentajes de células infectadas fueron inferiores al 50% y las células perdieron su morfología.

Del análisis de los datos obtenidos por evaluación del ECP y del porcentaje de células infectadas del virus MVM, se decidió emplear como SM el material que resultó del primer pasaje en células L929 de la dilución viral 10<sup>-2</sup>, (10<sup>7.76</sup> DICT<sub>50</sub> / ml) cosechado el día 2 pi. Así mismo, y manteniendo las mismas condiciones pero con un pasaje más se obtuvo la ST.

### Determinación del título de anticuerpos específicos en los reactivos inmunes obtenidos a partir de ratones inmunizados con el virus MVM

Diferentes antisueros y líquidos ascíticos obtenidos por los esquemas de inoculación (Tablas 2.6 y 2.7) se utilizaron para evaluar los spots de células infectadas por IFI. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 3.22.

**TABLA 3.22.** Título hallado IFI de muestras de sueros y ascitis de ratones inmunes

Inoculo en ratón (DICT <sub>50</sub> / mL)	Muestra obtenida (Código de referencia)	Título de Ac.por IFI
10 <sup>4</sup> de la cepa original de MVM	Suero (AA)	128
	Ascitis (A1)	64
10 <sup>3</sup> de la cepa original de MVM	Suero (BB)	64
	Ascitis (B1)	64
10 <sup>6</sup> de la ST cosechada el día 2 pi	Suero (CC)	32
10 <sup>6</sup> de la ST cosechada el día 3 pi	Suero (DD)	32
10 <sup>6</sup> de la ST cosechada el día 2 pi + 1 pasaje en células L929 cosechado el 5 pi	Suero (EE)	32

En todos los esquemas, los RA fueron inmunizados con 0,02 ml de la dilución viral mediante una única inoculación intranasal.

La menor respuesta inmune de los ratones obtenida por la inoculación del sobrenadante celular es coincidente con los datos obtenidos de la observación de ECP para el mismo inóculo. El sobrenadante del día 2 pi muestra nulo o escaso ECP sobre las células.

### Reproducibilidad de la prueba de IFI

Para establecer la reproducibilidad de estos resultados se realizaron varias pruebas consecutivas de IFI (Figuras 3.20 y 3.21) con el suero AA y el líquido ascítico A1, obtenidas por inmunización de RA.

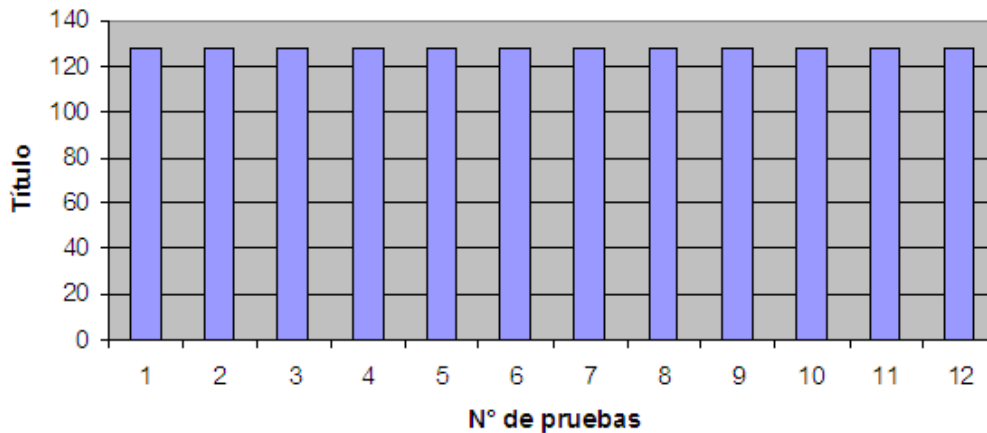


FIGURA 3.20. Título de anticuerpos específicos en suero para el virus MVM por IFI. Se procesó la misma muestra de suero (AA) de RA en días diferentes y en las mismas condiciones.

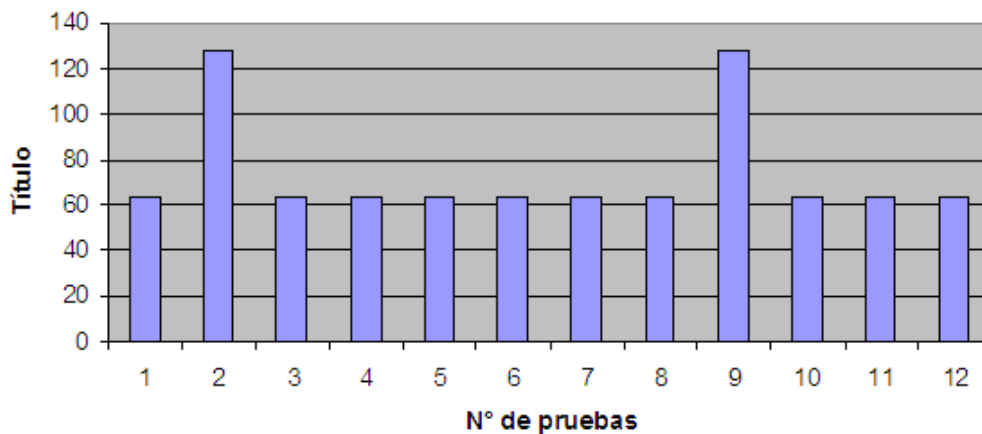


FIGURA 3.21 Título de anticuerpos específicos en LAI para el virus MVM por IFI. Se procesó la misma muestra de líquido ascítico (A1) de RA en días diferentes y en las mismas condiciones

El suero inmune procesado por la prueba de IFI mantuvo el título de 128 en las distintas pruebas llevadas a cabo en las mismas condiciones, mientras que el líquido ascítico tuvo un título de 64 con una variación en el mismo no mayor de una dilución entre las sucesivas pruebas. Por lo tanto, los resultados presentados en las Figuras 3.25 y 3.26 demuestran la alta reproducibilidad de los mismos.

### **Determinación del título por ELISA de anticuerpos específicos en los reactivos inmunes obtenidos a partir de ratones inmunizados con el virus MVM**

Con el conocimiento previo de la presencia de anticuerpos para el virus MVM en los reactivos inmunes, sueros y ascitis de RA, se procedió titularlos por la prueba de ELISA desarrollada. Los resultados se observan en la Tabla 3.23.

**TABLA 3.23.** Título de sueros y ascitis obtenido por la prueba de ELISA para el virus MVM

Muestra	Nº de repetición- Título		
	1	2	3
AA	6400	3200	3200
BB	6400	6400	3200
CC	1600	1600	1600
A1	800	800	800
B2	200	200	200

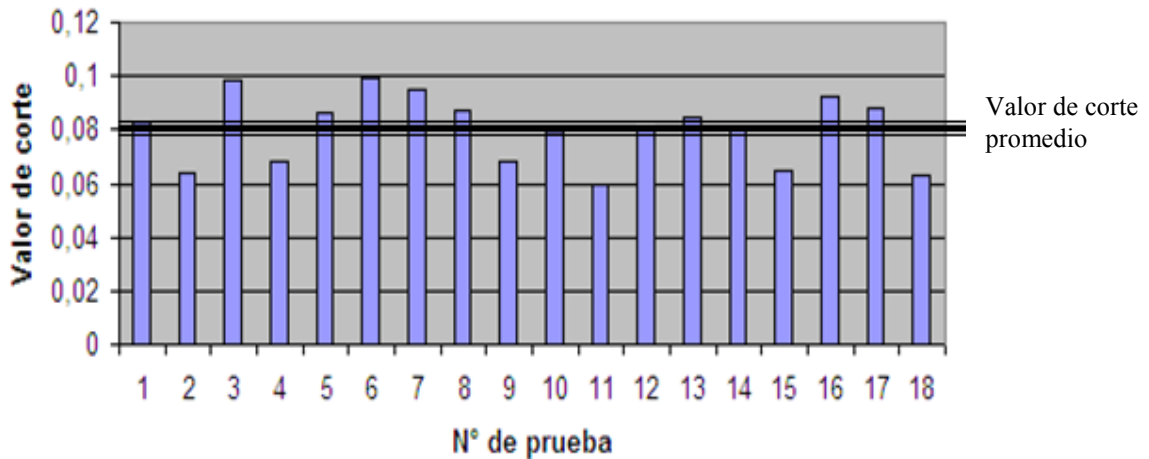
Por medio de la comparación de los títulos obtenidos en ensayos consecutivos (Tabla 3.23) empleando las mismas muestras de ascitis y sueros se demostró la reproducibilidad de la técnica de ELISA.

### **Condiciones para realizar la prueba de ELISA para el virus MVM**

Estos resultados se obtuvieron por inoculación de la ST viral sd ( $\sim 10^6$  DICT<sub>50</sub>/mL) en las células L929 y el día 1 pi se colectaron las células para ser sonicadas y utilizadas como antígeno para la prueba de ELISA. La dilución del antígeno en la prueba fue 1/400, la dilución del conjugado 1/2000 con PBS, pH 7.4, sin calcio y sin magnesio, 0,1 % de Tween 20 y 5 % de leche de vaca.

Éstas resultaron las condiciones óptimas para realizar el test. La reproducibilidad de los títulos obtenidos con los reactivos inmunes (Tabla 3.23.) permitió la selección y empleo del suero AA y del LAI A1.

A partir de la evaluación del antígeno en las distintas condiciones de prueba, se demostró que el 95 % de los valores de corte se encuentran en el intervalo (0,074-0,086) con el antígeno obtenido en células L929, ya que el valor de corte promedio fue 0,080, con un desvío estándar de 0,0125 según se muestra en la Figura 3.22. Se desarrolló una elevada absorbancia con los controles positivos y no se produjo reacción inespecífica con los controles negativos.



**FIGURA 3.22.** Valores de cortes obtenidos de las muestras negativas en diferentes pruebas de ELISA

### **Estimación preliminar del valor de corte para títulos de anticuerpos específicos obtenidos por ELISA**

La linealidad en los valores de los títulos de anticuerpos fue buscada mediante la titulación de tres sueros y ascitis con anticuerpos específicos inducidos por el virus MVM. Se ensayaron las mismas muestras sin diluir y diluidas en factor 10 en las pruebas de IFI y ELISA según se muestra en la Tabla 3.24

**TABLA 3.24.** Comparación de los títulos correspondientes a muestras de sueros y ascitis inmunes procesados por las dos técnicas.

