

# DETECCIÓN DEL VIRUS SENDAI, EN RATONES DE LABORATORIO DE LA LÍNEA BALB/C.

Figueroa B, T<sup>1</sup>; Carabaloso H Y<sup>1</sup>; Bada B A<sup>1</sup>; Burón R, M<sup>1</sup>; Pérez G, M<sup>1</sup>; Galván H, O<sup>1</sup>; García V, I.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, (CENPALAB). Boyeros, La Habana (Cuba). [teresa.figueroa@cenpalab.cu](mailto:teresa.figueroa@cenpalab.cu)

## Resumen.

**Introducción.** Virus Sendai (Sd), también conocido como virus de la parainfluenza de tipo 1 murino, es un Paramyxoviridae, responsable de la infección del tracto respiratorio, altamente transmisible en ratones, hámsteres, conejillos de Indias, ratas, cerdos etc. Puede ser detectado en colonias de ratones en todo el mundo. En su uso reconocido está su empleo en la fusión de las células eucariotas, especialmente para producir células de Hibridomas capaces de fabricar anticuerpos monoclonales en grandes cantidades. **Objetivo.** El trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de anticuerpos específicos a virus Sendai (Sd) en sueros de ratones BALB/c, en colonias de cría del CENPALAB. **Materiales y métodos.** Para realizar el estudio se empleó el método inmunoenzimático ELISA y la Inmunofluorescencia (IFI), de tipo indirecto, como método confirmativo. Se evaluaron un total de 258 sueros de animales, de estos 133 fueron crías adultas y 125 destetados. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows versión 11.5.1 del 2002. **Resultados y discusión:** Este estudio demostró una prevalencia de 0.3 %, para virus Sendai, en colonias de cría de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias significativas entre edades. La prevalencia de este virus en dicha población mostró las mismas características presentes con relación a otros estudios realizados con anterioridad. Se pudo certificar la colonia para virus Sendai, garantizando la calidad microbiológica de los animales.

**Palabras Claves:** Ratón, Prevalencia, ELISA, Sendai, IFI.

## Introducción.

El Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) tiene como uno de sus objetivos principales la reproducción de diferentes especies animales utilizadas para la experimentación científica. Acorde con las regulaciones internacionales sobre la calidad higiénico-sanitaria de los Animales de Experimentación, el CENPALAB tiene establecido un Programa de Monitoreo Microbiológico (PMM); el cual constituye un sistema de vigilancia epizootológico, que permite preservar tanto la salud animal como la humana. De esta forma se garantiza la disminución del riesgo de infecciones zoonóticas y se incrementa la veracidad, confiabilidad y reproducibilidad de las investigaciones científicas [4].

Las técnicas serológicas mediante ensayos de anticuerpos contra agentes específicos constituyen la base fundamental del PMM. El desarrollo de sistemas diagnósticos empleando el método inmunoenzimático ELISA o la inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la certificación de estas producciones, ha demostrado ser una vía satisfactoria. La rapidez y la calidad del diagnóstico de laboratorio condicionan el éxito en la prevención y control de las infecciones que afectan a los animales de experimentación [10].

El Virus Sendai del Ratón (Sd) es uno de los virus murinos incluido en el PMM de CENPALAB, se diagnostica tanto por la técnica ELISA como por IFA. Constituye uno de los más estudiados en esta especie de animal de laboratorio, debido al grado de prevalencia que desarrolla una vez que se introduce en las colonias de cría. [9]. También conocido como virus de la parainfluenza de tipo 1 murino, es un Paramyxoviridae, responsable de la infección del tracto respiratorio, altamente contagioso y difícil de controlar en ratones, hámsteres, conejillos de Indias, ratas, cerdos etc. Puede ser detectado en colonias de ratones en todo el mundo. En su uso reconocido está su empleo en la fusión de las células eucariotas, especialmente para producir células de Hibridomas capaces de fabricar anticuerpos monoclonales en grandes cantidades. [8]

La ejecución de un programa de control para Sendai requiere medios de diagnóstico económicos con altos niveles de sensibilidad y especificidad que permita evaluar a un grupo elevado de muestras y en breve tiempo. [4] [9]

**Objetivo:** El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de anticuerpos específicos a virus Sendai (Sd) en sueros de ratones BALB/c, en colonias de cría del CENPALAB.

