

El seguimiento de la salud de los animales de laboratorio es una parte esencial del proceso de investigación y sienta las bases sólidas para preservar la salud animal, garantizar que los experimentos produzcan resultados confiables, precisos y la validez de los datos de investigación biomédica.

Hoy en día, los programas de salud y los procedimientos sanitarios ampliamente utilizados conducen a una enorme mejora de la calidad microbiológica de los animales de laboratorio, produciendo colonias de reproducción libres de patógenos e incluso libres de la mayoría de los agentes oportunistas. Junto con el alojamiento de barreras estrictas en las instalaciones de proveedores comerciales y usuarios experimentales, permite un control eficiente del desarrollo de enfermedades infecciosas.

Sin duda, la gestión moderna de la investigación con roedores ha mejorado el estado de salud general de las colonias, de acuerdo con las 3R, y ha permitido la reproducción de modelos animales incluso gravemente inmunocomprometidos sin enfermedades inducidas por microorganismos.

La optimización y búsqueda de resultados confiables en el control sanitario de los animales que son utilizados en ensayos por la comunidad científica, es un proceso que he desarrollado durante 30 años en el laboratorio de la institución en la que realizo mi trabajo, con la ayuda y la motivación de aquellas personas que me acompañaron en el proceso. Mi agradecimiento a todas ellas.

La Salud de los Animales de Laboratorio



Juan Martín Laborde es Licenciado en Biología, Dr. en Ciencias Veterinarias, y posee una Maestría en Biología Molecular y Biomedicina. En la actualidad es Especialista en animales de laboratorio, Diagnóstico veterinario de laboratorio y desarrolla sus tareas e investigación en el control sanitario de las colonias de roedores y peces cebra que se utilizan en experimentación en la república Argentina.

Laborde

Nuevos Paradigmas en la Salud y el Bienestar de los Animales de Laboratorio

Consideraciones en el Control Sanitario y del Microbioma



Nuevos Paradigmas en la Salud y el Bienestar de los Animales de Laboratorio

**Consideraciones en el Control Sanitario
y del Microbioma**

Pre-
Version

Juan Martín Laborde

Nuevos Paradigmas en la Salud y el Bienestar de los Animales de Laboratorio

**Consideraciones en el Control Sanitario
y del Microbioma**

e-version

ELIVA PRESS

ISBN: 978-99993-2-892-0

© Eliva Press Global Ltd. part of Eliva Press S.R.L., 2025

© Juan Martín Laborde

Cover Design: Eliva Press

Cover Image: www.ingimage.com

Email: info@elivapress.com

Website: www.elivapress.com

This Eliva Press imprint is published by the registered company Eliva Press Global Ltd. part of Eliva Press S.R.L. Publishing Group

The registered company address is: Pope Hennessy Street Level 2, Hennessy Tower
Port Louis, Mauritius

Eliva Press S.R.L. Publishing Group legal address is: Bd. Cuza-Voda 1/4 of. 21,
Chisinau, Moldova, Europe

No part of this book may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or by any information storage and retrieval system, without permission in writing from Eliva Press. Any brand and product names mentioned in this book are subject to the trademark, brand, or patent protection and are trademarks of their respective owners. The use of brand names, trade names, product names, product descriptions, is in no way implies that such names may be regarded as unrestricted by trademark and brand protection laws and thus may be used by anyone. The opinions and views expressed are exclusively those of authors/contributors and in no way the editors or publisher is responsible.

All rights reserved.

Nuevos Paradigmas en la Salud y el Bienestar de los Animales de Laboratorio

Dr. Juan Martín Laborde

INDICE

1. Introducción	6
2. El paradigma de las 3 a las 6 R's	7
3. Infecciones virales	18
4. Alcance de la Gestión en el control de la Salud	21
5. Control de enfermedades en animales de laboratorio	25
6. Agentes patógenos en colonias de roedores de laboratorio	26
7. Agentes prevalentes en colonias de roedores	29
8. Recomendaciones de alojamiento para mantener la calidad sanitaria de los roedores de laboratorio	32
9. Programa de control sanitario	33
10. Descripción general de las infecciones prevalentes	35
11. Cultivo microbiológico e identificación de bacterias, hongos y parásitos	38
12. Prevención de infecciones	39
13. Programa de control sanitario	42
14. Técnicas moleculares RT pcr y PCR	44
15. PCR en infecciones virales	47
16. PCR en infecciones bacterianas	50
17. PCR en infecciones parasitarias	52
18. PCR en infecciones por hongos	54
19. PCR en pruebas de contaminantes biológicos	54
20. PCR de muestras recolectadas de forma no invasiva de roedores	55
21. PCR de muestras ambientales	57
22. PCR en animales libres de gérmenes y análisis del microbioma	61
23. Muestras para control sanitario	62
24. Técnicas moleculares en el procesamiento de muestras (ADN y ARN)	64
25. Protocolo para el tratamiento de las muestras en la técnica de PCR para la extracción de ADN y ARN	64
26. Consideraciones claves del monitoreo de salud de rutina	68
27. Avances recientes en el monitoreo estándar de la salud	71
28. Cuando la PCR es siempre la respuesta, entonces quizás las preguntas	

sean equivocadas 7	4
29. Lo positivo no siempre es positivo y viceversa	75
30. Cómo garantizar la validez	77
31. Impacto microbiano en los fenotipos modelo y la validez de la investigación	77
32. La validez de los resultados del control de salud en la actualidad	80
33. La estandarización del Microbioma	81
34. Gnotobiología	83
35. Patógenos de los animales de laboratorio	89
35.1. Patógenos del Sistema Respiratorio	89
35.1.1. Virus de Sendai (SV)	89
35.1.2. Virus de la Pneumonía del ratón (PVM)	91
35.1.3. <i>Filobacterium rodentium</i> o CAR-Bacillus (Bacilo Asociado a las Cílios Respiratorias)	93
35.1.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	94
35.1.5. <i>Mycoplasma pulmonis</i>	94
35.1.6. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	95
35.1.7. <i>Pasteurella pneumotropica</i>	96
35.1.8. <i>Staphylococcus aureus</i>	97
35.1.9. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	98
35.1.10. <i>Pneumocystis carinii</i>	102
35.2. Patógenos del Sistema Digestivo	104
35.2.1. Citomegalovirus del ratón (MCMV)	104
35.2.2. Parvovirus	105
35.2.3. Virus diminuto del Ratón (MVM)	106
35.2.4. Parvovirus de ratón tipo 1-5 (MPV)	111
35.2.5. Rotavirus murinos (Virus EDIM y EDIR)	112
35.2.6. Norovirus murino (MNV)	113
35.2.7. Virus tímico del ratón (MTV)	114
35.2.8. Reovirus tipo 3 (Reo-3)	115
35.2.9. Hantavirus (Hanta)	115
35.2.10. <i>Helicobacter</i> spp.	119

35.2.11. <i>Citrobacter rodentium</i>	120
35.2.12. <i>Clostridium piliforme</i>	120
35.2.13. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	121
35.2.14. <i>Salmonella enteritidis</i>	122
35.2.15. Astrovirus (AstV)	123
35.2.16. <i>Listeria monocytogenes</i>	124
35.2.17. <i>Leptospira</i> spp.	125
35.2.18. <i>Giardia muris</i>	128
35.2.19. <i>Spironucleus muris</i>	129
35.2.20. Oxyuriasis	129
35.2.20. <i>Cryptosporidium</i> spp.	130
35.2.21. <i>Toxoplasma gondii</i>	131
35.3. Patógenos del Sistema Dérmico	132
35.3.1. Virus de tumor mamario de ratón (MMTV)	132
35.3.2. <i>Corynebacterium bovis</i>	133
35.3.3. Acariasis	134
35.4. Patógenos del Sistema Hematopoyético	134
35.4.1. Virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV)	134
35.4.2. Virus elevador de la lactato deshidrogenasa (LDV)	135
35.6. Patógenos del Sistema Nervioso Central	136
35.6.1. Virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (GDVII)	136
35.7. Patógenos en Múltiples Sistemas	138
35.7.1. Adenovirus (MAđ1/MAđ2)	138
35.7.2. Ectromelia virus (ECTV)	139
35.7.3. Virus Toolan (H-1)	141
35.7.4. Virus Kilham (KRV)	142
35.7.6. Virus de la hepatitis del ratón (MHV)	143
35.7.7. Virus de la sialodacrioadenitis (SDAV)	145
35.7.8. <i>Corynebacterium kutscheri</i>	146
35.7.9. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	147
36. Bibliografía	148

Figuras y Tablas

Figura 1: Las 6 “Rs” como nuevo paradigma	9
Tabla 1: Lista de agentes patógenos que deben ser controlados según FELASA	13
Tabla 2: Tamaño mínimo de la muestra para la detección de una infección en una colonia de 100 o más animales	15
Figura 2: Cronología de los últimos 140 años en relación a la condición microbiológica de los animales de experimentación	23
Figura 3: Agentes controlados y técnicas utilizadas en el control sanitario del LAE.FCV.UNLP	46
Figura 4: Cuadros de sensibilidad, especificidad e intervalo de confianza	70

1. Introducción

El seguimiento de la salud de los animales de laboratorio es una parte esencial del proceso de investigación y sienta las bases sólidas para preservar la salud animal, garantizar que los experimentos produzcan resultados confiables, precisos y la validez de los datos de investigación biomédica.

Durante el siglo pasado, se han realizado enormes avances en materia de alojamiento de animales y procesos de derivación de gnotobióticos, con el objetivo de mejorar la calidad microbiológica de los roedores de laboratorio criados en instalaciones de investigación.