Muestras	Dilución	ELISA	IFI
AA	s/d	3200	64
	1:10	1600	32
	1:100	200	Neg
	1:1000	Neg	Neg
BB	s/d	6400	128
	1:10	3200	64
	1:100	800	32
	1:1000	100	Neg
CC	s/d	1600	32
	1:10	800	16
	1:100	200	8
	1:1000	Neg	Neg
A1	s/d	800	32
	1:10	200	4
	1:100	Neg	Neg
	1:1000	Neg	Neg
A1 (*)	s/d	800	32
	1:10	200	Neg
	1:100	Neg	Neg
	1:1000	Neg	Neg
B1	s/d	3200	64
	1:10	200	Neg
	1:100	Neg	Neg
	1:1000	Neg	Neg

A1 y A1(\*) : Ascitis de RA inmune obtenidos los día 21 y 32 pi , luego de la inoculación con  $10^4$  DICT<sub>50</sub>/mL del virus MVM

Con estos datos se realizó una estimación preliminar de un valor de corte para los títulos de anticuerpos específicos obtenidos por ELISA basándose en las discordancias encontradas entre los ensayos de IFI y ELISA, como se presenta en la Tabla 3.25.

**TABLA 3.25.** Títulos obtenidos por ELISA e IFI para diferentes muestras de sueros y líquidos ascíticos inmunes de ratón

MUESTRAS	ELISA	IFI
AA	$\geq 800$	32
BB		32
CC		16
A1		32
A1(*)		32
B1		64

Estos datos permitieron proponer preliminarmente como valor de corte la dilución  $\geq 1:800$  para considerar un resultado positivo, ya que todo título cuyo valor sea  $\geq 800$  se observa acompañado de un resultado positivo en IFI. Con un número suficiente de muestras, estos pares de valores permitirán la validación de ELISA e IFI.

#### **Cálculo aproximado del rendimiento en la obtención de AG para las pruebas de IFI y ELISA para el virus MVM**

La SM del virus MVM se fraccionó en viales de 0.150 mL. Con dos viales de la SM se inoculó 2 botellas T25. De cada T25 se recuperó tres mL de sobrenadante para obtener la ST (volumen total de 6 mL). La ST se inoculó a razón de 0.1 mL por botella T25. Las monocapas celulares se colectaron para ser utilizadas como antígeno para IFI y para antígeno para ELISA.

El número final de portaobjetos que se obtuvieron para la prueba de IFI dependió del recuento del número de células infectadas al momento de la cosecha. En promedio por cada 20 mL de suspensión celular se sembraron 100 portaobjetos a razón de 0.015 mL por spot. Mientras que para la prueba de ELISA, se recuperaron 0,5mL de lisado celular por cada 4 botellas T25 los cuales son fraccionados en viales de 0.05 mL, obteniéndose un antígeno positivo. Un vial es suficiente para realizar el coating de 8 placas de antígeno



positivo. En cada placa pueden procesarse 11 muestras y un control positivo.

Por lo tanto en una prueba de 8 placas pueden procesarse 95 muestras y un control positivo (diluidas factor dos desde 100 a 800).

### **Reproducibilidad, consistencia y estabilidad de los antígenos obtenidos para las prueba de ELISA para el virus MVM**

La reproducibilidad de cada lote de antígeno fue establecida por la realización de al menos tres pruebas consecutivas en un número elevado de muestras. Las muestras que se utilizaron fueron obtenidas por inmunización de RA.

Entre octubre de 2010 y noviembre de 2011 se produjeron dos lotes de antígenos MVM siguiendo el protocolo descrito en la Figura 2.17.

Los resultados de cada nuevo lote fueron controlados con los resultados del procesamiento de la misma muestra con un lote de antígeno anterior. En cada una de las pruebas de ELISA se utilizó el suero inmune AA.

Los resultados obtenidos (Tabla 3.26) permitieron verificar la reproducibilidad y estabilidad de los antígenos para la prueba de ELISA para el virus MVM cuando son alicuotados y conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**TABLA 3.26.** Prueba de estabilidad del antígeno MVM para la prueba de ELISA ( $-70^{\circ}\text{C}$ )

Lotes de antígenos MVM	Fecha de producción	Título Ac. Anti-MVM	Estabilidad demostrada	Título
1	Octubre de 2010	3200	22 meses	3200± 1 dilución
2	Noviembre de 2011	1600	7 meses	1600± 1 dilución

### Búsqueda del virus MVM en diferentes bioterios de Argentina

Se trabajó con muestras de sueros de ratones de diferentes especies obtenidos de distintos bioterios de Argentina. Tanto los bioterios como las muestras fueron codificados para mantener la confidencialidad de los datos. En la Tabla 3.27 se muestran los resultados hallados.

**TABLA 3.27.** Resultados de la prueba de ELISA MVM para muestras de sueros de ratones de diferentes bioterios distribuidos en la provincia de Buenos Aires y Santa Fe.

Bioterio	Positivos/ estudiados	
Código del bioterio	IFI	ELISA
01	0/12	0/12
02	21/ 21	24/ 24
03(*)	0/10	0/12
04	0/11	0/12
05	0/12	0/12

(\*) Colonia convencional de ratones

## **CAPITULO 4**

# **DISCUSION**

**Y**

# **CONCLUSIONES**

#### 4.1. DISCUSION

A lo largo de los años se han demostrado un gran número de agentes contaminantes de los animales usados en el laboratorio con impacto en las actividades de investigación y/o de producción que los emplean. Según Weisbroth (Weisbroth et al.,1998), desde 1880 a 1950 hubo un período de domesticación de animales para uso experimental y muchos de estos stocks presentaban una gran variedad de patógenos naturales. Distintos estudios mostraron que algunos lotes de vacuna anti-polio preparados entre 1954 y 1961 fueron contaminados con el virus simiano SV40 (Cox,1953; Cutrone et al.,2005), Posteriormente, el virus SV40,como contaminante adventicio, reapareció en las semillas de virus polio usadas para la vacuna atenuada Sabin (Sabin AB,1973) que constituyó la siguiente generación de vacunas para polio. Con el mismo origen en monos donantes, SV40 también contaminó una vacuna a virus respiratorio sincicial y una vacuna para adenovirus (Shah and Nathanson,1976).

De la misma manera que lo relatado para vacunas anti-polio, muchos agentes no solamente afectan a los animales y a los experimentos, sino que también contaminan tumores, líneas celulares, células stem embrionarias, sueros y otros productos generados en o pasados por animales infectados difícilmente evaluables y con probabilidad escasa de ser reconocidos.

La búsqueda permanente de todos los contaminantes citados en las colonias de cría de ratones es de muy difícil abordaje, tanto desde el punto de vista técnico como económico. Por ello, el monitoreo regular para la detección de contaminantes virales se hace para los agentes más frecuentemente encontrados, a los que se considera indicadores subrogantes de la circulación de virus adventicios en las colonias. Estos agentes son:

- Sendai (Virus Sendai)
- MVM (Virus minuto del ratón)
- MHV (Virus de la hepatitis murina)

En consecuencia, en todos los sistemas de monitoreo para bioterios de ratones SPF se debe establecer un programa regular de búsqueda de estos tres virus, que se implementan con la detección de anticuerpos específicos. Esta eficiente estrategia se basa en el conocimiento de la duradera respuesta inmune que genera en los animales el contacto con estos virus.

Históricamente, en Argentina no se ha monitoreado a los animales experimentales. En los últimos 15 años, se ha tomado conciencia creciente de la importancia de este tema y algunas instituciones utilizan para este propósito kits comerciales que permiten la detección de anticuerpos para Sendai, MHV y MVM mediante pruebas de ELISA. Ellos deben adquirirse a fabricantes confiables de otros países. Son reactivos de alto costo y para un limitado número de muestras. A la estabilidad relativamente baja de los mismos ( $\approx$  30 días) se deben agregar los trámites aduaneros y las incertidumbres sobre la cadena de frío durante el transporte.

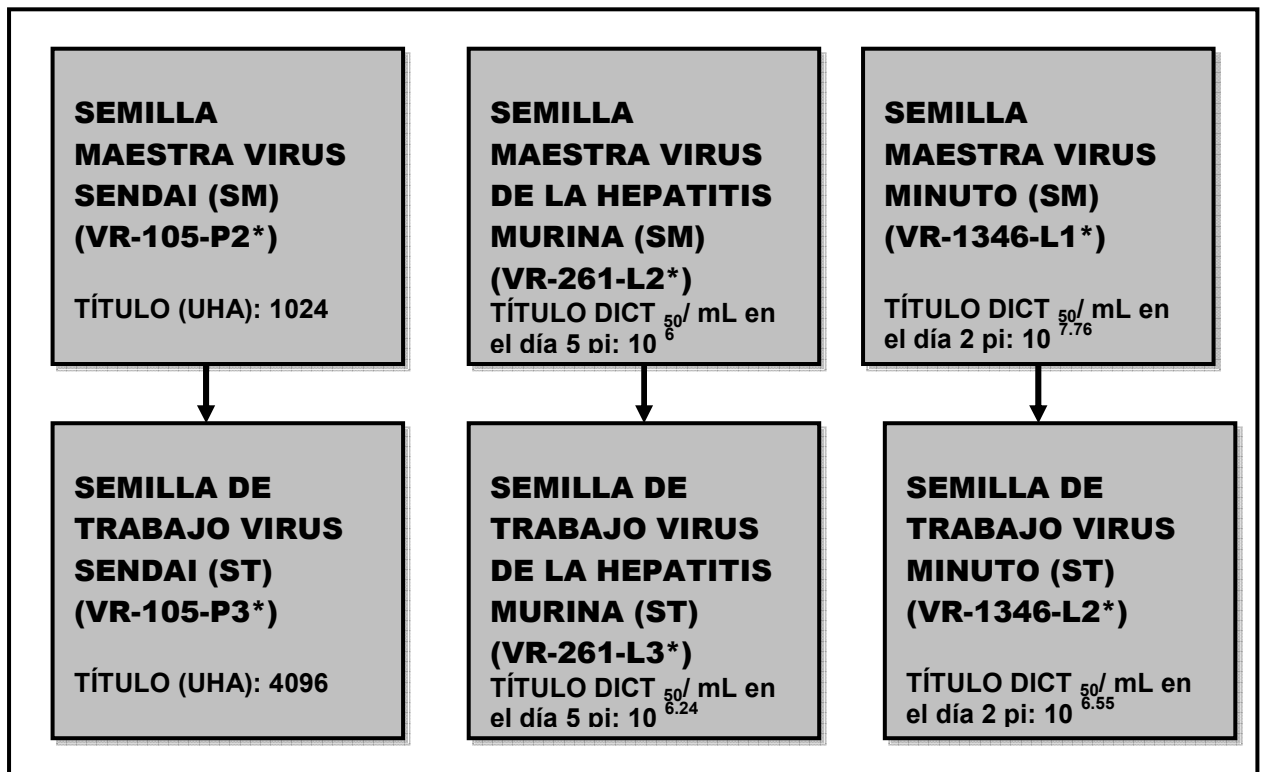
Para disponer de sistemas desarrollados en Argentina, que permitan realizar estos monitoreos en cualquier momento del año y estén al alcance presupuestario de todas las instituciones, el presente trabajo de Tesis tuvo como objetivo principal desarrollar y analizar las condiciones de implementación de pruebas de IFI y ELISA para los virus Sendai, MHV y MVM, demostrándose su utilidad en la detección de estas infecciones virales.