## Resultados y discusión (continuación ...):

Los sistemas ELISA e IFI mostraron un 98 % de sensibilidad ya que las muestras negativas, fueron detectadas por la técnica y esto eleva la probabilidad de que un animal realmente enfermo, sea detectado como tal por el sistema, mientras que la especificidad mostró valores de 96%, lo cual coincide con los criterios de que una prueba diagnóstica nunca es considerada perfecta, aunque el valor obtenido es alto. [3]

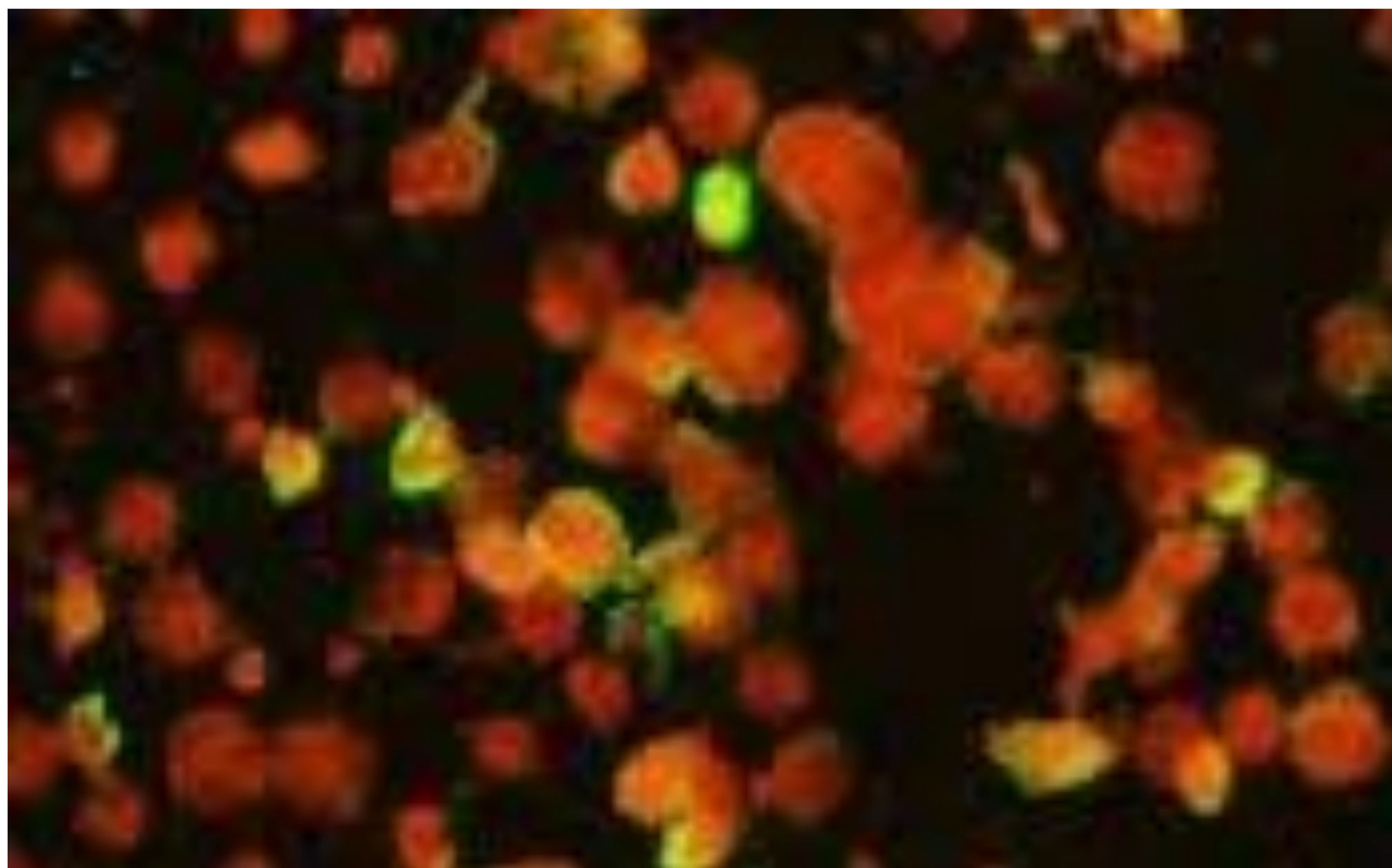
Del total de muestras evaluadas, solo una muestra, dio valores por encima del valor de corte establecido para el método de Elisa utilizado. La prevalencia de este virus en dicha población mostró las mismas características presentes con relación a otros estudios realizados con anterioridad. [14]

En la tabla 3 se presenta el % de prevalencias de las infecciones del virus detectada, siendo baja la prevalencia para el virus Sendai (0.3 %) en la cepa BALB/c. para el total de muestras, coincidiendo con lo expresado por Jakab y Green (1998) y Percy y Barthold (1993), los que señalan infecciones por el virus Sendai, con alta mortalidad, solo en cepas altamente susceptibles como la DBA125 y 129J, no así para el caso de la cepa BALB/c., describiendo que muchas cepas tienen infecciones clínicamente inaparentes y la ocurrencia de la enfermedad y mortalidad en ratones depende de la cepa del animal infectado.