Revisando los últimos 140 años, la condición microbiológica de los animales utilizados con fines científicos evolucionó desde una fase temprana de domesticación (1880-1950) en el que se establecieron plantales reproductores con animales naturalmente infectados con diversos patógenos, a lo largo de extensos procesos de rederivación gnotobiótica (1960–1985), hasta un período en el que se eliminaron los virus y otros patógenos específicos de las colonias de ratones y ratas de laboratorio (1980–1996). Esta línea de tiempo puede extenderse a la situación más reciente y aún en curso, que es la fase de una producción de animales aislados y limitados a una exposición a microorganismos. Aunque este desarrollo sigue un camino lógico intrínseco, resulta que la situación actual también trae sus propios desafíos (Roble *et al.*, 2012; Baker, 1998; Weinsbroth, 1996).

Hoy en día, los programas de salud y los procedimientos sanitarios ampliamente utilizados conducen a una enorme mejora de la calidad microbiológica de los animales de laboratorio, produciendo colonias de reproducción libres de patógenos e incluso libres de la mayoría de los agentes oportunistas. Junto con el alojamiento de barreras estrictas en las instalaciones de proveedores comerciales y usuarios experimentales, permite un control eficiente del desarrollo de enfermedades infecciosas.

Sin duda, la gestión moderna de la investigación con roedores ha mejorado el estado de salud general de las colonias, de acuerdo con las 3R, y ha permitido la reproducción de modelos animales incluso gravemente inmunocomprometidos sin enfermedades inducidas por microorganismos. Es importante mencionar que, dado que las funciones de los genes y las regiones del genoma no codificantes aún se desconocen en gran medida, la inmensa producción e incluso en rápido crecimiento de animales genéticamente alterados da como resultado un número aún desconocido de mutantes con defectos inmunológicos, lo que hace

que el alojamiento con barreras estrictas sea inevitable (Hansen & Franklin, 2019; Faley & Olekszak, 2015; Williams *et al.*, 2005).

Sin embargo, este concepto de mayor aislamiento también dio forma a una diversidad limitada del microbioma intestinal de los animales, que difiere drásticamente entre las distintas instalaciones o bioterios para animales (Ericsson *et al.*, 2015; Ericsson *et al.*, 2018; Rausch *et al.*, 2015). Los métodos moleculares de rápido desarrollo, que permiten análisis sensibles y específicos de varios tipos de muestras, han revelado una influencia sorprendente de las composiciones del microbioma en modelos animales, por ejemplo, que influyen en la maduración del sistema inmunitario y los fenotipos de enfermedades y, por lo tanto, en la validez de la investigación biomédica (Bleich & Fox, 2015; Bleich & Hansen, 2012; Hansen *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2015).

Trabajos de investigación han informado esta característica y se han desarrollado propuestas para superar esta situación, especialmente en investigaciones donde los "ratones demasiado limpios" no producen resultados científicamente válidos. Estos enfoques van desde el uso de ratones de proveedores de mascotas hasta la reconstrucción intencional de modelos de investigación (Masopust *et al.*, 2017).

A primera vista, existe un dilema obvio de dos objetivos divergentes, ambos fundamentales en la investigación basada en animales. Por un lado, está el objetivo deseado de mantener los animales de investigación estandarizados libres de enfermedades infecciosas, siguiendo el principio básico del bienestar animal con las 3R como base. Por otro lado, los científicos buscan producir hallazgos que puedan ser reproducidos y finalmente extrapolados al humano, siguiendo el principio de asegurar el valor científico. Este último se ha establecido recientemente en el concepto de las 6R, que tiene en cuenta tanto el bienestar animal como el valor científico (Strech & Dirnagl, 2019).

2. El paradigma de las 3 a las 6 R's

Enunciadas por Russel y Burch hace más de 60 años, las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) se han convertido en los principios rectores para el uso ético de animales en la investigación.¹ Aunque universalmente aceptado, existe una discusión continua sobre su mejora, adopción e implementación. En un enfoque actual en el bienestar animal se observa que las 3R carecen de una dimensión ética, en particular, si genera valor para la ciencia y la sociedad (Vogt *et al.*, 2016; Strech & Dirnagl, 2018).

La investigación con animales solo es ética si genera valor para la ciencia y la sociedad, conceptos que no están representados en las 3R actuales. Los proyectos de investigación individuales solo son valiosos si permiten la adquisición de conocimientos, aplican diseños de estudios sólidos o robustos e informan sus resultados de manera no selectiva. Es difícil evaluar si un proyecto de investigación contribuirá en última instancia a la innovación en el cuidado de la salud por varias razones. Una de las razones es que los avances científicos pueden tardar años en manifestarse. La robustez, por otro lado, se puede juzgar a nivel del proyecto de investigación. Si se desea comprender mejor qué preguntas de investigación aún no se abordan lo suficiente, es necesario que los proyectos individuales sean accesibles a través de registros de estudios con animales de laboratorio y solo si los protocolos se registran prospectivamente entonces se podrá identificar informes selectivos de los resultados del estudio. En este contexto entonces si bien las 3R actuales son importantes para mantener el bienestar animal, la dimensión del valor científico debe tenerse en cuenta al planificar, revisar y realizar investigaciones con animales. Por lo tanto, se ha propuesto la adición de tres R adicionales, es decir, Robustez, Registro e Informes, a los principios rectores para el uso ético de animales en la investigación (Figura 1)

Durante los últimos años, varios estudios empíricos y análisis de expertos han demostrado que tres desafíos ponen en peligro el valor de la investigación con modelos animales. En primer lugar, la investigación con animales a menudo carece de medidas para reducir las amenazas a la validez, los sesgos o la falta de poder estadístico. En segundo lugar, la investigación con animales enfrenta un importante sesgo de publicación, es decir, los resultados nulos y negativos a menudo terminan archivados o desechados. Tercero, la publicación de resultados a menudo carece de información importante que se necesita para una evaluación crítica (p. ej., información sobre el diseño del estudio o la pérdida de animales). Estos desafíos afectan negativamente la reproducibilidad y relevancia de los estudios con animales en investigación, lo que puede dar lugar a una asignación ineficaz de los fondos públicos, a una investigación clínica desacertada y al uso y sufrimiento innecesarios de los animales de experimentación (Russel & Burch, 1959; Vogt *et al.*, 2016; Strech & Dirnagl, 2018; Macleod *et al.*, 2015; Sena *et al.*, 2010; Mueller *et al.*, 2014; Kilkenney *et al.*, 2010; Holman *et al.*, 2016; Begley & Ellis, 2012).



Figura 1: Las 6 “Rs” como nuevo paradigma (Strech & Dirnagl, 2018).

Además del principio básico “valor científico” cada uno de los principios rectores adicionales de las 3R (robustez, registro e información) son importantes y no reemplazables. Los estudios en animales, por ejemplo, pueden ser sólidos pero si se informan de manera sesgada o inapropiada alternativamente, o si son informados apropiadamente pero no de manera sólida, entonces se decanta que ambos escenarios comprometen el valor del estudio. En la actualidad aproximadamente el 50% de los estudios con animales no se informan y solo el registro previo de los protocolos de estudios con animales permite identificar resultados sesgados, retrasados o no informados.

La investigación con animales es ética sólo cuando tiene valor científico y social. Los últimos años han demostrado que este valor de la investigación con animales y, por lo tanto, su capacidad para mejorar la salud humana se ven amenazados por la falta de solidez y los resultados sesgados o no informados. Tres principios éticos (Robustez, Registro e Informes) ayudan a salvaguardar el valor de la investigación con animales. La corriente del marco ético ampliamente establecido para la investigación con animales (3Rs = Reemplazo, Reducción y Refinamiento) pasa por alto esta dimensión de valor al centrarse únicamente en la dimensión igualmente importante del bienestar animal. En este contexto es recomendable complementar el marco actual de 3R para el bienestar animal con el segundo conjunto de 3R para valor científico (Kilkenny *et al.*, 2009).

En los animales que se utilizan en experimentación es fundamental establecer y mantener su calidad sanitaria, para ello debe llevar un registro y control de su estado de salud y particularmente de su condición microbiológica. Esta última está determinada por un complejo multifactorial en el que interactúan la biología del animal, el perfil genético, las condiciones

ambientales del alojamiento, así como las prácticas y manejo al que son sometidos estos animales y sus insumos (Baker, 1998; Casebold *et al.*, 1997; Goto *et al.*, 2009).

Según los estándares internacionales y de acuerdo con la presencia o ausencia de microorganismos Los animales de experimentación se clasifican en animales convencionales, que son los que no están infectados con patógenos zoonóticos, los Libres de Patógenos Específicos (SPF, según la sigla en inglés), aquellos en los cuales están ausentes una lista de microorganismos consensuada internacionalmente, los axénicos o libres de gérmenes (GFA) en los que no se detecta ningún microorganismo por los métodos hasta ahora conocidos, incluso su flora intestinal normal que está ausente y los gnotobiotas que son animales GFA infectados con uno, dos o más microorganismos, es decir que en estos últimos se conocen precisamente los patógenos presentes (Goto *et al.*, 2009).

Los agentes microbianos patógenos presentes en las colonias de animales de laboratorio causan alteraciones en los resultados experimentales y en la interpretación de los mismos. No solamente existe el riesgo de transmisión de enfermedades a los humanos sino que también se han podido observar muertes de animales en bioterios; cambios en los parámetros fisiológicos normales; contaminación de materiales biológicos tales como sueros, vacunas y anticuerpos monoclonales; y pérdida de las colonias de animales inmunodeficientes (Hendriksen, 2009). Asimismo deben considerarse los aspectos concernientes a la actitud ética y moral frente al uso de modelos animales. En este sentido la estandarización sanitaria, la ausencia de contaminaciones y la preservación de un buen estado de salud forma parte del principio de las tres erres de Russel y Burch que son: la reducción del número de animales que se utilizan en investigaciones y ensayos, el refinamiento de los procedimientos experimentales a los que se los somete y el reemplazo de los mismos por métodos alternativos siempre que sea posible (Balls, 2009).