La primera etapa que se abordó fue la obtención de cepas virales con historial definido de pasajes y con certificaciones de identidad y pureza. Para ello, se recurrió al American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md, USA), realizándose todas las presentaciones requeridas por este centro de reposición mundial para la provisión de las cepas ATCC VR-105 (Virus Sendai), ATCC VR-261 (Virus Hepatitis Murina 1, Parkes) y ATCC VR- 1346 (Virus Minuto del Ratón). Esta selección se basó en consultas bibliográficas a partir de las cuales se concluyó que, con las cepas obtenidas, que cruzan serológicamente con todas las cepas reportadas de cada especie viral, se podía tener una vigilancia serológica suficiente para los tres virus y algunos otros. Se puede citar como ejemplo que la búsqueda de Sendai como indicador de contaminación viral en las colonias de cría ha permitido descubrir la

circulación en bioterios de Parinfluenza humano tipo 3, un virus patógeno para humanos que exhibe una importante reactividad cruzada con Sendai (Miyata et al., 2005) otro objetivo a considerar al utilizarse las pruebas serológicas desarrolladas en este trabajo.

Con cada una de las cepas virales mencionadas se realizaron los experimentos encaminados a la búsqueda de un huésped adecuado para expandir las cepas y obtener un “banco” de Semillas Maestra y de Trabajo (Capítulo Materiales y Métodos) para los tres virus, cuyo historial y títulos se resumen en la Figura 4.1. Estas cepas fueron seleccionadas luego de extensas consultas bibliográficas a partir de las cuales se concluyó que las mismas cruzan serologicamente con todas las cepas reportadas de cada especie viral, se podía tener una vigilancia serológica suficiente para los tres virus y algunos otros a los que se hará referencia más abajo.

**FIGURA 4.1.** Características de las Semillas de los virus Sendai, MHV y MVM desarrolladas y utilizadas en esta Tesis.



(\*) P2 y P3 corresponden a los pasajes 2 y 3 en HE de pollo. L1, L2 y L3 corresponden a los pasajes 1, 2 y 3 en células L929.

Este banco de semillas virales proporcionó material homogéneo para realizar todos los ensayos necesarios en el estudio de la cinética de replicación de cada agente en el cultivo celular seleccionado, a fin de establecer en días consecutivos la distribución de cada virus en células y sobrenadantes de los cultivos celulares infectados. La determinación del porcentaje de células infectadas se realizó mediante pruebas de IFI, donde las células infectadas se enfrentaron a anticuerpos específicos.

## **OBTENCION DE REACTIVOS INMUNES**

Los reactivos inmunes constituyeron otra etapa decisiva en el desarrollo de este trabajo. Encontrar y estandarizar metodologías para obtener reactivos inmunes específicos para los tres virus estudiados demandó una prolongada búsqueda bibliográfica y consulta a expertos que, en el mundo, trabajan con alguno de los agentes aquí estudiados. A través de numerosos experimentos se buscó obtener, para cada virus, al menos un reactivo inmune con alto título de anticuerpos específicos y en volumen suficiente para utilizarlo en

- Identificar células infectadas
- Probar reacciones específicas en los test a desarrollar y adoptarlos como material inmune positivo de referencia

Los experimentos se orientaron a encontrar un huésped de fácil mantenimiento, que pudiera inmunizarse con el menor número de aplicaciones del antígeno, a partir del cual se pudiera colectar un volumen suficiente del reactivo inmune buscado, de buena reactividad específica, a obtenerse en el menor tiempo posible. En el capítulo 2 se describen las estrategias que resultaron exitosas para inmunizar ratones adultos, que fueron los huéspedes de elección. Para los tres virus estudiados se inmunizó a los animales mediante una única dosis del antígeno, por la vía IN, cosechándose sueros o líquidos ascíticos inmunes en un período no mayor a 37 días post-inoculación. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 3.4 y 3.5 para virus Sendai; 3.14 y 3.15 para MHV; 3.22 y 3.23 para MVM, y se resumen en la Tabla 4.1.

Se encontró que los sueros inmunes obtenidos para los tres agentes resultaron en los mejores títulos de anticuerpos, (128 a 1024 en IFI; 800 a 204.800 en ELISA), aunque escasos en volumen. Por esto, los líquidos ascíticos inmunes para cada virus fueron los reactivos de referencia utilizados porque presentaron títulos de anticuerpos comparables a los respectivos sueros inmunes y se pudieron cosechar en volúmenes adecuados para que cada pool de cosecha pueda utilizarse en un número de pruebas como control positivo.

**TABLA 4.1.** Título de anticuerpos obtenido para cada virus de acuerdo al reactivo inmune y a la técnica de empleada.

Agente viral	Número de dosis/ vía de inoculación	Día óptimo de cosecha	Reactivo obtenido	Prueba	Título de anticuerpos
Virus Sendai	Única/ IN	21	SI	IFI ELISA	128 204800
		34	LAI	IFI ELISA	256 12800
MHV		23	SI	IFI ELISA	1024 12800
		37	LAI	IFI ELISA	2048 6400
MVM		21	SI	IFI ELISA	128 6400
		32	LAI	IFI ELISA	64 800

La posibilidad de inmunizar a los animales con una única aplicación de antígeno por vía IN resultó en una notable ventaja porque, al disminuir el número de estimulaciones, se esperan antisueros más específicos conteniendo anticuerpos de adecuada avidéz, acortándose los tiempos de su recolección.



La vía de estimulación IN, no invasiva, resultó también ventajosa en la ausencia de efectos adversos en los animales.


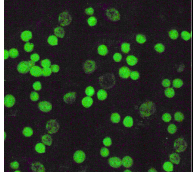
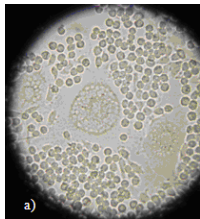
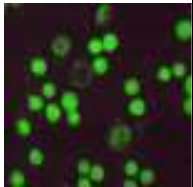

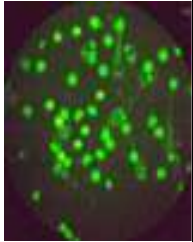
## **IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS INFECTADAS**

En base a los datos mostrados de replicación de los tres virus en cultivos celulares y la experiencia en nuestros laboratorios, los antígenos a utilizarse en las pruebas a desarrollar debían ser células infectadas tripsinizadas (enteras) en IFI, u homogenizadas por sonicación en ELISA. Para ambos propósitos, se requirió la puesta a punto de un método que permitiera distinguir específicamente a las células infectadas en un cultivo y realizar un recuento de las mismas. Para esto, se utilizaron cultivos celulares infectados con los tres virus, estudiándose:

- Si el virus producía ECP, en qué consistía y, si éste conducía a la destrucción progresiva del cultivo, en qué día se podía observar. La cosecha de células a usarse como Ag debía ser previa al excesivo avance del ECP
- Determinación preliminar de concentraciones de IgG específica y anti-IgG totales marcadas por observación de tinción específica de las células

En la Tabla 4.2 se sintetizan características del comportamiento de cada virus estudiado en el sustrato celular seleccionado. También se presentan datos relevantes para la posterior cosecha de células infectadas con cada virus, a utilizarse como antígenos en las pruebas de IFI y ELISA

**TABLA 4.2.** Comportamiento de cada virus en el sustrato celular seleccionado.

Virus	ECP	Máximo ECP	Días de observación	Concentración de ac. específicos usado en suero	Concentración de anti-IgG en el día óptimo	Imagen IFI
S E N D A I		10 días	12	256± 1 dilución	1 :20	 Día 7
M H V		7 días	10	1024± 1 dilución	1 :20	 Día 5
M V M		3 días	5	128± 1 dilución	1 :20	 Día 1 pi

Los resultados hasta aquí obtenidos brindaron una herramienta para buscar un día óptimo de cosecha de células infectadas para usar como antígenos. El paso siguiente fue el estudio secuencial de la distribución de cada virus en células infectadas y sobrenadantes de los correspondientes cultivos celulares infectados.