|               | Crías adultas | Crías destetadas | Total de muestras |
|---------------|---------------|------------------|-------------------|
| +/Muestras    | 1/133         | 0/125            | 1/258             |
| % Prevalencia | 0.7           | 0                | 0.3               |

El total de muestras fueron evaluadas por el sistema de IFI, incluyendo la muestra positiva por Elisa con valor de DO por encima de VC. Todas las muestras resultaron negativas por IFI, ya que no mostraron fluorescencia citoplasmática, semejante a lo observado en los controles positivos utilizados en el sistema, como se ve en la **figura 1**, siendo evaluadas las muestras mediante la asignación de una a cuatro cruces (de menor a mayor intensidad), según método descrito por Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A. (1986)

La IFI mostró un resultado negativo para la muestra positiva por ELISA, siendo esta la técnica utilizada como método confirmativo, por sus elevados niveles de sensibilidad y especificidad para virus Sendai en colonias de ratón. [4]



**Figura.1** Patrón de fluorescencia citoplasmática para virus Sendai, del suero control positivo comercial de Charles Rivers. Cód: 1126778-A, en la técnica utilizada.

Los resultados presentados revelan que las metodologías desarrolladas en nuestro laboratorio, constituyen una herramienta eficaz para el control de la contaminación por los agentes virales estudiados en colonias de ratones libres de patógenos específicos, pudiendo certificar la colonia para virus Sendai, garantizando la calidad microbiológica de los animales.

El sistema ELISA, mostró un 99.2% para el valor predictivo positivo, es decir existe la probabilidad de que el 98 % de los resultados, sean falsos positivos. Con relación al valor predictivo negativo, los sistemas mostraron un valor de 100%, lo que habla a favor de una elevada probabilidad de que el animal detectado como sano por la técnica sea realmente sano y esto favorece la eficiencia o valor global del método normalizado, el cual reflejó un 99.7 %. [1]. Estos resultados demuestran la confiabilidad que se obtiene con la utilización de estos sistemas de diagnóstico.

Después de establecidas las producciones en CENPALAB de los juegos de diagnóstico y a partir de 1996, estos se han empleado en el programa de monitoreo de salud, para la certificación virológica de los Biomodelos experimentales y en específico para la detección del virus Sendai, como técnicas del tipo indirecto y el estudio en masa de los animales de producción. Anualmente se envían muestras de sueros, de estos biomodelos, a centros de referencia en Holanda (QM Diagnostic, UMC St Radboud) de manera que permite validar los resultados arrojados de los mismos y su desempeño, mostrando la eficacia de los kit producidos por CENPALAB, como método diagnóstico en la detección del virus Sendai. En todos los casos los resultados han coincidido con los reportados, corroborando la confiabilidad y reproducibilidad de estos métodos de diagnóstico [5]

## Materiales y métodos.

El estudio se realizó en la dirección de Biotecnología del CENPALAB. Se estudiaron un número de muestras (suero), representativas de un período de dos años (2015-2016), tomadas al azar, para un total de 258 muestras de ratones de la cepa BALB/c, donde 133 fueron crías adultas y 125 destetados, libres de gérmenes patógenos específicos (SPF).

### Obtención de los sueros a evaluar

Los sueros que se evaluaron, en su momento fueron obtenidos de animales desangrados bajo efecto de anestesia y eutanizados de acuerdo al Código Práctico para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio establecidas por CENPALAB en 1992.

### Método de evaluación de las muestras problemáticas

Como método de diagnóstico para realizar la evaluación, se emplearon como técnica serológica un ELISA indirecto y un ensayo de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de producción nacional (CENPALAB).

Como técnica confirmativa se utilizó la IFI.

Como antígeno del sistema se utilizó la cepa D/52 no patógena, suministrada por el Central Institute for Laboratory Animal Breeding, Hannover, Alemania, y mantenida en nuestras condiciones. Como suero de referencia o control positivo, se utilizó un suero comercial de Charles Rivers. Cód: 1126778-A. y como suero control negativo un suero comercial de Charles Rivers, Cód: 112389-A. Se empleó una Ant-IgG de ratón preparada en carnero, conjugada con peroxidasa tipo VI RZ=3.0. Empleando la técnica de conjugación descrita por Nakane y Pierce (1996).