En la actualidad entre los investigadores se plantea una discusión entre el significado de infección versus enfermedad pues no se interesan únicamente en la salud del animal sino en aquellos patógenos que contaminan a los animales en forma asintomática pero que igualmente interfieren con los resultados experimentales. Debido a la resistencia innata o adquirida, la mayoría de los animales infectados con microorganismos no muestran signos clínicos aparentes de enfermedad. Por lo tanto, la infección puede pasar desapercibida por el personal que cuida y utiliza los animales en el laboratorio durante una experiencia o por aquellos que trabajan en áreas de producción. Por ese motivo actualmente, es importante el uso de animales

de laboratorio libres de patógenos específicos (SPF) para utilizarse como modelo en investigación, productos farmacéuticos humanos y veterinarios y reactivos biológicos (Fentener Van Vlissinger, 2015).

Para el control de calidad de los animales de laboratorio se están desarrollando normas por parte de los centros que los producen, las que se van actualizando en forma continua. Como ya se ha mencionado, se debe tener en cuenta que al igual que los productos químicos, los animales de laboratorio son reactivos biológicos y su nivel de calidad siempre debe ser un requisito para aquellos que los utilizan. Se los puede comparar con instrumentos de medida que deben estar calibrados para obtener resultados precisos. Con el avance de la investigación biomédica, la sofisticación de los experimentos con animales está aumentando rápidamente y se requieren resultados experimentales cada vez más exactos. Por lo tanto, se necesita establecer esta estandarización para confirmar y en lo posible, asegurar la reproducibilidad de los resultados de las investigaciones utilizando un número mínimo de animales (Smith *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista histórico la vigilancia de la salud de los animales de laboratorio ha transitado por diferentes etapas. En sus inicios (1880-1960) el objetivo era evitar la muerte de los animales. Luego se sumó el interés por el desarrollo de técnicas como la derivación por cesárea para la obtención de animales gnotobióticos (1960-1985) y lograr de esta manera minimizar los patógenos en las colonias. Posteriormente (1980-1996) el objetivo fue la erradicación de virus murinos endógenos a través de la optimización de técnicas de diagnóstico como las pruebas serológicas y mejoras en la cría y mantenimiento de animales de laboratorio. En la actualidad el interés se centra en el desarrollo de nuevos modelos animales como los ratones transgénicos, lo cual trajo como consecuencia la aparición de enfermedades emergentes como las infecciones por *Helicobacter spp.*, nuevos parvovirus y norovirus murinos (Fentener Van Vlissinger, 2015).

Los métodos utilizados para determinar la calidad sanitaria de los animales incluyen los programas de controles sanitarios, los controles microbiológicos esporádicos u ocasionales y la encuesta microbiológica.

Los programas sanitarios se realizan según las necesidades de cada bioterio y refieren a la planificación y ejecución de un proceso que se lleva a cabo continuamente en las colonias y que puede incluir diferentes formas o técnicas para evaluar la presencia de microorganismos.

El control microbiológico hace referencia a la práctica de pruebas repetitivas estandarizadas, previamente descritas y programadas para mostrar la presencia de ciertos agentes microbianos en una colonia animal. Es el principal mecanismo para asegurar en forma continua la calidad microbiológica de los animales y forma parte de los programas de controles sanitarios.

Los controles esporádicos u ocasionales, son pruebas específicas con el fin de identificar los probables patógenos causantes de los cambios clínicos y las lesiones observadas. Estas pruebas no están programadas como en los controles microbiológicos y se realizan generalmente, después de determinados hallazgos como por ejemplo aparición de animales enfermos o muertos. Las infecciones se evidencian cuando se observan signos clínicos de enfermedad o a través de los resultados obtenidos de una necropsia. Cuando un patógeno contamina una colonia y los animales se enferman, se observan signos clínicos y/o lesiones características del agente etiológico tales como diarrea, secreción nasal, conjuntivitis, letargo, parálisis de los miembros, pérdida del equilibrio, pelo hirsuto, emaciación, disminución de la productividad, muerte de lactantes, neumonía, hepatitis, enteritis y muerte súbita de animales adultos (Besselsen *et al.*, 2008).

Los relevamientos microbiológicos se refieren al resultado de pruebas que se realizan para conocer la prevalencia de agentes infecciosos en los animales de laboratorio y proporcionan información sobre la incidencia de contaminaciones microbianas en las colonias durante un periodo (Besselsen *et al.*, 2009).

La calidad sanitaria es el resultado directo del programa de gestión del bioterio y de las prácticas de control sanitario en los animales. Esto es de gran importancia cuando se implementa en las colonias que se mantienen bajo un sistema de barreras sanitarias de protección, que impiden o minimizan el ingreso de microorganismos y donde el estricto control sanitario garantiza la eficiencia de los sistemas de bioseguridad adoptados. En estas condiciones, los microorganismos que se someten a control incluyen una amplia lista de potenciales patógenos específicos de cada especie. En las colonias que se mantienen en condiciones convencionales con mínimas barreras sanitarias, el control de los microorganismos se limita obligatoriamente a todas las zoonosis y a los agentes de alta patogenicidad específicos de la especie animal alojada que puedan afectar de manera significativa el curso de los experimentos. En el caso de los animales SPF se controlan además de los anteriores, una lista de patógenos (Tabla 1) consensuada y en correspondencia con los estándares internacionales en la que se incluyen los microorganismos de alta prevalencia y distribución

mundial capaces de infectar a la colonia y de producir alteraciones en las investigaciones y ensayos. En el caso de este trabajo se consideró la lista de la Federación Europea de Sociedades de Ciencia de Animales de Laboratorio (FELASA) (Malher *et al.*, 2014).

	Cada 3 meses	Anual
Virus		
Virus de la hepatitis del ratón	x	
Rotavirus del ratón	x	
Norovirus murinos	x	
Parvovirus:		
Virus diminuto del ratón	x	
Parvovirus del ratón	x	
Virus de la Encefalomiелitis de Theiler	x	
Virus de la Linfocromeningitis		x
Adenovirus del ratón tipo 1 (FL)		x
Adenovirus del ratón tipo 2 (K87)		x
Virus Ectromelia		x
Virus de la Neumonía del ratón		x
Reovirus tipo 3		x
Virus Sendai		x
Bacterias		
<i>Helicobacter</i> spp.	x	
(se recomienda <i>H. hepaticus</i> , <i>H. bilis</i> and <i>H. typhlonius</i>)		
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	x	
<i>Streptococci b-haemolytic (not group D)</i>	x	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	x	
<i>Citrobacter rodentium</i>		x
<i>Clostridium piliforme</i>		x
<i>Corynebacterium kutscheri</i>		x
<i>Mycoplasma pulmonis</i>		x
<i>Salmonella</i> spp.		x
<i>Streptobacillus moniliformis</i>		x
Parásitos		
Endo y ectoparásitos (hasta nivel de género)	x	

Tabla 1: Lista de agentes patógenos que deben ser controlados según FELASA (Malher *et al.*, 2014).

La precisión y confiabilidad de los resultados que se obtienen mediante los controles microbiológicos depende fundamentalmente de la muestra que se tome de la colonia o grupo de animales. Esta debe ser significativa, científica y estadísticamente válida y debe responder

al tamaño de la colonia. Los animales deben ser elegidos al azar de cada unidad dentro de la colonia. Las pruebas serológicas para detección de anticuerpos deben realizarse en los animales adultos inmunocompetentes que han permanecido en la colonia el tiempo suficiente requerido para estar en contacto, contaminarse con el posible agente patógeno y desarrollar anticuerpos. Por lo tanto, los animales elegidos deben ser mayores de ocho semanas, obtenidos de los núcleos de fundación y de expansión de las colonias (FELASA, 2014).. Para los estudios histopatológicos y para los que se realizan a través de la técnica de PCR, se aconseja utilizar animales jóvenes debido a que son más susceptibles a contraer la infección, además, en ellos las lesiones son más evidentes y en estos se pueden multiplicar mayor número de patógenos. Los estudios mencionados se pueden utilizar para observar los ratones con inmunodeficiencias graves que producen poco o ningún anticuerpo como el caso de los ratones *Scid* y *nude* (*nu/nu*). Una alternativa para el control de salud de los animales inmunodeficientes es el uso de animales centinelas. Un animal centinela es aquel que posee una condición sanitaria y genética conocida, que se pone en contacto directo o indirectamente con los animales a controlar y actúa reemplazando a los individuos de la colonia. Pueden ser, según el caso, inmunocompetentes y/o inmunodeficientes. Para control de ratones que presenten algún tipo de inmunodeficiencia se utilizan centinelas inmunocompetentes. Es importante tomar precauciones en el uso de animales centinelas, ya que pueden albergar microorganismos no patógenos u oportunistas que pueden resultar peligrosos para las cepas con inmunodeficiencia severa como la *Scid* y en algunos animales de líneas transgénicas y *knock-out*. En estos animales un microorganismo considerado oportunista o perteneciente a la flora normal puede transformarse en patógeno y causar lesiones o incluso una enfermedad mortal. Por lo tanto, se recomienda realizar controles en una muestra del animal completo proveniente del núcleo de fundación de estas colonias una vez al año, de manera de asegurar la identificación de microorganismos patógenos que no se hubieran aislado en los centinelas (Nicklas *et al*, 2002; Graham & Prescott, 2015).