## LAS CURVAS DE REPLICACIÓN VIRAL

La obtención de curvas representativas de la cinética de replicación y distribución de virus en cada sistema virus-cultivo celular resultó una base de información decisiva. El mejor antígeno sería aquel obtenido con la cosecha que incluyera el mayor porcentaje de células infectadas. Cada virus en estudio fue inoculado en cultivos celulares susceptibles y, con la metodología descrita en página 96 y la información obtenida sobre la evolución del ecp en cada sistema virus- células, se estableció un período durante el cual, en días consecutivos, se cosecharon células y sobrenadantes de cultivos infectados (Capítulo 2). Se determinó el contenido viral en los sobrenadantes en los días estudiados (resultados mostrados en Figuras 3.4; 3.11 y 3.19, Tablas 3.2, 3.3, 3.11, 3.13, 3.20, 3.21) y se sembraron las células infectadas en portas para su identificación y recuento por IFI. En la Tabla 4.3 se resumen las condiciones de inoculación, así como el momento post-inoculación en que se obtienen los porcentajes más altos de células infectadas.

**TABLA 4.3.** Cosecha de antígenos virales

Agente viral	Sustrato celular	Inóculo	Porcentaje de células infectadas	Día pi de cosecha
Virus Sendai	LLCMK <sub>2</sub>	0.1 UHA de la ST	90	7
Virus de la hepatitis murina (MHV)	L929	~10 <sup>5</sup> DICT <sub>50</sub> / mL	90	4
Virus minuto o diminuto de ratón (MVM)	L 929	~10 <sup>6</sup> DICT <sub>50</sub> / mL	95	1

La evolución del porcentaje de células infectadas con cada virus se representa en la Figura 4.2 donde se observa que el día 7 pi es el momento óptimo para la cosecha de células infectadas con virus Sendai, y los días 4 y 1 pi para los virus MHV y MVM, respectivamente.

La selección de los mencionados momentos de cosecha dependió de la celeridad con que el ECP de cada virus resultaba en el desprendimiento de las células en la monocapa. Si este proceso estaba iniciado al momento de cosechar las células para siembra de los portas, la imagen celular en IFI aparecía con bordes poco nítidos, luminiscencia de menor intensidad y mayor inespecificidad (background).

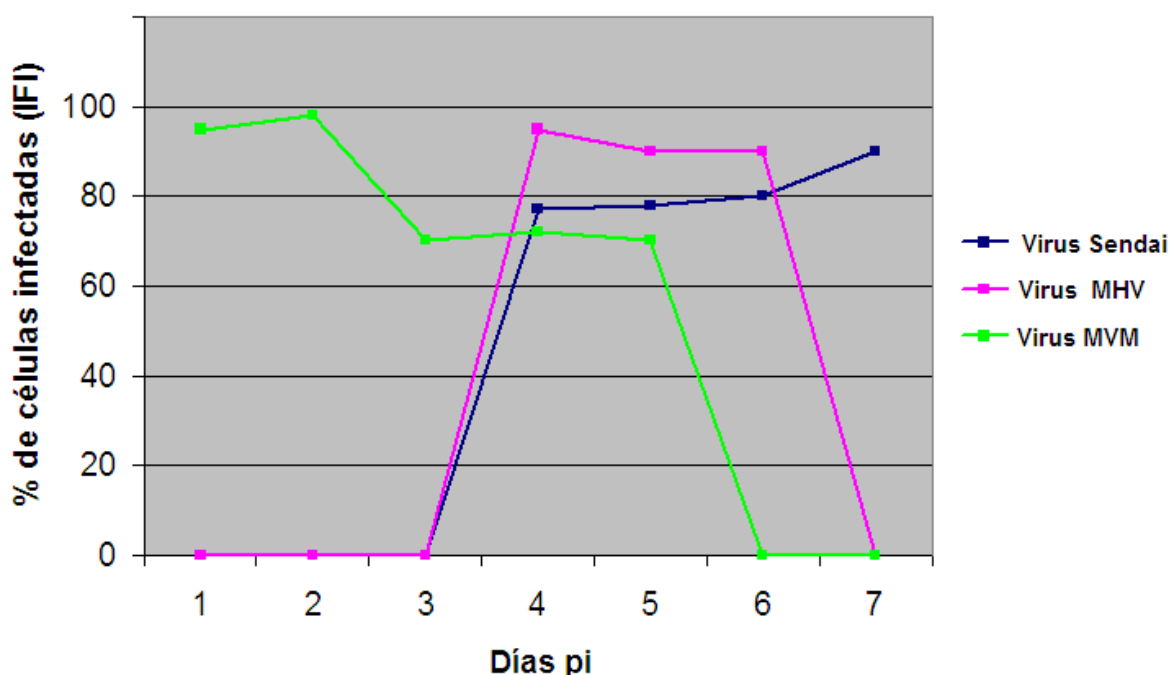


FIGURA 4.2. Curvas de replicación para cada virus en condiciones óptimas

## PUESTA A PUNTO DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS

En una primera etapa se buscó identificar a las células infectadas por cada virus entre las sembradas en los portas, ya que provenían de cultivos infectados que posteriormente desarrollaban ECP. Para ello, y con la experiencia previa de la búsqueda de otros virus, se utilizó un ensayo preliminar de IFI. Este resultaba un método adecuado porque, al ser una prueba indirecta, un suero marcado anti-IgG de ratón revela el pegado de anticuerpos específicos a una célula infectada. Las pruebas preliminares permitieron obtener los primeros datos decisivos como la presencia y abundancia relativa (%) de células infectadas y, por otra parte, verificar la presencia de anticuerpos específicos en los sueros y LAI obtenidos de los

ratones inmunizados. En consecuencia, este ensayo preliminar de IFI se utilizó como base para todos los experimentos del presente trabajo, con algunos ajustes: la concentración óptima de siembra para los spots fue  $5 \times 10^5$  cel/ml y se utilizó en todos los casos suero de cabra anti-Ig totales de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína de origen comercial (Gibco # 660-3432) diluido 1:20. Con estas condiciones se determinaron los días óptimos para la cosecha de células infectadas y se procedió a la titulación de los reactivos inmunes. Los resultados obtenidos fueron reproducibles, correlativos a las diluciones del antisuero y a los resultados obtenidos por IHA y/o ELISA (Tablas 3.6; 3.16 y 3.24).

Los datos obtenidos utilizando la IFI en cada sistema virus-células, así como los títulos de anticuerpos específicos en los LAI adoptados como referencias, permitieron buscar las condiciones óptimas de la cosecha de antígeno de cada virus para su utilización en pruebas de ELISA. En la Tabla 4.4 se resumen las condiciones encontradas.

**TABLA 4.4.** Esquema de obtención de AG para la prueba de ELISA en determinación de anticuerpos para los virus Sendai, MHV y MVM

Virus	Línea celular	Tiempo de adsorción del virus	Condiciones para la incubación	Resultado
0.1 - 0.01 UHA de la ST del virus Sendai	LLCMK <sub>2</sub>	60 minutos 37°C, 5% de CO <sub>2</sub>	7 días a 37°C, 5% de CO <sub>2</sub>	Cosecha de antígeno Sendai
$\sim 10^6$ DICT <sub>50</sub> /mL de la ST de MHV	L929	60 minutos 37°C, 5% de CO <sub>2</sub>	4 días a 37°C, 5% de CO <sub>2</sub>	Cosecha de antígeno MHV
$\sim 10^6$ DICT <sub>50</sub> /mL de la ST de MVM	L929	90 minutos 37°C, 5% de CO <sub>2</sub>	24 hs a 37°C, 5% de CO <sub>2</sub>	Cosecha de antígeno MVM

Los antígenos para cada virus fueron cosechados en lotes detalladamente identificados y documentados, que se fraccionaron en alícuotas convenientes para su conservación a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Encontradas las condiciones de realizar adecuadamente el “coating” de las placas (fase sólida) con cada antígeno, se ajustaron condiciones de importancia para optimizar los respectivos tests de ELISA desarrollados en el presente trabajo, para determinación de anticuerpos IgG específicos. Se realizaron experimentos para ajustar las diluciones a utilizar con cada antígeno, se probaron diferentes composiciones del diluyente para las muestras y el conjugado, así como determinar el punto de corte para cada prueba. En la Tabla 4.5 se resume la optimización de las variables ajustadas para las pruebas de ELISA.

**TABLA 4.5.** Condiciones para la prueba de ELISA

Virus	Diluyente del antígeno	Dilución del antígeno	Diluyente de las muestras y del conjugado	Dilución del conjugado	Revelador	Solución de lavado de las placas
Sendai	PBS pH 7,4 sin calcio y sin magnesio	1/400	5% de SFB 0,1% de Tween 20	1/ 4000	Sustrato ABTS(2.2.-azino-di(3-etil-benzotiazolin sulfonato(6)) 1:1con agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).	PBS pH 7,4 sin calcio y sin magnesio 0,1% de Tween 20
MHV		1/800	5% de SFB 0,1% de Tween 20	1/4000		
MVM		1/400	5% de leche de vaca 0,1% de Tween 20	1/2000		

Los resultados obtenidos al titular antisueros de referencia mediante las pruebas de ELISA en las condiciones descritas fueron reproducibles, correlativos a las diluciones del antisuero y a los resultados obtenidos por IFI para cada virus en estudio (Tablas 3.6; 3.16 y 3.24). En base a estas comparaciones, se establecieron los siguientes puntos de corte, para considerar positivo un resultado por ELISA para

- Virus Sendai (Tabla 3.7):  $\geq 800$

- Virus de la Hepatitis Murina (Tabla 3.17):  $\geq 400$
- Virus Minuto del Ratón (Tabla 3.25):  $\geq 800$

Estos puntos de corte se establecieron de manera preliminar dado que las pruebas fueron implementadas con reactivos inmunes conocidos. La utilización en nuestras instalaciones, así como la encuesta de bioterios de Argentina ya iniciada, permitirán contar con una base de datos aceptablemente variada y extensa como para utilizarlos en la validación de las pruebas serológicas desarrolladas en este trabajo.