### Criterio de lectura

El criterio de lectura empleado para determinar el Cut Off o valor de corte fue la suma de los valores de D.O de los sueros controles negativos y a la media de ello sumarle el valor superior del suero control negativo. Como lo muestra la ecuación siguiente:  $V.C = D.O (-) + D.O (-) + V.S.C.N.$

## Resultados y discusión:

Los valores óptimos de sensibilidad y especificidad de un ensayo del tipo ELISA, dependen de los propósitos de la técnica, idealmente 100 % para ambos, aunque por lo general una elevada sensibilidad se alcanza a expensas de la especificidad y viceversa, estableciéndose habitualmente un compromiso sobre los valores deseados. [14]

Se realizó la evaluación de las muestras para la presencia de anticuerpos a Sendai, durante el procesamiento de las muestras por los sistemas de ELISA e IFA, los resultados, fueron analizados, procesados y llevados a una tabla de contingencia de cuatro casillas (Tabla 1), agrupando los casos positivos y negativos por ambos métodos, para realizar el cálculo de la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y eficiencia del método normalizado según las fórmulas expuestas por Ramp y Gottstein en 1987.

**Tabla 1. Tabla de contingencia para las muestras de suero de ratón procesadas por la técnica ELISA e IFA.**

|       | IFA       |           |   |
|-------|-----------|-----------|---|
|       | Negativos | Positivos |   |
| ELISA | Negativos | A         | B |
|       | Positivos | C         | D |

En la tabla 2 se muestran los resultados de la evaluación de las técnicas serológicas para la detección del virus Sendai.

**Tabla 2. Valores obtenidos de los diferentes parámetros evaluados en el proceso de evaluación en suero de ratón y Patrón de IFI para el virus Sendai.**

| Parámetros                      | Valor (%)           |
|---------------------------------|---------------------|
| Sensibilidad                    | 98                  |
| Especificidad                   | 96                  |
| Valor predictivo positivo (VPP) | 99.2                |
| Valor predictivo negativo (VPN) | 98                  |
| Eficiencia                      | 99.7                |
| Patrón de Fluorescencia         | citoplasma celular. |

## Conclusiones.

- Se evaluó la presencia de anticuerpos específicos a virus Sendai (Sd) en sueros de ratones BALB/c, en colonias de cría del CENPALAB, por el método serológico del tipo ELISA e IFI.
- El virus Sendai mostró una prevalencia del 0.3 %, para la cepa BALB/c. según el total de muestras evaluadas.
- El método de diagnóstico del tipo ELISA y el IFI, empleado para la evaluación de la presencia de anticuerpos a virus Sendai, mostró confiabilidad y reproducibilidad.
- Las Técnicas de ELISA e IFI del tipo indirecto mostraron altos niveles de sensibilidad y especificidad para ser utilizadas en el programa de control serológico para virus Sendai en co-

## Bibliografía.

- Argote, E.; López, G. 1995. Pautas para evaluar la calidad de los juegos diagnósticos basados en la técnica ELISA. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*. 24, (2), 165-169. Cuba.
- Charles River Laboratory. 1990. A Laboratory Animal Health monitoring program: rationale and development. Technical Bulletin. Wilmington, Mass. USA.
- CECMED. 2000. Regulación No 20-2000. Buenas Prácticas de la producción de Diagnosticadores. Cuba.
- CENPALAB. Manual de información sobre los virus murinos. Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. La Habana, Cuba. Mimeo. 59 pp. 1993
- Drug and the Pharmaceutical Sciences. 1993. Pharmaceutical Process Validation. 2nd Ed. Vol 57 Marcel Dekker. Inc. New York.
- Jakab, G.J.; Green, G.M. The effect of sendai virus infection on bactericidal and transport mechanism of the sponge of weanling random-bred mice to infection with murine lung. *J. Clin. Inv.* 51:1989-1998. 1972
- NC-ISO 9001: 2001. Sistema de Gestión de la Calidad. Requisitos. Cuba.
- Ochoa, R. F. 2004. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Validación de inmunoensayos cualitativos. ISBN: 959-7076-09-8. La Habana. Cuba.
- Peralta, L.; Pedrosa, M.; Martínez, Y. 1997. Técnicas inmunoenzimáticas. Diagnóstico de fitopatógenos. Cap 3. Edit CENSA. pp. 43-68. Cuba.
- Percy, D.H.; Barthold, S.W. Pathology of laboratory rodents and rabbits. Iowa State University Press Ames 20-23. 1993
- Ramp, J and Gottstein, B. Am, J. 1987. Trop. Med. Hih. Vol 27, (3).
- Taylor, K. 1992. Standard Operating Procedures Diagnostic Serology. Department of Virology national center for Laboratory animal Breeding. Harlan Olac limited Taylor 's Microbial Consultancy (TMC). England.
- Tesis presentada en opción al título académico de Maestro en Microbiología Mención: Virología. (2003). "Optimización de un sistema Inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de anticuerpos contra el virus de la Encefalomiélitis en ratón". UH. Facultad de Biología. Cuba.
- Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A. 1986. ELISA Techniques in virology. New Developments in Practical Virology. Alan R. Liss,