Las muestras para desarrollar las pruebas serológicas deben ser de animales adultos jóvenes (8 a 12 semanas de edad) y adultos mayores (más de 6 meses). Si el bioterio tiene más de una especie animal, cada especie debe controlarse por separado (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

El tamaño de la muestra para detectar la presencia de un agente infeccioso depende del grado de infección de la población animal y el nivel de confianza deseado. El grado de infección está

influenciado por varios factores, como la capacidad de infección del patógeno, cepa y la edad del animal, la etapa de la infección, la densidad de población, las técnicas de gestión que se hayan implementado y la instalación de barreras sanitarias. En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestra, la relación entre el grado de infección de la población y el tamaño de muestra necesario para detectar la infección con diferentes límites de confianza. La siguiente ecuación permite calcular el tamaño de la muestra en una población: $A = \log a / \log N$, donde A es el número de animales a ser examinados, $a = 0,05$ (95% de nivel de confianza) y N es porcentaje de animales no infectados (Armitage *et al.*, 1992).

LÍMITE DE CONFIANZA		
GRADO DE INFECCIÓN(%)	99% (a = 0,01)	95% (a = 0,05)
	Número de Animales (N)	Número de Animales (N)
10	44	29
20	21	14
30	13	9
40	9	6
50	7	5
60	5	4
70	4	3
80	3	2
90	2	2

Tabla 2: Tamaño mínimo de la muestra para la detección de una infección en una colonia de 100 o más animales (Armitage *et al.*, 1992).

La toma de muestras para los controles sanitarios debe cumplir con criterios de ejecución en forma permanente y segura. La frecuencia de los controles depende de la condición sanitaria de los animales. En animales *Germ Free*, libres de gérmenes o *axénicos* que están libres de todo organismo detectable por los métodos hasta ahora conocidos, la frecuencia debe ser cada 15 días mientras que en animales convencionales (libres de zoonosis) puede limitarse a una vez al año. El método tradicional utilizado para controles sanitarios de ratones, ratas (SPF), cobayos y hámsters consiste en tomar una muestra de 8 a 10 animales de cada unidad de alojamiento integrada y distribuida en animales recién destetados, adultos jóvenes y viejos. En las especies mencionadas se aconseja realizarlo con una frecuencia de 3 meses, excepto en las colonias de conejos que se puede realizar cada seis meses (Nicklas *et al.*, 2002).

Actualmente se está imponiendo el uso de racks ventilados para la producción y mantenimiento de animales. En este caso al momento de la toma de muestra para realizar un control sanitario debe considerarse a cada rack como una unidad o colonia independiente. Los racks ventilados se utilizan habitualmente en el mantenimiento de animales transgénicos. Estos animales además de no ser en general numerosos, son costosos y es frecuente que no se pueda disponer de un número suficiente de animales para realizar el control microbiológico de rutina, lo cual obliga a considerar otras alternativas. Una opción es el uso de animales centinelas los cuales deben provenir de colonias cuyo estado sanitario sea conocido. Los mismos se introducen en el mismo rack donde se mantienen los animales problema durante 3 meses, luego de este periodo se les realiza el control sanitario, reemplazando así a los transgénicos (Cagliada *et al.*, 2016).

Otra alternativa para el control de los animales alojados en racks ventilados es tomar muestras de sangre de los animales (gota de sangre) y/o muestras de polvo acumulado en los filtros de salida del aire para luego procesadas por métodos sensibles de detección de patógenos (Compton *et al.*, 2004). Las instalaciones de producción de animales con sistemas de barreras, deben tener un diseño que permita en el caso de detectarse una contaminación en un área, tener la posibilidad de aislar el lugar en forma rápida y evitar la propagación de los agentes infecciosos a otras unidades y es por ese motivo que los intervalos entre los controles sanitarios de los animales no deben ser demasiado espaciados (Clough, 1988).

Los agentes infecciosos de los animales de laboratorio incluyen los de alta y baja patogenicidad incluyendo las zoonosis, los oportunistas y los comensales. La planificación de un programa de control sanitario debe incluir los agentes que se controlaran en las pruebas de diagnóstico y aquellos consensuados en los estándares internacionales. Por razones prácticas es casi imposible controlar todos los agentes infecciosos o todos aquellos que pueden interferir con un estudio en particular. En la selección de microorganismos patógenos se debe tener en cuenta el estado de la salud de la colonia y el propósito del experimento en el que se utilizan los animales. Los diferentes ensayos pueden ser afectados de diversas maneras por patógenos tales como virus, bacterias, hongos y parásitos. Cuando un patógeno infecta a los animales, su sistema inmunológico se activa y puede producirse tanto la estimulación como la depresión funcional, por lo tanto con animales en estas condiciones no es posible obtener resultados experimentales confiables y precisos (Ayala *et al.*, 2004).

En la actualidad se han descrito cientos de potenciales patógenos para ratones, ratas, cobayos, conejos y hámsters. Con el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico para la detección e identificación de patógenos en animales de laboratorio, la tendencia es el incremento del número de agentes de este listado (Besselsen *et al* 2009; Buer & Balling, 2003). Los microorganismos patógenos para los animales de laboratorio deben controlarse teniendo en cuenta su prevalencia, el impacto en los resultados de la investigación, la relevancia del agente a nivel internacional y la disponibilidad de pruebas de diagnóstico. La contaminación de una colonia por un agente infeccioso, se puede afirmar una vez que se lo aisló e identificó correctamente, de lo contrario debe declararse que fueron detectados anticuerpos contra dicho agente en uno o más animales examinados. Una vez detectada la presencia del agente en la colonia, este debe ser informado como presente en el seguimiento posterior, hasta que se haya erradicado por métodos de histerectomía, transferencia de embriones o en caso de la sustitución de la colonia por animales libres de patógenos específicos (Buer & Balling, 2003; Nicklas *et al.*, 2012).

Los virus murinos que afectan a los animales de experimentación son el mayor problema en la investigación inmunológica y oncológica porque los ensayos para investigar los efectos adversos o contraindicaciones en la administración de un fármaco a largo plazo, se apoyan en las valoraciones de la sangre, de histopatología y en los cambios de los parámetros bioquímicos normales y otros que se produzcan en el cuerpo de los animales causados por agentes infecciosos y que pueden afectar los resultados (Compton, 2001; Nicklas *et al.*, 2012; Nicklas *et al.*, 2002).

Los procedimientos utilizados para la certificación de la sanidad animal incluyen pruebas serológicas, cultivo y pruebas bacteriológicas, técnicas moleculares, parasitológicas y exámenes clínicos e histopatológicos. Cada prueba puede incluir varios procedimientos para detectar diferentes agentes infecciosos u otros procesos patológicos. Los programas de certificación sanitaria de los animales dependen de la clasificación sanitaria de los mismos, infraestructura, equipamiento, número de agentes controlados, la variedad de pruebas de diagnóstico y la frecuencia de dichos controles. Algunos de estos programas se limitan a un único tipo de pruebas, ya sean parasitológicas, bacteriológicas, serológicas o moleculares. Sin embargo, se recomienda utilizar procedimientos estándar dentro de las buenas prácticas de laboratorio (BPL), integrados en un programa de control de calidad (Shek, 2000). Es importante tener en cuenta que solamente el resultado del conjunto de pruebas puede dar una información

confiable sobre la condición sanitaria de un grupo de animales en un momento determinado. De todas maneras se considera que en la planificación de programas de control sanitario de animales de experimentación no existe la certeza absoluta sobre su eficiencia y precisión que asegure la identificación de microorganismos que estén contaminando la colonia (Nicklas *et al.*, 2012; Nicklas *et al.*, 2002; Buer & Balling, 2003).

3. Infecciones virales

Muchos agentes virales producen infecciones enzoóticas y asintomáticas que pueden estar presentes en las colonias de animales de laboratorio y pasan desapercibidas por el técnico encargado de la producción o cuidado de los animales del bioterio. Por lo tanto, se deben elegir métodos que puedan demostrar la presencia de estos microorganismos en una colonia. Al interpretar el estado microbiológico de los animales de laboratorio, debe entenderse que infección y enfermedad no son sinónimos. La infección se refiere a la invasión y multiplicación de microorganismos en los tejidos corporales y puede ocurrir con o sin enfermedad aparente. La enfermedad se refiere a la interrupción o desviación de la estructura y función normales de cualquier tejido, órgano o sistema. Muchas de las infecciones que nos preocupan pueden no causar una enfermedad observable en muchas cepas de ratones. Sin embargo, pueden causar cambios no aparentes o subclínicos que pueden interferir con la investigación. A menudo, dicha interferencia no se detecta y, por lo tanto, se pueden obtener y publicar resultados alterados. Los tipos de interferencia de un agente en los resultados experimentales pueden ser diversos, pero no hay duda de que las complicaciones de la investigación, debidas a una enfermedad infecciosa manifiesta son importantes y que los animales con signos clínicos de enfermedad no deben utilizarse para experimentos científicos. Las infecciones clínicamente inaparentes también pueden tener efectos graves en las experiencias con animales, pues existen numerosos ejemplos de influencias de microorganismos en la fisiología del huésped y, por tanto, de la interferencia de infecciones inaparentes con los resultados de ensayos con animales. Muchos microorganismos tienen el potencial de inducir la activación o la supresión del sistema inmunológico, o ambos al mismo tiempo, pero en diferentes partes del sistema inmunológico independientemente del nivel de patogenicidad. Todas las infecciones, aparentes o inaparentes, es probable que aumenten la variabilidad y, por lo tanto, den lugar a un mayor número de animales necesarios para obtener resultados estadísticamente confiables. Los microorganismos, en particular los virus, presentes

en un animal pueden contaminar materiales biológicos como sueros, células o tumores y esto puede interferir con los experimentos *in vitro* realizados con dichos materiales y también puede provocar la contaminación de los animales. La prueba de producción de anticuerpos de ratón (MAP) o la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los productos biológicos que se van a inocular en ratones es un componente importante de un programa de prevención de enfermedades. Finalmente, las infecciones latentes pueden ser activadas por factores ambientales, por procedimientos experimentales o por la combinación e interacción entre varios microorganismos. Por todas estas razones es esencial la prevención de la infección y no simplemente la prevención de la enfermedad clínica. Desafortunadamente, las complicaciones de la investigación debidas a agentes infecciosos generalmente se consideran artefactos y se publican solo de manera excepcional y por lo tanto la información sobre las influencias de los microorganismos en los experimentos son difíciles de encontrar ya que se encuentra dispersa en diversas revistas científicas y muchos artículos (Nicklas *et al.*, 2012)