### **UTILIZACION DE LAS PRUEBAS DESARROLLADAS EN ENCUESTA SEROLÓGICA DE BIOTERIOS**

Con el objeto de ampliar el campo de aplicación de los ensayos desarrollados en el presente trabajo, desde mediados del 2011 se ha realizado una convocatoria, por la vía del correo electrónico, a los responsables de todos los bioterios registrados en la base de datos del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Argentina. Se los invitó a proveer muestras de sueros de no menos de 20 animales por colonia de cría para participar en la búsqueda de anticuerpos específicos para los virus Sendai, MHV y MVM. Cada institución fue instruida para enviar las muestras de sueros individuales o los animales vivos para proceder en el INEVH al sangrado y separación de los sueros individuales. Los resultados obtenidos a partir de las muestras remitidas por los primeros cinco bioterios, estudiadas por las pruebas desarrolladas de IFI Y ELISA (codificados por razones de confidencialidad) se resumen en la Tabla 4.6

**TABLA 4.6.** Resultados de la encuesta serológica a los bioterios

Bioterio	Positivos/ estudiados (*)					
	Virus Sendai		Virus MHV		Virus MVM	
Código del bioterio	IFI	ELISA	IFI	ELISA	IFI	ELISA
01	0/10	0/10	0/9	0/9	0/12	0/12
02	0/8	0/8	17/21	24/27	21/ 21	24/ 24
03(**)	0/24	0/24	0/9	0/10	0/10	0/12
04	0/11	0/11	0/12	0/12	0/11	0/12
05	0/11	0/11	13/17	15/18	0/12	0/12

(\*) Las diferencias en los denominadores se deben a que, en algunos casos, la muestra de suero individual no era suficiente en volumen para ser procesada en ambas pruebas por los tres virus.

(\*\*)Colonia convencional

En dos de los cinco bioterios estudiados hasta el presente (02 y 05) se encontraron resultados positivos para el Virus de la Hepatitis Murina, y en uno de estos bioterios (02) se detectó también actividad del MVM. Todos los resultados fueron de inmediato comunicados a las respectivas instituciones remitentes, solicitándose nuevas muestras, ya que la confirmación del dato que indique circulación de uno o más de estos agentes implica una importante toma de decisiones. No es aconsejable el tratamiento de los animales infectados porque no se ha demostrado que sea posible la eliminación definitiva de estos virus en los bioterios contaminados.



## 4.2. CONCLUSIONES

Un aporte innovador de nuestro trabajo fue el desarrollo de estrategias experimentales (IFI y ELISA) para la detección de los virus Sendai, MHV y MVM, aplicadas luego al control sanitario del bioterio del INEVH y de otras instituciones. En los primeros resultados obtenidos se observó una buena correlación entre IFI y ELISA para cada virus estudiado, indicando que estas dos pruebas son una batería adecuada para la vigilancia serológica de los tres contaminantes estudiados.

El monitoreo iniciado en Bioterios de Argentina será continuado en función de la afluencia de muestras, a fin de obtener un banco de datos representativo de la circulación de estos virus. A su vez la información obtenida podrá ser comparada con estudios similares de otros países. La obtención de un número suficiente de datos posibilitará la aplicación de estudios estadísticos empleados en procedimientos de validación para técnicas serológicas convencionales.

Nuestros estudios permitirán afianzar las bases para un kit diagnóstico viable y económicamente accesible para otras instituciones. Al respecto, es importante mencionar que los cálculos de aplicación de las técnicas presentadas resultan en un costo aproximado de \$4,50 /determinación, en contraste con el costo de la vigilancia con kits de origen extranjero que es del orden de \$ 30/ determinación. Sumado a las ventajas de costo, se deben considerar las condiciones ventajosas de disponibilidad por prolongados periodos de los reactivos desarrollados, según lo demuestran los datos de estabilidad que se resumen en la Tabla 4.7 Allí se observa que los antígenos para el "coating" de las placas de ELISA (conservados a -70°C) pueden utilizarse, según el virus de que se trate, hasta un período de 20 a 67 meses, en tanto los "spots" para IFI pueden almacenarse a -40°C entre 15 y 68 meses.

**TABLA 4.7.** Estabilidad de los antígenos para las pruebas de ELISA e IFI

Virus	Técnica	Lotes producidos	Estabilidad máxima demostrada (meses)	Título en suero
Virus Sendai	ELISA (*)	4	67	25600± 1 dilución
	IFI (**)	2	68	256 ± 1 dilución
Virus MHV	ELISA	5	20	12800 ± 1 dilución
	IFI	2	60	1024 ± 1 dilución
Virus MVM	ELISA	2	22	3200± 1 dilución
	IFI	2	15	128 ± 1 dilución

(\*) Lisado de células (a -70°C)

(\*\*) Spots con células enteras fijadas con acetona (a -40 °C)

### **Finalmente, los resultados del presente trabajo de Tesis han permitido**

- Disponer y ofrecer pruebas de IFI y ELISA nacionales para identificar y caracterizar inmunológicamente los virus Sendai, MHV y MVM, con costos ventajosos, para la vigilancia serológica de bioterios de ratones.
- Detectar la circulación de uno o más de los agentes estudiados en colonias de cría de ratones pertenecientes a distintas instituciones del país.
- Generar las alarmas para la toma de decisiones en los niveles de responsabilidad de los bioterios contaminados.
- Iniciar las primeras estimaciones de prevalencia de infección por los virus Sendai, MHV y MVM en bioterios de Argentina.

A partir de las evidencias presentadas en nuestros estudios, podemos concluir que se ha cumplido con los objetivos programados para este trabajo de Tesis. La colección de datos continúa, en un contexto de mejora institucional continua y en armonía con las prioridades establecidas por el Ministerio de Ciencia y Tecnología

de Argentina, entre las que se encuentra la provisión y utilización de animales de laboratorio con calidad certificada.

## **CAPITULO 5**

# **BIBLIOGRAFIA**

- Adamson, P. B. (1957). "The diagnosis of typhoid fever by the isolation of the organism." *S Afr Med J* 31(28): 689-690.
- Anton M. Allen, T. N., National Institutes of Health (U.S.). Division of Research Services (1986). "Manual of microbiological monitoring of laboratory animals." 57-60.
- Astell, C. R., E. M. Gardiner and P. Tattersall (1986). "DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVM(i), and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain." *J Virol* 57(2): 656-669.
- Augusto, L. G. (2012). "[Critical reflection on the invisibility of biosafety and biosecurity]." *Cien Saude Colet* 17(2): 293-294; discussion 296-297.
- Baer, P. N. and L. Kilham (1974). "Dental defects in hamsters infected with minute virus of mice." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 37(3): 385-389.
- Bakanidze, L., P. Imnadze and D. Perkins (2010). "Biosafety and biosecurity as essential pillars of international health security and cross-cutting elements of biological nonproliferation." *BMC Public Health* 10 Suppl 1: S12.
- Baker, D. G. (1998). "Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research." *Clin Microbiol Rev* 11(2): 231-266.
- Balls, M. (2009). "FRAME, the Three Rs and the Russell Archive at the University of Nottingham." *Altern Lab Anim* 37 Suppl 2: 113-117.
- Barthold, S. W. (1993). "Antigenic stability of *Borrelia burgdorferi* during chronic infections of immunocompetent mice." *Infect Immun* 61(12): 4955-4961.
- Barthold, S. W., D. S. Beck and A. L. Smith (1988). "Mouse hepatitis virus and host determinants of vertical transmission and maternally-derived passive immunity in mice." *Arch Virol* 100(3-4): 171-183.
- Barthold, S. W., D. S. Beck and A. L. Smith (1993). "Enterotropic coronavirus (mouse hepatitis virus) in mice: influence of host age and strain on infection and disease." *Lab Anim Sci* 43(4): 276-284.
- Barthold, S. W. and A. L. Smith (1984). "Mouse hepatitis virus strain--related patterns of tissue tropism in suckling mice." *Arch Virol* 81(1-2): 103-112.
- Barthold, S. W. and A. L. Smith (1992). "Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice." *Arch Virol* 122(1-2): 35-44.
- Barthold, S. W. and A. L. Smith (1993). "Role of host age and genotype in murine enterotropic coronavirus infection." *Adv Exp Med Biol* 342: 371-376.
- Behymer, R. D., D. R. Harlow, D. E. Behymer and C. E. Franti (1973). "Serologic diagnosis of toxoplasmosis and prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in selected feline, canine, and human populations." *J Am Vet Med Assoc* 162(11): 959-963.
- Besselsen, D. G., M. J. Romero, A. M. Wagner, K. S. Henderson and R. S. Livingston (2006). "Identification of novel murine parvovirus strains by epidemiological analysis of naturally infected mice." *J Gen Virol* 87(Pt 6): 1543-1556.
- Blandford, G. and R. B. Heath (1974). "Studies on the immune response and pathogenesis of Sendai virus infection of mice. II. The immunoglobulin class of plasma cells in the bronchial sub-mucosa." *Immunology* 26(3): 667-671.
- Bond, C. W., J. L. Leibowitz and J. A. Robb (1979). "Pathogenic murine coronaviruses. II. Characterization of virus-specific proteins of murine coronaviruses JHMV and A59V." *Virology* 94(2): 371-384.
- Bonnard, G. D., E. K. Manders, D. A. Campbell, Jr., R. B. Herberman and M. J. Collins, Jr. (1976). "Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4

- lymphoma. Evidence for minute virus of mice causing the inhibition." *J Exp Med* 143(1): 187-205.
- Box, P. G. (1976). "Criteria for producing high quality animals for research." *Lab Anim Sci* 26(2 Pt 2): 334-338.
- Broderson, J. R. (1980). "Diagnostic exercise. Mouse hepatitis virus enteritis." *Lab Anim Sci* 30(6): 965-966.
- Broderson, J. R., F. A. Murphy and J. C. Hierholzer (1976). "Lethal enteritis in infant mice caused by mouse hepatitis virus." *Lab Anim Sci* 26(5): 824.
- Brownstein, D. G. (1986). "Minute Virus of Mice." *Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals*, Second edition: 43-46.
- Brownstein, D. G. and S. W. Barthold (1982). "Mouse hepatitis virus immunofluorescence in formalin- or Bouin's-fixed tissue using trypsin digestion." *Lab Anim Sci* 32: 37-39.
- Brownstein, D. G., A. L. Smith, E. A. Johnson, D. J. Pintel, L. K. Naeger and P. Tattersall (1992). "The pathogenesis of infection with minute virus of mice depends on expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2." *J Virol* 66(5): 3118-3124.
- Büchen-Osmond, C. (1995). "Taxonomy and Classification of Viruses" (76): 1217-1225.
- Cardozo de Martínez C.A, d. O. A. M., Martínez C, Rodriguez Yunta E, Lolas Stepke F (2007). "El animal como sujeto experimental. Aspectos técnicos y éticos."
- Collins, M. J., Jr. and J. C. Parker (1972). "Murine virus contaminants of leukemia viruses and transplantable tumors." *J Natl Cancer Inst* 49(4): 1139-1143.
- Compton, S. R., S. W. Barthold and A. L. Smith (1993). "The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses." *Lab Anim Sci* 43(1): 15-28.
- Compton, S. R., F. R. Homberger, F. X. Paturzo and J. M. Clark (2004). "Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack." *Comp Med* 54(4): 382-392.
- Cornelis, J. J., P. Becquart, N. Duponchel, N. Salome, B. L. Avalosse, M. Namba and J. Rommelaere (1988). "Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice." *J Virol* 62(5): 1679-1686.
- Council, N. R. (1976). "Long-term holding of laboratory rodents: areport of Committee on Long-term Holding of Laboratory Rodents." *ILAR News* 19: L1-L25.
- Cox, H. R. (1953). "Viral vaccines and human welfare." *Lancet* 265(6775): 1-5.
- Croft, D. (2004). "Mouse monitoring and baiting." *NSW DEPARTMENT OF PRIMARY INDUSTRIES*: 1-12.
- Cutrone, R., J. Lednicky, G. Dunn, P. Rizzo, M. Bocchetta, K. Chumakov, P. Minor and M. Carbone (2005). "Some oral poliovirus vaccines were contaminated with infectious SV40 after 1961." *Cancer Res* 65(22): 10273-10279.
- Chanock, R. M. (1979). "Parainfluenza viruses. In Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial Infections." 611-632.
- Chiparelli, H., J. C. Russi, E. Martorell, J. R. Arbiza, E. Canepa and M. Hortal (1988). "[Comparison between immunofluorescence and immunoenzymatic assay for the rapid diagnosis of the respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions]." *Rev Argent Microbiol* 20(4): 201-204.
- de Garmendia, E. C., Mayra Hidalgo (2001). "Murine Viruses Detection in Laboratory Mice." *revista científica, FCV-LUZ* XI(2): 149-156.

- De Juan Herraiez, V. and R. M. Herraiez (2004). "Que es un modelo animal?" *gaceta optica* 382: 20-24.
- Descoteaux, J. P., D. Grignon-Archambault and G. Lussier (1977). "Serologic study on the prevalence of murine viruses in five Canadian mouse colonies." *Lab Anim Sci* 27(5 Pt 1): 621-626.
- Faisca, P. and D. Desmecht (2007). "Sendai virus, the mouse parainfluenza type 1: a longstanding pathogen that remains up-to-date." *Res Vet Sci* 82(1): 115-125.
- Ferdowsian, H. (2011). "Human and animal research guidelines: aligning ethical constructs with new scientific developments." *Bioethics* 25(8): 472-478.
- Fernandez Criado, M. d. C., R. Feinstein and S. Sánchez Gamarra "Patología: control y prevención en roedores." *Estado Sanitario I*(7): 1-26
- Fitch, W. M. (1970). "Distinguishing homologous from analogous proteins." *Syst Zool* 19(2): 99-113.
- Fox, E. R. (1977). "National Health Insurance and the AMA House of Delegates." *West J Med* 126(2): 148.
- Frese, K. K. and D. A. Tuveson (2007). "Maximizing mouse cancer models." *Nat Rev Cancer* 7(9): 645-658.
- Fujiwara, K., Y. Tanishima and M. Tanaka (1979). "[Seromonitoring of laboratory mouse and rat colonies for common murine pathogens (author's transl)]." *Jikken Dobutsu* 28(2): 297-306.
- Gallagher, T. M., S. E. Parker and M. J. Buchmeier (1990). "Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein." *J Virol* 64(2): 731-741.
- Grandien, M., C. A. Pettersson, P. S. Gardner, A. Linde and A. Stanton (1985). "Rapid viral diagnosis of acute respiratory infections: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and the immunofluorescence technique for detection of viral antigens in nasopharyngeal secretions." *J Clin Microbiol* 22(5): 757-760.
- Gronvall, G. K. and N. Bouri (2008). "Biosafety laboratories." *Biosecur Bioterror* 6(4): 299-307.
- Grunert, R. R. (1967). "Isolation of sendai virus as a latent respiratory virus in mice." *Lab Anim Care* 17(2): 164-171.
- Hamre, D. and J. J. Procknow (1966). "A new virus isolated from the human respiratory tract." *Proc Soc Exp Biol Med* 121(1): 190-193.
- Harris, R. E., P. H. Coleman and P. S. Morahan (1974). "Stability of minute virus of mice to chemical and physical agents." *Appl Microbiol* 28(3): 351-354.
- Hendriksen, C. F. (2006). "[Developments in the area of animal experiments in biomedical research]." *Ned Tijdschr Geneesk* 150(52): 2857-2862.
- Hogan, R. J., L. S. Cauley, K. H. Ely, T. Cookenham, A. D. Roberts, J. W. Brennan, S. Monard and D. L. Woodland (2002). "Long-term maintenance of virus-specific effector memory CD8+ T cells in the lung airways depends on proliferation." *J Immunol* 169(9): 4976-4981.
- Hogan, R. J., W. Zhong, E. J. Usherwood, T. Cookenham, A. D. Roberts and D. L. Woodland (2001). "Protection from respiratory virus infections can be mediated by antigen-specific CD4(+) T cells that persist in the lungs." *J Exp Med* 193(8): 981-986.
- Homberger, F. R. (1997). "Enterotropic mouse hepatitis virus." *Lab Anim* 31(2): 97-115.

- Homberger, F. R., A. L. Smith and S. W. Barthold (1991). "Detection of rodent coronaviruses in tissues and cell cultures by using polymerase chain reaction." *J Clin Microbiol* 29(12): 2789-2793.
- Homberger, F. R., L. Zhang and S. W. Barthold (1998). "Prevalence of enterotropic and polytropic mouse hepatitis virus in enzootically infected mouse colonies." *Lab Anim Sci* 48(1): 50-54.
- Ito, H. (1976). "Plaque assay of Sendai virus in monolayers of a clonal line of porcine kidney cells." *J Clin Microbiol* 3(2): 91-95.
- Jacobs, L. and M. N. Lunde (1957). "A hemagglutination test for toxoplasmosis." *J Parasitol* 43(3): 308-314.
- Jacoby, R. O., D. J. Gaertner, P. N. Bhatt, F. X. Paturzo and A. L. Smith (1988). "Transmission of experimentally-induced rat virus infection." *Lab Anim Sci* 38(1): 11-14.
- Jacoby, R. O. and J. R. Lindsey (1997). "Health care for research animals is essential and affordable." *FASEB J* 11(8): 609-614.
- Jacoby RO, L. J. (1997). "Health care for research animals is essential and affordable." *FASEB J* 11: 609-614.
- Janus, L. M., M. Mahler, W. Kohl, A. Smoczek, H. J. Hedrich and A. Bleich (2008). "Minute virus of mice: antibody response, viral shedding, and persistence of viral DNA in multiple strains of mice." *Comp Med* 58(4): 360-368.
- Janus, L. M., M. Mähler, W. Köhl, A. Smoczek, H. J. Hedrich and A. Bleich, American Association for Laboratory Animal Science.
- Kastenmayer, R. J., R. M. Moore, A. L. Bright, R. Torres-Cruz and W. R. Elkins (2012). "Select agent and toxin regulations: beyond the eighth edition of the guide for the care and use of laboratory animals." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 51(3): 333-338.
- Katahira, K. (2001). "[Global harmonization in the care and use of laboratory animals for the space life science research]." *Biol Sci Space* 15(1): 30-34.
- Kilham, L. and G. Margolis (1970). "Pathogenicity of minute virus of mice (MVM) for rats, mice, and hamsters." *Proc Soc Exp Biol Med* 133(4): 1447-1452.
- Kimsey, P. B., H. D. Engers, B. Hirt and C. V. Jongeneel (1986). "Pathogenicity of fibroblast- and lymphocyte-specific variants of minute virus of mice." *J Virol* 59(1): 8-13.
- Koering, C. E., M. Geuskens and J. Rommelaere (1996). "Continuous production of minute virus of mice by an untransformed variant of Fisher rat fibroblast (FR3T3)." *J Gen Virol* 77 ( Pt 3): 447-452.
- Kraft, V. and B. Meyer (1986). "Diagnosis of murine infections in relation to test methods employed." *Lab Anim Sci* 36(3): 271-276.
- Kraft, V. and B. Meyer (1990). "Seromonitoring in small laboratory animal colonies. A five year survey: 1984-1988." *Z Versuchstierkd* 33(1): 29-35.
- Ksiazek, T. G., D. Erdman, C. S. Goldsmith, S. R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J. A. Comer, W. Lim, P. E. Rollin, S. F. Dowell, A. E. Ling, C. D. Humphrey, W. J. Shieh, J. Guarner, C. D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. DeRisi, J. Y. Yang, N. Cox, J. M. Hughes, J. W. LeDuc, W. J. Bellini and L. J. Anderson (2003). "A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome." *N Engl J Med* 348(20): 1953-1966.
- Kyuwa, S., K. Ohsawa, H. Sato and T. Urano (2000). "Replication of enterotropic and polytropic murine coronaviruses in cultured cell lines of mouse origin." *Exp Anim* 49(4): 251-257.