El diagnóstico viral se basa en el examen directo de material biológico para detectar virus o antígenos virales. Algunos virus o sus antígenos pueden detectarse en el citoplasma o en el núcleo de las células de órganos diana, lesiones, exudados, heces, orina, secreciones respiratorias, sangre y líquido cefalorraquídeo. La eficacia de este procedimiento en la posible detección viral depende de la recolección, conservación y el procesamiento correcto del material clínico. Las técnicas serológicas de ELISA como también inmunohistoquímica e inmunofluorescencia directa (IFA) o indirecta (IFI) y las técnicas moleculares como la PCR, son ejemplos de métodos de diagnóstico rápido. Esta técnica permite detectar directamente la presencia del ácido nucleico del agente (Besselsen, 1998; Nicklas *et al.*, 2002).

Para el aislamiento del virus se puede realizar la técnica de PCR o utilizar el material biológico bajo sospecha para realizar una inoculación en sistemas sensibles y obtener la replicación viral. Estos pueden ser: cultivos celulares, huevos embrionados o animales lactantes. Los signos de la multiplicación del virus en estos sistemas incluyen:

- Efecto citopático característico en cultivos de células: la formación de sincicios (MHV, ectromelia, citomegalovirus), o muerte celular (Sendai, TMEV, REO, parvovirus).
- Muerte del embrión, presencia de placas en formación en la membrana corioalantoidea de huevos embrionados inoculados con la muestra o hemaglutinación del líquido amniótico o membrana corioalantoidea (Sendai, Ectromelia).

- Signos neurológicos (TMEV) y muerte de los animales lactantes inoculados.

La efectividad de la prueba depende del momento de la toma de muestra (etapa infecciosa de la enfermedad) y del tiempo de procesamiento de la misma. Asimismo, posteriormente deben realizarse otras pruebas directas como la microscopía electrónica o técnicas serológicas adicionales, tales como IHA, ELISA, IFA, IFI o seroneutralización para identificar el virus aislado. La técnica de PCR permite detectar directamente la presencia del ácido nucleico del agente (Kraft *et al.*, 1994).

Las infecciones virales son la mayor preocupación para los responsables de la salud de los animales de laboratorio y el personal de las instalaciones de animales, debido a su potencial de propagación en una instalación, las enfermedades que pueden causar y su impacto en la investigación. Existen muchos virus y muchos de los cuales tienen subcepas o serotipos adicionales que infectan a los animales. Sin embargo, la prevalencia de estos virus varía mucho, y algunos ya es muy poco probable de detectar en las instalaciones de animales de laboratorio. Algunas infecciones virales, como el citomegalovirus murino (MCMV), el virus tímico de ratón (MTV), el poliomavirus murino (MPyV), el virus de la ectromelia (ECTRO), el reovirus (REO) han disminuido significativamente desde la década de 1990 y se han vuelto raras o inexistentes en las colonias de ratones. Con base en datos serológicos o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los últimos quince años (Weisbroth, 1999; Prichett-Corning *et al.*, 2009; Mahler *et al.*, 2014), los agentes virales más prevalentes en las instalaciones actuales son los norovirus de ratón (MNV), virus de la hepatitis de ratón (MHV), parvovirus de ratón (MPV) y rotavirus de ratón (MRV, conocido como diarrea epizootica de ratones lactantes, EDIM). Los agentes como MNV y MPV se eliminan en las heces de los ratones hasta por 2 meses, incluso en ratones inmunocompetentes. Además, los virus pequeños sin envoltura (es decir, MPV, MNV, MRV) son muy resistentes a la inactivación química o ambiental. Por el contrario, aunque el MHV no permanece activo durante períodos prolongados en el medio ambiente, es muy contagioso y, por lo tanto, sigue siendo un importante agente infeccioso en las instalaciones para ratones, especialmente en los ratones alojados de forma convencional. Es probable que algunos agentes prevalezcan simplemente porque se han reconocido recientemente es decir, MNV y MuAstV. Recientemente descubiertos, el astrovirus murino (MuAstV) y el parvovirus del riñón (MKPV) aún no han sido objeto de vigilancia generalizada, por lo que la prevalencia de estos virus en las instalaciones con animales de investigación se desconoce actualmente. La importancia de estas infecciones virales para los científicos es su

impacto potencial en la investigación, que varía según la vía de infección (es decir, infección natural versus experimental), factores del huésped (es decir, cepa de ratón, edad, características inmunológicas, etc) y factores virales (es decir, cepa virulenta versus avirulenta; Fox *et al.*, 2006; Pritchett-Corning *et al.*, 2009; Besselsen *et al.*, 2008; Mahler *et al.*, 2014). En la actualidad se clasifican los virus murinos en grupos de riesgo según la importancia de la interferencia con la investigación, la infectividad y el potencial de propagación y las dificultades de detección y eliminación. Un esquema de clasificación simple de la A a la D se basa en estos criterios. Los virus de los grupos A y B tienen más probabilidades de afectar negativamente a la investigación y, para el grupo A, presentan el riesgo de infección humana.

Los virus del grupo C tienen un impacto mínimo en la investigación y no son comunes, mientras que los del grupo D son virus descubiertos recientemente cuyo impacto en la investigación no es bien conocido. Por ejemplo, el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) y el hantavirus se encuentran en el nivel de riesgo A debido a su potencial zoonótico, es decir, su capacidad para infectar a humanos y animales. Algunos otros agentes virales, incluidos el adenovirus murino-1 (MAdV-1), ECTRO, cepas politrópicas de MHV y el virus Sendai (SV), también se clasifican como nivel de riesgo A porque son capaces de causar enfermedades clínicas tanto en el sistema inmunológico de ratones adultos competentes e inmunodeficientes. Los virus en el nivel de riesgo B pueden interferir con experimentos específicos que involucran el sistema inmunitario del huésped (parvovirus, MCMV, MTV, virus elevador de la lactato deshidrogenasa [LDEV], cepas enterotrópicas de MHV, el sistema nervioso central (virus de la encefalomiелitis murina de Theiler, TMEV), o sistemas gastrointestinales (MAdV-2, MRV).

La transmisión natural de virus murinos ocurre con mayor frecuencia a través de la vía oral fecal o fómites (p. ej., MAdV, ECTA, MNV, MuAstV, EDIM, TMEV, MHV, REO). Otras vías de transmisión incluyen el contacto directo (p. ej., parvovirus, MTV, MCMV, LCMV), respiratorio (p. ej., virus poliooma MPyV, virus de la neumonía de ratones PVM, SV, MHV) y transmisión vertical (p. ej., LCMV, LDEV) (Fox *et al.*, 2006; Percy & Barthold, 2007; Nicklas *et al.*, 2002).

4. Alcance de la Gestión en el control de la Salud

A medida que la calidad microbiológica de los animales de laboratorio evolucionó con el tiempo, también lo hicieron los alcances de los conceptos de control sanitario (Figura 2). En la fase inicial del mantenimiento de roedores, los animales reproductores infectados de forma natural albergaban potencialmente varios patógenos, lo que provocaba enfermedades clínicas graves y

muerres repentinas de cohortes enteras de animales de la colonia. Durante este tiempo, la tarea principal era simplemente mantener animales vivos y, posteriormente, identificar los agentes causales. Con la ayuda de los procedimientos de rederivación gnotobiótica llevados a cabo mediante una histerectomía o transferencia de embriones de las crías de animales donantes infectados y la posterior crianza por madres adoptivas no infectadas, se eliminaron los patógenos típicos de las colonias. Con el desarrollo de métodos de diagnóstico (detección) confiables y más sensibles, la comunidad científica se volvió cada vez más consciente de que incluso las infecciones subclínicas con ciertos patógenos tienen un impacto pronunciado en diferentes modelos animales, cambiando el enfoque de la estandarización microbiológica hacia aspectos de asegurar la calidad en la investigación (Pritchett-Corning *et al.*, 2009; Besselsen *et al.*, 2008).

Recomendaciones concretas para programas sistemáticos de control sanitario destinados a un alto nivel de estandarización higiénica mediante la definición de patógenos específicos, se fueron incluyendo en los procedimientos y esta "exclusión" máxima de agentes en las colonias, y los repetidos ciclos de derivación llevaron a una situación en la que algunos roedores albergan un microbioma artificialmente limitado. La mejora adicional de los métodos de diagnóstico y el rápido desarrollo de las técnicas moleculares crean actualmente una mayor conciencia de la sorprendente influencia de la composición del microbioma en los modelos animales. Los conceptos modernos de control sanitario deben tener en cuenta este impacto para garantizar el valor de la ciencia biomédica. Esto requiere, entre otras, la inclusión de técnicas metagenómicas así como una visión diferenciada del manejo de salud animal (Rahman *et al.*, 2020; Balls *et al.*, 2019).

«Cronología de los últimos 140 años de trabajo experimental con roedores»

Los controles de salud evolucionaron de manera análoga a la mejora de la calidad microbiológica

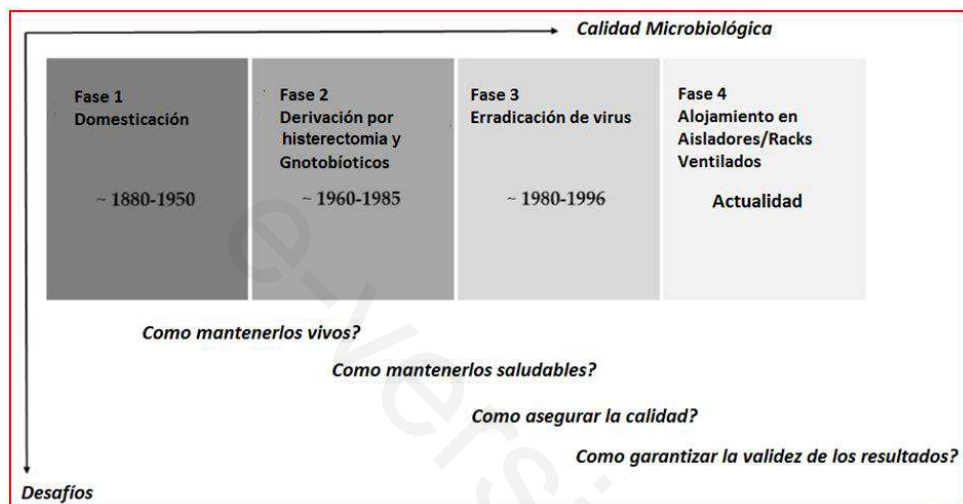


Figura 2: Cronología de los últimos 140 años en relación a la condición microbiológica de los animales de experimentación (Buer & Balling, 2003).

En principio, todas estas etapas históricas aún deben respetarse en los programas modernos de monitoreo de la salud, ya que los impactos de los patógenos, por un lado, y el microbioma, por el otro, son igualmente importantes. Por lo tanto, el personal responsable debe dominar las competencias y habilidades subyacentes, que van desde el conocimiento de los agentes microbianos críticos para la salud animal o la investigación, las técnicas de necropsia y diagnóstico, la comprensión básica de la epidemiología, hasta el impacto del microbioma en los modelos de investigación. En relación al proceso de la Fase 1 a la 2 mencionado en la figura 2 se conoce que antes de que las técnicas de rederivación estuvieran disponibles, los roedores de laboratorio se infectaban naturalmente con varios patógenos, lo que afectaba su estado general de salud. Las muertes debidas a enfermedades infecciosas se volvieron ocasionales

con la mejora de las técnicas de cría y la disminución de la prevalencia de los agentes. Sin embargo, los brotes enzoóticos siguen representando un riesgo para las colonias experimentales y de reproducción, ya que las fugas o rotura de una barrera nunca se puede excluir por completo y además ocurre que los animales vivos se transportan internacionalmente para el intercambio entre instituciones y la situación se puede complicar con aquellos modelos inmunocomprometidos que son muy susceptibles incluso a los patógenos oportunistas predominantes. La introducción accidental de patógenos también ocurre a través de material biológico, que se inyecta o se aplica intencionalmente a los animales durante los experimentos (Buer & Balling, 2003).

Agentes Microbianos que afectan la supervivencia de las colonias de animales con alta tasa de mortalidad era de esperarse en escenarios de una infección epizootica (aguda) con agentes virales, como el Respiravirus Murino, también conocido como Virus Sendai (SeV), Virus de la Linfocoriomeningitis (LCMV), variantes enterotrópicas del virus de la Hepatitis del ratón (MHV) o virus de la Ectromelia. Los dos últimos virus solo infectan colonias de ratones y por el contrario, SeV y LCMV tienen un espectro de huéspedes más amplio, causando enfermedad en la mayoría de las especies de roedores y, en el caso de LCMV, también se pueden transmitir a los primates, incluidos los humanos considerándose una zoonosis. Si bien la mayoría de las infecciones bacterianas no provocan una mortalidad aguda, la infección por *Clostridium piliforme*, el agente causante de la enfermedad de Tyzzer, puede provocar la muerte súbita de animales jóvenes, especialmente en la fase de bacteria formadora de endosporas. *C. piliforme* es infeccioso durante largos periodos de tiempo en el medio ambiente, lo que, junto a la capacidad de infectar a la mayoría de las especies de mamíferos, posee una alta prevalencia en las colonias de roedores de laboratorio, inclusive en los jerbos mongoles que son muy susceptibles a la enfermedad de Tyzzer y donde las infecciones de animales adultos provocan síntomas clínicos graves. La neumonía bacteriana es una causa común de muerte aguda estacional en cobayos de laboratorio, ocasionada por *Bordetella bronchiseptica* y que puede aislarse con frecuencia de tejido pulmonar o traqueal infectado, a menudo asociado con otros patógenos oportunistas como *Pasteurella multocida*, *Rodentibacter pneumotropicus* o *Streptococcus pneumoniae*. Teniendo en cuenta que las colonias de ratones y ratas muy a menudo se infectan de forma subclínica con las bacterias antes mencionadas, las diferentes especies de animales deben alojarse por separado dentro de una instalación o bioterio (Tannenbaum *et al.*, 2015; Curzer *et al.*, 2016).

5. Control de enfermedades en animales de laboratorio

Para un control eficaz de las enfermedades en las instalaciones para animales de laboratorio, deben realizarse regularmente controles sanitarios que constan de exámenes clínicos y necropsias de animales de la colonia, centinelas, enfermos o muertos, como también a través de muestras de heces, sangre, escaras, pelos, exudados, etc. La evaluación anatomopatológica de la morfología de los órganos sirve como una poderosa herramienta para identificar fenotipos de enfermedades comunes y discriminar aquellos probablemente causados por una etiología infecciosa de los trastornos típicos inducidos genética o ambientalmente, como la hidronefrosis, la dermatitis ulcerativa o alteraciones del íleon asociado a la lactancia. Por lo tanto, la capacitación del personal en habilidades básicas de diagnóstico y la posibilidad de realizar exámenes in situ es esencial y debe ser parte sustancial de todo programa sólido de vigilancia de la salud. También debe realizarse controles sanitarios en los materiales biológicos utilizados en la investigación in vivo, ya que pueden portar agentes patógenos que ponen en riesgo a los animales e incluso por las potenciales zoonosis que pueden contaminar las colonias de investigación. Esta situación es también de riesgo cuando los investigadores o colaboradores comparten o donan tejidos infectados y de esa manera contribuir involuntariamente a la propagación de agentes entre las instalaciones de todo el mundo. En dos encuestas diferentes analizaron sistemáticamente material biológico (en este caso: tumores) en USA y Europa donde encontraron consistentemente que más del 50% de todos los tumores de ratón analizados albergaban patógenos, principalmente virus, pero también micoplasmas y protozoos. Los datos reales indican que actualmente la prevalencia está disminuyendo; sin embargo, el material contaminado que permanece en los congeladores puede transmitir infecciones al utilizarlo en nuevos ensayos, como por ejemplo el virus Ectromelia a través de suero contaminado comprado comercialmente y que fue utilizado en algunas experiencias en instituciones de U.S.A, señalando que la detección prospectiva de todo el material biológico que se va a introducir en un animal es indispensable. Además del riesgo de causar enfermedades graves en los animales, también existen importantes problemas en la salud humana, ya que hay varios informes de infecciones accidentales de los empleados de investigación de las instalaciones con agentes zoonóticos como Hantavirus y El virus de la Linfocoriomeningitis debido al manejo de animales de investigación infectados subclínicamente. El material biológico puede examinarse mediante técnicas moleculares como ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el uso de las llamadas pruebas serológicas de producción

de anticuerpos (ratón/MAP o rata/RAP) que se basan en el análisis serológico de los animales, varias semanas después de que se les inyectó el material biológico respectivo. En esta última técnica de prueba *in vivo* no solo requiere el uso de animales, sino que también puede fallar potencialmente ya que se basa en una respuesta inmune completa de los animales inoculados por lo que actualmente es reemplazado casi por completo por el análisis directo del material biológico mediante ensayos de PCR para patógenos definidos (Pritchett-Corning *et al.*, 2009; Besselsen *et al.*, 2008).

En respuesta al desafío de mantener saludables a los animales (Figura 2) se entiende que muy pocos patógenos presentan altas tasas de mortalidad en animales inmunocompetentes, pero pueden causar formas clínicas de enfermedad, con síntomas que se manifiestan cuando los individuos son susceptibles a una infección con los respectivos patógenos. Hoy en día existe un número elevado de modelos de ratones y ratas que están disponibles en una amplia variedad de fuentes comerciales y no comerciales. Debido a los avances en las técnicas transgénicas y especialmente al desarrollo de tecnologías de edición del genoma, su número aumenta constantemente. Estos modelos pueden diferir sustancialmente en su respuesta inmunológica según sus antecedentes genéticos y/o sus alteraciones genéticas y, por lo tanto, pueden mostrar diferentes síntomas y variar en la gravedad del desarrollo de la enfermedad después de la infección. De hecho, la mayoría de los roedores experimentan formas subclínicas de infección, lo que significa que se convierten en portadores de patógenos, sin desarrollar síntomas clínicos. Cuando los animales con infección subclínica no se diagnostican, pueden diseminar agentes infecciosos en el medio ambiente sin control e infectar a otros individuos de la colonia. La infección puede volverse entonces enzoótica, lo que resulta en la persistencia del patógeno. La introducción de nuevas cepas en la sala de animales conducirá entonces a una infección epizoótica de los animales no infectados, provocando formas más o menos graves de enfermedades, dependiendo de su susceptibilidad al respectivo patógeno (Carty, 2008; Liang *et al.*, 2009).