- Landsteiner, K. (1936). "ON THE GROUP SPECIFIC A SUBSTANCE IN HORSE SALIVA. II." *J Exp Med* 63(2): 185-190.
- Landsteiner, K. and M. W. Chase (1936). "ON GROUP SPECIFIC A SUBSTANCES : III. THE SUBSTANCE IN COMMERCIAL PEPSIN." *J Exp Med* 63(6): 813-817.
- Landsteiner, K. and J. Jacobs (1936). "STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS : III. ANAPHYLAXIS INDUCED BY ARSPHENAMINE." *J Exp Med* 64(5): 717-721.
- Landsteiner, K. and J. Jacobs (1936). "STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS. II." *J Exp Med* 64(4): 625-639.
- Landsteiner, K. and J. van der Scheer (1936). "ON CROSS REACTIONS OF IMMUNE SERA TO AZOPROTEINS." *J Exp Med* 63(3): 325-339.
- Lucchiari, M. A. and C. A. Pereira (1990). "A major role of macrophage activation by interferon-gamma during mouse hepatitis virus type 3 infection. II. Age-dependent resistance." *Immunobiology* 181(1): 31-39.
- Lussier, G. and J. P. Descoteaux (1986). "Prevalence of natural virus infections in laboratory mice and rats used in Canada." *Lab Anim Sci* 36(2): 145-148.
- Luy, J. (2007). "[Ethical and legal aspects of animal experiments on non-human primates]." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 114(3): 81-85.
- Magaly de Garmendia, E. C., y Mayra Hidalgo (2001). "Murine Viruses Detection in Laboratory Mice." *revista cientifica, FCV-LUZ XI(2)*: 149-156.
- Martinez, G. A. and C. H. Ramirez Ronda (1996). "[Ebola: "a fatal syndrome"]." *Bol Asoc Med P R* 88(7-9): 69-72.
- Matsuo, Y. and S. H. Bryant (1999). "Identification of homologous core structures." *Proteins* 35(1): 70-79.
- McIntosh, K., J. H. Dees, W. B. Becker, A. Z. Kapikian and R. M. Chanock (1967). "Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 57(4): 933-940.
- Meyer, M. E. (1974). "Advances in research on brucellosis, 1957-1972." *Adv Vet Sci Comp Med* 18(0): 231-250.
- Miller, J. M., R. Astles, T. Baszler, K. Chapin, R. Carey, L. Garcia, L. Gray, D. Larone, M. Pentella, A. Pollock, D. S. Shapiro, E. Weirich and D. Wiedbrauk (2012). "Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel." *MMWR Surveill Summ* 61 Suppl: 1-102.
- Miyata, H., T. Kanazawa, K. Shibuya and S. Hino (2005). "Contamination of a specific-pathogen-free rat breeding colony with Human parainfluenzavirus type 3." *J Gen Virol* 86(Pt 3): 733-741.
- Mrad de Osorio, A. (2006). "Etica en la investigacion con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel." *Revista Colombiana de Bioética* 1(1): 163-183.
- Newton-John, H. F. (1984). "Tetanus in Victoria, 1957-1980. Review of 106 patients managed in one hospital." *Med J Aust* 140(4): 194-200.
- Nicklas, W., P. Baneux, R. Boot, T. Decelle, A. A. Deeny, M. Fumanelli and B. Illgen-Wilcke (2002). "Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units." *Lab Anim* 36(1): 20-42.

- Nicklas, W., V. Kraft and B. Meyer (1993). "Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses." *Lab Anim Sci* 43(4): 296-300.
- Olivares, G. A. (1996). "Manual para el manejo de animales de laboratorio." Universidad Juarez Autonoma de Tabasco: 96.
- Parker, J. C., M. J. Collins, Jr., S. S. Cross and W. P. Rowe (1970). "Minute virus of mice. II. Prevalence, epidemiology, and occurrence as a contaminant of transplanted tumors." *J Natl Cancer Inst* 45(2): 305-310.
- Parker, J. C., S. S. Cross, M. J. Collins, Jr. and W. P. Rowe (1970). "Minute virus of mice. I. Procedures for quantitation and detection." *J Natl Cancer Inst* 45(2): 297-303.
- Parker, J. C. and R. K. Reynolds (1968). "Natural history of Sendai virus infection in mice." *Am J Epidemiol* 88(1): 112-125.
- Parker, J. C., R. W. Tennant and T. G. Ward (1966). "Prevalence of viruses in mouse colonies." *Natl Cancer Inst Monogr* 20: 25-45.
- Parker, J. C., M. D. Whiteman and C. B. Richter (1978). "Susceptibility of inbred and outbred mouse strains to Sendai virus and prevalence of infection in laboratory rodents." *Infect Immun* 19(1): 123-130.
- Peters, R. L., M. J. Collins, A. J. O'Beirne, P. A. Howton, S. L. Hourihan and S. F. Thomas (1979). "Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to murine hepatitis virus." *J Clin Microbiol* 10(4): 595-597.
- Reznikov, A. G. (2010). "[Bioethical aspects of experiments on the animals]." *Klin Khir*(6): 8-13.
- Richard, G. (1957). "[First epidemic of Asiatic cholera in Lorraine (1832)]." *Rev Med Nancy* 82: 1259-1276.
- Ros, C., C. J. Burckhardt and C. Kempf (2002). "Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction." *J Virol* 76(24): 12634-12645.
- Rottinghaus, A. A., S. V. Gibson and J. E. Wagner (1986). "Comparison of serological tests for detection of antibodies to Sendai virus in rats." *Lab Anim Sci* 36(5): 496-498.
- Rowsell, H. C. (1986). "Regulation of animal experimentation: Canada's program of voluntary control." *Acta Physiol Scand Suppl* 554: 95-105.
- Sabin AB, B. L. (1973). "History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains." *J Biol Stand*(1): 115-118.
- Saito, M., E. Suzuki, K. Nakayama, J. Matsubara and M. Nakagawa (1980). "An attempt for eradication of Sendai virus from a mouse breeding colony." *Jikken Dobutsu* 29(4): 457-460.
- Schou, S. and A. K. Hansen (2000). "Marburg and Ebola virus infections in laboratory non-human primates: a literature review." *Comp Med* 50(2): 108-123.
- Shah, K. and N. Nathanson (1976). "Human exposure to SV40: review and comment." *Am J Epidemiol* 103(1): 1-12.
- Shek, W. R. (2008). "Role of housing modalities on management and surveillance strategies for adventitious agents of rodents." *ILAR J* 49(3): 316-325.
- Slenczka, W. G. (1999). "The Marburg virus outbreak of 1967 and subsequent episodes." *Curr Top Microbiol Immunol* 235: 49-75.
- Smith, A. L. (1983). "An immunofluorescence test for detection of serum antibody to rodent coronavirus." *Lab Anim Sci* 33: 157-160.
- Smith, A. L. (1983). "Response of weanling random-bred mice to inoculation with minute virus of mice." *Lab Anim Sci* 33(1): 37-39.

- Smith, A. L., C. B. Cardellichio, D. F. Winograd, M. S. de Souza, S. W. Barthold and K. V. Holmes (1991). "Monoclonal antibody to the receptor for murine coronavirus MHV-A59 inhibits viral replication in vivo." *J Infect Dis* 163(4): 879-882.
- Smith, A. L., M. S. de Souza, D. Finzi and S. W. Barthold (1992). "Responses of mice to murine coronavirus immunization." *Arch Virol* 125(1-4): 39-52.
- Smith, A. L., D. F. Winograd and M. S. de Souza (1991). "In vitro splenic T cell responses of diverse mouse genotypes after oronasal exposure to mouse hepatitis virus, strain JHM." *Lab Anim Sci* 41(2): 106-111.
- T Nevalainen, C. H. J. M. B. A. G. P. H. B. R. H., P. Vergara "FELASA recommendations for the accreditation of laboratory animal science education and training."
- Taguchi, F., Y. Goto, M. Aiuchi, T. Hayashi and K. Fujiwara (1979). "Pathogenesis of mouse hepatitis virus infection. The role of nasal epithelial cells as a primary target of low-virulence virus, MHV-S." *Microbiol Immunol* 23(4): 249-262.
- Takimoto, K., K. Nakayama, M. Yabe, Y. Ami, Y. K. Yamada, S. Tamura, Y. Suzuki, T. Asano and M. Saito (1998). "Contamination of mouse-adapted influenza virus with Sendai virus." *Exp Anim* 47(2): 137-140.
- Takimoto, K., Y. K. Yamada, Y. Ami, Y. Suzaki, M. Yabe and T. Asano (1999). "Experiences of microbial contamination of animal colonies maintained in the National Institute of Infectious Diseases, Japan (NIID)." *Jpn J Infect Dis* 52(6): 255-256.
- Tamura, T., F. Taguchi, K. Ueda and K. Fujiwara (1977). "Persistent infection with mouse hepatitis virus of low virulence in nude mice." *Microbiol Immunol* 21(12): 683-691.
- Tuekam, T., E. C. Greiner and E. P. J. Gibbs (1991). "Seroepidemiology of Bivens Arm virus infections of cattle in Florida, St Croix and Puerto Rico." *Veterinary Microbiology* 28(2): 121-127.
- Waggie, K. S. (1994). "Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals." Science.
- Wagner JE, B.-W. C., Steffer EK. (1991). "Health surveillance of laboratory rodents." *Lab Anim* 20: 40-45.
- Walrath, J. C., J. J. Hawes, T. Van Dyke and K. M. Reilly (2010). *Genetically Engineered Mouse Models in Cancer Research. Advances in Cancer Research.* F. V. W. George and K. George, Academic Press. Volume 106: 113-164.
- Weisbroth, S. H., R. Peters, L. K. Riley and W. Shek (1998). "Microbiological Assessment of Laboratory Rats and Mice." *ILAR J* 39(4): 272-290.
- Wilberz, S., H. J. Partke, F. Dagnaes-Hansen and L. Herberg (1991). "Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice." *Diabetologia* 34(1): 2-5.
- Yamada, Y. K., M. Yabe, S. Kyuwa, N. Nakamura, K. Takimoto and T. Urano (2001). "Differentiation of mouse hepatitis viruses in animal facilities in Japan by use of nucleotide analysis of the nucleocapsid gene." *Comp Med* 51(4): 319-325.
- Zenner, L. and J. P. Regnault (2000). "Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study." *Lab Anim* 34(1): 76-83.
- Zhong, W., D. Marshall, C. Coleclough and D. L. Woodland (2000). "CD4+ T cell priming accelerates the clearance of Sendai virus in mice, but has a negative effect on CD8+ T cell memory." *J Immunol* 164(6): 3274-3282.