6. Agentes patógenos en colonias de roedores de laboratorio

Entre los agentes que afectan la salud de los animales encontramos que la mayoría de los agentes infecciosos causan los síntomas más pronunciados en animales muy jóvenes, generalmente en la fase de destete, cuando otros factores estresantes y la ausencia de anticuerpos maternos permiten la proliferación descontrolada de patógenos. Un ejemplo

clásico del desarrollo de una enfermedad dependiente de la edad es una infección con Rotavirus, que resulta en la diarrea epizootica de ratones lactantes (EDIM), que es causada por el rotavirus de ratón tipo A, o la diarrea infecciosa de ratas lactantes (EDIR), causada por el rotavirus de rata tipo B. Aunque los animales de todos los grupos de edad son susceptibles, la enfermedad clínica en forma de heces acuosas, letargo y abdomen distendido ocurre exclusivamente en animales infectados entre el nacimiento y alrededor de las dos semanas de edad, lo que diferencia a EDIM/EDIR de otras infecciones asociadas con diarrea, como enfermedad de Tyzzer o formas enterotrópicas de MHV. Esas diferencias sustanciales dependientes de la edad con respecto a la susceptibilidad al virus son ventajas importantes en términos de procedimientos sanitarios, ya que la erradicación del virus puede lograrse de manera relativamente simple mediante un cese prolongado de la reproducción y estrictas medidas higiénicas. Debido a los procedimientos de desinfección y las estrictas medidas higiénicas, la prevalencia real de los rotavirus de ratón y rata es actualmente baja; sin embargo, pueden ocurrir brotes, como se informó recientemente después de la exposición de ratones transportados en cajas de envío contaminadas (FELASA, 2014; Feng *et al.*, 2005; Fermér *et al.*, 2002; de Bruin *et al.*, 2016).

Generalmente, la mayoría de los roedores son relativamente propensos a desarrollar enfermedades respiratorias crónicas. Las ratas son especialmente susceptibles a las infecciones por *Filobacterium rodentium*, anteriormente conocido como bacilo respiratorio asociado a cilios (CAR) o *Mycoplasma pulmonis*, que pueden causar infecciones graves de las vías respiratorias, especialmente cuando los animales están susceptibles debido a malas condiciones de alojamiento o coinfecciones con otros patógenos (oportunistas). Dado que los patógenos virales fueron erradicados en su mayoría de las colonias de roedores de laboratorio, las bacterias oportunistas son probablemente la amenaza más común para el estado de salud de los animales. En este contexto, los miembros de la familia Pasteurellaceae pueden considerarse patobiontes, ya que a menudo forman parte de la flora normal de las mucosas, pero también algunas cepas pueden inducir afecciones inflamatorias como conjuntivitis, dacrioadenitis o múltiples formaciones de abscesos en ratones y ratas susceptibles. Recientemente, las especies de Pasteurellaceae de los roedores se reclasificaron en el nuevo género *Rodentibacter*, con *Rodentibacter pneumotropicus* y *R. heyltii* (anteriormente conocida como *Pasteurella pneumotropica*) como las especies más prevalentes en las colonias de ratones y ratas de laboratorio. *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* sp. también son oportunistas

muy prevalentes en roedores de laboratorio y como ambos son agentes zoonóticos, la infección se puede dar de animales a humanos y viceversa. Sin embargo, dos estudios encontraron aislamientos de *Staphylococcus aureus* adaptados al huésped en colonias de ratones y ratas de laboratorio, que eran sensibles al tratamiento con meticilina. Aunque ambos agentes no son necesariamente dañinos para los animales, las cepas susceptibles pueden desarrollar síntomas clínicos debido a la colonización bacteriana natural. El desarrollo de otitis media causada por *Klebsiella oxytoca* se describió repetidamente en ratones C3H/HeJ, que expresan un receptor tipo Toll 4 (TLR4) disfuncional y, por lo tanto, exhiben mecanismos inmunitarios innatos deteriorados debido al reconocimiento insuficiente de patógenos. Además, *Klebsiella* induce infecciones urogenitales y neumonía en ratas LEW.1AR1iddm, que son propensas a desarrollar diabetes mellitus tipo 1 mediada por poblaciones de células T autorreactivas. Si bien en estos casos el desarrollo de la enfermedad se produjo en animales de alguna manera inmunomodulados, dos estudios describieron el desarrollo de botriomicosis inducida por *Staphylococcus aureus* y abscesos faciales en cepas exogámicas de ratones susceptibles.

También se ha informado que algunos animales son altamente susceptibles a infecciones con *Helicobacter* sp. y entonces las cepas de ratones y ratas inmunodeficientes sufren inflamación intestinal grave, en especial *Helicobacter hepaticus* que también puede inducir otras patologías como hepatitis y carcinogénesis de colon inducida por inflamación. Hasta ahora, se aislaron al menos nueve especies distintas de *Helicobacter* (*H. hepaticus*, *H. typhlonius*, *H. bilis*, *H. rodentium*, *H. ganmani*, *H. muridarum*, *H. mastomyrinus*, *H. rappini*, *H. trogonium*), del tracto gastrointestinal de roedores de laboratorio, razón por la cual las coinfecciones son frecuentes y pueden empeorar el desarrollo de la enfermedad. Debido a que la mayoría de las cepas de ratones y ratas inmunodeficientes modificadas genéticamente carecen de suficientes mecanismos de defensa contra los patógenos, esos animales son generalmente propensos a desarrollar enfermedades infecciosas y, como resultado, puede ocurrir espontáneamente una inflamación intestinal inespecífica después de la exposición a agentes oportunistas mixtos. Por las mismas razones, los roedores inmunodeficientes pueden desarrollar otras patologías tras la infección con microorganismos, que generalmente no son perjudiciales para los animales inmunocompetentes. En este contexto, se describió recientemente que los ratones NSG y NRG desarrollaron una pielonefritis ascendente después de la cirugía, que podría seguirse hasta una infección por *Candida albicans*. Otros informes describen el desarrollo de dermatitis hiperqueratósica inducida por *Corynebacterium bovis*, otitis media causada por *Ralstonia*

picketii. Una de las mayores amenazas para la salud de los animales inmunodeficientes, cuando son alojados junto con cepas inmunocompetentes, es sin duda la enfermedad respiratoria y la emaciación crónica debido a la infección por *Pneumocystis* sp., un hongo que causa neumonía intersticial grave. Aunque la inflamación pulmonar también puede ocurrir ocasionalmente en animales inmunocompetentes, una respuesta inmunitaria adaptativa intacta normalmente evitará el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, los animales colonizados de forma subclínica pueden transmitir agentes infecciosos a huéspedes susceptibles, lo que provoca síntomas clínicos graves en miembros inmunodeficientes de la colonia, mientras que las coinfecciones con otros agentes oportunistas pueden empeorar la patología general (Bauer *et al.*, 2004; FELASA, 2014; Feng *et al.*, 2005; Fermér *et al.*, 2002; de Bruin *et al.*, 2016; Costa & Wesse, 2019).

7. Agentes prevalentes en colonias de roedores

Las infecciones por el parvovirus de ratón (MPV1-5), virus diminuto del ratón (MMV) y los parvovirus de la rata como el virus Kilham (KRV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de la rata (RPV), y el virus Toolan's (H-1) son las contaminaciones virales naturales más frecuentes, pero también subestimadas, de las colonias de ratones y ratas de laboratorio pues en muchos casos son subclínicas. Como la mayoría de los Parvoviridae, los parvovirus de roedores requieren células que se dividen o diferencian activamente para poder sobrevivir y, por lo tanto, se replican predominantemente en células endoteliales, linfocitos y precursores hematopoyéticos. La replicación viral ocurre en el núcleo celular y requiere que la célula hospedadora se encuentre en fase S del ciclo de división celular. Esto se debe a que el virus posee un genoma pequeño y por lo tanto una limitada capacidad de codificación, por lo que no produce las enzimas necesarias para la replicación de su propio ADN y necesita utilizar la maquinaria enzimática de la célula hospedadora (Bauer *et al.*, 2004; Blank *et al.*, 2004; Macy *et al.*, 2011).