Zuluaga, A. F. S. B. G., Wilson; Loaiza, Sergio; Agudelo, María; Vesga, Omar (2003).  
"Fundación del primer bioterio MPF funcional de Colombia." IATREIA 16(2):  
115-131.

## **CAPITULO 6**

# **ABREVIATURAS**

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ac: anticuerpo

AG: antígeno

ARN: ácido ribonucleico

Cos: cosecha

DICT<sub>50</sub>/mL : dosis infectiva en cultivos tisulares cincuenta por mililitro

Dil: dilución

ECP: efecto citopatogenico

ELISA: enzima inmuno ensayo

F: proteína de fusión

GSB: gabinete de seguridad biológica

HA: hemoaglutinación

HE: huevos embrionados

HN: hemaglutinina-Neuraminidasa

IC: intacardiaca

IHA: inhibición de la hemoaglutinación

IM: intramuscular

IF: inmunofluorescencia

IFI: inmunofluorescencia indirecta

Ig: inmunoglobulina

IN: intranasal

IP: intraperitoneal

KO: knock-out

L: proteína larga

LAI: líquido ascítico inmune

M: proteína de matriz

MHV: virus de la hepatitis murina

MVM: virus minuto o diminuto de ratón

MVM i: virus minuto o diminuto de ratón, cepa inmunosupresora

MVMp: virus minuto o diminuto de ratón, cepa prototipo

NH: no hecho

Neg: negativo

nm: nanómetro

NP: nucleoproteína

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: fosfoproteína

pi: post inoculación

RA: ratón adulto

SFB: suero fetal bovino

SI: suero inmune

SM: semilla maestra

ST: semilla de trabajo

SPF: libre de patógenos específicos

TMA: técnicas microbiológicas apropiadas

UHA: unidades hemaglutinantes



## **CAPITULO 7**

## **GLOSARIO**

**Animales centinelas:** animales utilizados como una herramienta eficaz para monitorear cambios espaciales y temporales de la actividad viral en un área determinada.

**Animales knockout:** animales modificados genéticamente, en donde se ha efectuado una mutación génica sitio dirigida que consiste en suprimir la expresión de un gen específico.

**Animales knockin:** un organismo knockin (con genes bloqueadores) es igual al anterior pero en lugar de eliminar un gen determinado este es reemplazado por una versión modificada del mismo, que produce una variación en su función.

**Animal libre de gérmenes (SPF):** es comúnmente usado para designar un animal con ausencia de microorganismos, lo cual implica libres de bacterias, hongos, parásitos y virus. Las limitaciones de esta terminología es obviamente dependiente de la validez de las pruebas usadas (Fuller, 1968). Son conocidos también como Animales Axénicos. Este último fue el primer término científico usado para designar individuos de una especie libres de cualquier vida demostrable (Coates & Gustafsson, 1984; Trexler, 1987; Besselsen, 2002).

**Animal de experimentación:** Vertebrado perteneciente a una especie, raza o línea que tiene definida una genética y un estado higiénico sanitario, que constituye un biomodelo experimental para la experimentación científica, fundamentalmente. En términos técnicos es un sinónimo de animal de laboratorio.

**Anticuerpo/ inmunoglobulina:** es una proteína que reacciona contra un antígeno en un organismo animal. Los anticuerpos, que pueden hallarse en la sangre o en otros fluidos corporales, son utilizados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar virus, bacterias, hongos o parásitos.

**Antígeno/ inmunógeno:** es una sustancia ajena al cuerpo que el sistema inmunológico reconoce como una amenaza. Algunos ejemplos de antígenos son las toxinas de las bacterias y los virus, así como los agentes químicos

externos perjudiciales para la salud. Cuando el cuerpo detecta antígenos se induce una respuesta inmunitaria con la formación de anticuerpos, como forma de defensa.

**Bioterio:** es una unidad de servicio que tiene como funciones la producción y mantenimiento de animales de laboratorio, para ser utilizados en proyectos de investigación.

**Cepa:** es una variante fenotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias. De una manera más básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.

**Citoquinas:** las complejas interacciones entre células están mediadas por una serie de proteínas secretadas de bajo peso molecular que son conocidas colectivamente como citoquinas. Las citoquinas funcionan como mensajeros del sistema inmune: regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune, estimulando o inhibiendo la proliferación de varias células, la secreción de anticuerpos o de otras citoquinas.

**Cuarentena:** es la retención temporal de los animales desde el momento de su admisión hasta que se haya determinado la ausencia de riesgo para su reproducción.

**Distrés:** angustia, tiene como definición técnica el estado adverso en una variedad de respuestas (fisiológicas, psicológicas y de comportamiento) que incapacita a un animal para adaptarse.

**ELISA:** es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo unido a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color.

**Endogamia:** fecundación entre individuos de una misma especie.

Enzoótica: especie animal exclusiva de una región geográfica determinada. Se dice que una especie es enzoótica cuando ha evolucionado dentro de un ecosistema sin expandirse a otros. Aplicado al concepto de monitoreo del estado de salud de una colonia de animales significa una enfermedad de baja incidencia clínica pero de severas consecuencias.

Epitopes: el epitope o determinante antigénico es la región de una proteína o antígeno que es reconocida por un anticuerpo y que se une a él para formar el complejo antígeno-anticuerpo. Se debe distinguir entre epitopes 'conformacionales' o 'discontinuos' y epitopes 'lineales' o 'secuenciales'. Los epitopes conformacionales están constituidos por aminoácidos que, aunque están alejados en la secuencia primaria de la proteína, se aproximan cuando esta se pliega para lograr su estructura tridimensional. Los epitopes lineales, en cambio, están formados por residuos consecutivos incluidos en un mismo fragmento peptídico. El epitopo es el lugar donde se le une el anticuerpo al antígeno. El idiotipo es el epitopo a su vez del anticuerpo y así por lo tanto los anticuerpos antiidiotipo son los generados contra los anticuerpos y el TCR.

Epizootico: es una enfermedad o proceso que se produce al mismo tiempo en muchos animales de una misma especie en una zona geográfica. Se asume que una enfermedad se volvió epizootica cuando presenta manifestaciones de signos clínicos.

Fluoróforo/ Fluorocromo: es una molécula o parte de una molécula que emite fluorescencia después de ser excitada con luz.

Fomites: objetos de uso personal del enfermo o portador, que pueden estar contaminados y transmitir agentes infecciosos.

Genes ortólogos: son aquellas secuencias homólogas que se han separado por un evento de especiación. Es decir, cuando una especie diverge en dos especies separadas, las copias divergentes de un mismo gen en las especies resultantes se dice que son ortólogos. En otras palabras, las secuencias

ortólogas son las secuencias que se encuentran en diferentes especies y que son altamente similares debido a que se han originado en un ancestro común

Genoma viral: es el material genético contenido en un virus (Fitch, 1970; Matsuo and Bryant, 1999).

Infección: indica la contaminación, con respuesta inmunológica y daño estructural de un hospedador, causada por un microorganismo patógeno. Existe invasión con lesión tisular por algún germen (hongos, bacterias, protozoos, virus, priones), sus productos (toxinas) o ambos a la vez. Esta infección puede ser local o sistémica.

Infección subclínica: Es una enfermedad infecciosa cuyos síntomas son muy leves o incluso pasan inadvertidos.

Inmunofluorescencia: es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula.

Inmunohistoquímica: es un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra de tejido orgánico, correctamente fijada e incluida en parafina.

Líquido ascítico: Acumulación de líquido libre, producido por ultrafiltración del plasma, en el interior de la cavidad peritoneal.

Microorganismo oportunista: microorganismo normalmente no patógeno y que solo produce una infección cuando las defensas del huésped están disminuidas. Generalmente poseen una elevada latencia.

**Morbilidad:** se refiere a la relación entre el número de animales afectados respecto del total de la población. Mide la prevalencia de un agente y es definida dentro del contexto de la valoración de un método, por ejemplo serológico.

**Mortalidad:** es el número de miembros de una población que muere en un determinado periodo respecto de la población total. Implica que la muerte está directamente atribuida al agente en cuestión.

**Patogenicidad:** capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible.

**Patogénico:** relativo a la patogenia. La patogenia es el conjunto de mecanismos biológicos, físicos o químicos que llevan a la producción de una enfermedad.

**Respuesta inmune:** el sistema inmunitario reconoce los agentes extraños vinculados a los anticuerpos y desencadenan una respuesta para contrarrestar al agente.

**Semilla Maestra viral:** Se denomina SM al primer stock de virus obtenido en condiciones óptimas encontradas experimentalmente.

**Semilla de Trabajo viral:** deriva por replicación de la SM y con ella (ST) se realizan todos los experimentos requeridos.

**Serotipo:** tipo serológico de un determinado organismo. Los serotipos permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie, algo de gran importancia en epidemiología. Así, un serotipo determinado es una subpoblación de un microorganismo infeccioso que se diferencia de otras subpoblaciones de la misma especie por medio de pruebas serológicas.

**Sistema inmunológico/ sistema inmunitario:** Sistema defensivo del organismo que detecta sustancias, virus y microorganismos externos al cuerpo y los neutraliza. Los glóbulos blancos son las células defensivas encargadas de la

respuesta inmunológica. El sistema linfático y los ganglios linfáticos recogen los agentes invasores y los drenan para neutralizarlos y eliminarlos.

Suero inmune o antisuero: es el suero sanguíneo que contiene anticuerpos policlonales.

Transgénico: el término transgénico es un adjetivo que se utiliza para designar a todos aquellos seres vivos que han nacido con su información genética alterada. Normalmente, este término se usa para señalar a aquellos animales o plantas que son alterados de manera artificial, ya sea porque existen objetivos científicos o comerciales.

Virus: es una entidad biológica infecciosa microscópica, mucho más pequeña que las células a las que infecta. Para reproducirse los virus penetran en las células, insertan su ADN o ARN en el interior de la célula y usan sus estructuras de síntesis para fabricar copias del virus.

Virión: cuando un virus infecta a un ser vivo se multiplica millones de veces, causando una enfermedad vírica. A una partícula de virus individual con capacidad infecciosa se le llama virión.