Aunque las infecciones naturales suelen permanecer asintomáticas, hay varios informes de alteraciones reproductivas cuando la infección se produce durante el desarrollo fetal. Además, las infecciones experimentales con MVM pueden provocar mielosupresión y lisis de linfocitos T en animales recién nacidos e inmunodeficientes, que incluso se volvieron letales dependiendo de la dosis de virus administrada. También se descubrió que el virus H-1 Toolan inducía

experimentalmente malformaciones del SNC y deformaciones del sistema esquelético, así como un aumento de la necrosis hepatocelular después de una lesión hepática provocada. A pesar de esas manifestaciones clínicas, el impacto de las infecciones por parvovirus en los resultados de la investigación es enorme, ya que influirá de forma masiva en los procesos relacionados con la proliferación celular. Mientras que algunos autores observaron propiedades inmunomoduladoras y mielosupresoras, los parvovirus de ratón y rata también revelaron un fuerte potencial oncosupresor, lo que provocó una disminución de la tasa de crecimiento y el rechazo de las células tumorales. Dado que los parvovirus pueden causar infecciones persistentes en una colonia, es preciso conocer el estado sanitario de los animales y la notable influencia que puede tener en sus resultados, especialmente en el campo de la inmunología y la oncología. Sin embargo, la eliminación de estos agentes de una colonia infectada puede ser un desafío, debido a su alta persistencia en el ambiente y el riesgo residual de infección después de los procedimientos higiénicos de derivación y las dificultades en el diagnóstico. La seroconversión es dependiente de la cepa de ratones y ratas y la intermitencia de la diseminación viral dan como resultado prevalencias aparentemente bajas dentro de una colonia determinada, lo que requiere la prueba de un número bastante grande de animales para revelar con éxito infecciones en curso. Sin embargo, las encuestas de condición sanitaria de varias instituciones en el mundo mostraron que la seroprevalencia de parvovirus en roedores de laboratorio, así como en animales de tiendas de mascotas, es generalmente alta, lo que indica que las infecciones siguen siendo endémicamente persistentes en la mayoría de las instalaciones. El virus más frecuente dentro de las colonias de ratones es el norovirus murino (MNV), probablemente debido a su descubrimiento relativamente reciente en 2003. Hasta entonces, las infecciones por MNV permanecieron sin diagnosticar y, por lo tanto, en su mayoría no se vieron afectadas por los procesos de rederivación. En general, las infecciones por MNV son asintomáticas en cepas de ratones inmunocompetentes y las formas clínicas de la enfermedad son muy raras, incluso en animales inmunodeficientes. Sin embargo, la infección por MNV puede conducir a una patología gastrointestinal en modelos de ratones susceptibles, por ejemplo, MNV causa la interrupción de la barrera epitelial intestinal en cepas de ratones con deficiencia de interleucina-10, que dependiendo del estímulo, desarrollan espontáneamente tiflocolitis crónica y son utilizados como modelo murino para la enfermedad inflamatoria intestinal. En un estudio que utilizó un modelo de ratón gnotobiótico se demostró que MNV exacerbó el fenotipo inflamatorio, generando un potente estímulo colitogénico e indicando

su posible impacto en los datos de investigación gastrointestinal. Por lo tanto, es imprescindible que los investigadores sean conscientes del impacto potencial de ciertos agentes en su campo específico y controlar el estado sanitario de su colonia. Dentro del grupo de bacterias, *Helicobacter* sp., *Staphylococcus aureus* y *Rodentibacter* spp. son los agentes más prevalentes en las colonias de roedores de laboratorio, que no solo afectan la salud animal al causar infecciones oportunistas en cepas susceptibles, sino que también pueden interferir con los resultados de la investigación en el caso de formas subclínicas de la enfermedad. Otros agentes, como *Filobacterium rodentium* y *Mycoplasma pulmonis*, se encuentran con menos frecuencia, pero pueden interferir fuertemente con las respuestas inmunitarias, si están presentes en la colonia. Las infecciones parasitarias también son comunes en los roedores de laboratorio, y en su mayoría incluyen endoparásitos como oxiuros o protozoos. En general, deberían surgir preocupaciones con respecto a los agentes zoonóticos, que hoy en día rara vez, pero ocasionalmente, se detectan en el laboratorio y también en roedores de tiendas de mascotas. Las infecciones reales de humanos ocurren especialmente en personas involucradas en el cuidado y manejo de animales subclínicamente infectados o después de lesiones con material contaminado. En este contexto, los hantavirus pueden ser los más preocupantes, ya que las infecciones agudas son una grave amenaza para la salud humana. Un estudio bibliográfico sistemático, basado en la serología del personal, determinó que 180 personas sufrieron manifestaciones clínicas de la enfermedad y 85 personas estaban infectadas de forma subclínica y, sin saberlo, adquirieron infecciones por Hantavirus al trabajar con colonias de ratas. El mismo estudio investigó la prevalencia de infecciones con LCMV y concluyó que miles de empleados y clientes de tiendas de mascotas probablemente desconocían su posible exposición a animales infectados. Ocurre que la infección por ambos agentes puede ser por vía aérea, lo que hace indispensables las medidas de protección, especialmente cuando las personas están expuestas a excreciones de roedores. Las infecciones por *Streptobacillus moniliformis*, el agente causal de la llamada “fiebre por mordedura de rata”, también son relevantes, pero se pueden diagnosticar más fácilmente, ya que la mayoría de las infecciones implican antecedentes positivos de mordedura de rata (Hsu *et al.*, 2006; Bauer *et al.*, 2016; Bootz *et al.*, 1998; Compton *et al.*, 2004; Compton & Riley, 200; Fornefett *et al.*, 2018; Gaertner *et al.*, 2007).

8. Recomendaciones de alojamiento para mantener la calidad sanitaria de los roedores de laboratorio

Actualmente en los animales de laboratorio y especialmente aquellos con funciones inmunitarias reducidas se alojan dentro de sistemas de barrera estrictos, para preservar una biocontención, que permite mantenerlos. Sumado a esto, es de gran importancia establecer programas sanitarios de rutina, con el objetivo de detectar patógenos en un momento temprano de la infección. Aquí, el uso de métodos tradicionales de diagnóstico bacteriológico, parasitológico y virológico en combinación con procedimientos de muestreo prospectivo e indicativo permite la detección rutinaria de agentes patógenos y oportunistas, así como la detección y posible eliminación de anomalías en el funcionamiento de barreras sanitarias observadas dentro de una colonia. En este contexto, la eutanasia de los animales enfermos y posterior necropsia, junto con los análisis anatomopatológicos clásicos, es de gran importancia, ya que es la base para el descubrimiento de nuevos patógenos, especialmente agentes virales, que de otro modo permanecerán sin identificar. Un ejemplo de ello es norovirus (MNV), así como el parvovirus del riñón de ratón (MKPV), que se descubrieron recientemente como los agentes causantes de la nefropatía por cuerpos de inclusión en cepas de ratones inmunodeficientes.

Estos agentes podrían identificarse como nuevos virus murinos y dado que se desconoce y, por lo tanto, no se han incluido en los diagnósticos de rutina durante mucho tiempo, la prevalencia de ambos suele ser alta en los establecimientos y es posible que aún sea necesario volver a realizar una limpieza de las colonias mediante transferencia embrionaria para establecer colonias libres de virus.

Al mejorar el estado general de salud de los animales de laboratorio, también permite estandarizar y minimizar las variables de los experimentos para garantizar la calidad de los datos de investigación biomédica.

En muchas publicaciones se informa sobre la influencia de los agentes infecciosos en los resultados experimentales, pero es más problemático en animales con infección subclínica cuando la infección permanece sin diagnosticar. Por lo tanto, es imprescindible la implementación de estrategias de control de salud actualizadas en las instituciones donde se producen o trabajan con animales de experimentación (Körner *et al.*, 2019; Henderson *et al.*, 2013; Fredricks & Relman, 1999).

9. Programa de control sanitario

Federación de Asociaciones Europeas de Ciencias de los Animales de Laboratorio (FELASA) ha publicado una serie de recomendaciones para el control sanitario de los animales utilizados con fines científicos. Esas recomendaciones se actualizan periódicamente y están disponibles para diferentes especies, incluidos roedores, cobayos y conejos rumiantes y cerdos y primates no humanos. La primera publicación sobre roedores se publicó en 1994 con la intención principal de armonizar los procedimientos de control sanitario entre las instalaciones de animales, especialmente para facilitar el intercambio de animales entre los investigadores que cooperan. A medida que aumenta el conocimiento sobre los agentes infecciosos con el tiempo, esas recomendaciones se revisaron dos veces con la última versión publicada en 2014 por Mähler *et al.* Aquí se definen criterios de calidad, que sirven como una valiosa orientación para programas sistemáticos de control sanitario en establecimientos destinados a la cría o uso experimental de animales de laboratorio, facilitando la armonización de procesos y el informe del estado de salud de los mismos. De acuerdo con esas recomendaciones, los principales objetivos de un programa de control sanitario deben incluir el bienestar animal (evitar las infecciones clínicas), mejorar la bioseguridad general (evitar las infecciones zoonóticas), así como la prevención de la interferencia del estatus sanitario con los resultados de la investigación (evitar las infecciones subclínicas). Por lo tanto, la lista de FELASA menciona anteriormente proporciona un informe de virus, bacterias, hongos y parásitos relevantes, incluidas recomendaciones concretas para sus frecuencias de prueba, según el riesgo respectivo de infectar una colonia. Además, se discuten críticamente los métodos de prueba comúnmente utilizados, la selección de animales/ centinelas y la interpretación de los resultados, con el objetivo de mejorar el estatus sanitario y la redacción de certificados de salud apropiados. Una colonia controlada de acuerdo con estas recomendaciones puede denominarse "libre de patógenos específicos" (SPF) si la misma está libre o es negativa para los agentes controlados. Desafortunadamente, se hizo más y más común malinterpretar la intención de esta publicación y utilizarla como una simple lista de exclusión de agentes. Por el contrario, los autores pretenden aportar información compacta del conocimiento actual en medicina de animales de laboratorio y enfatizan que los programas de control sanitario deben ser complejos, diseñados y supervisados por una persona competente en el campo de la biología y

de las enfermedades. La parte más crítica de un enfoque del control sanitario sistemático es probablemente la elección de los agentes, que deben definirse principalmente por su potencial zoonótico, patogenicidad (patógenos obligados, oportunistas y patobiontes) y el posible impacto en los resultados. Las recomendaciones antes mencionadas sirven aquí como una herramienta valiosa, ya que consideran a los agentes relevantes en su riesgo individual. Por lo tanto, los patógenos que se encuentran con frecuencia, como los parvovirus o el MHV, deben monitorearse al menos trimestralmente, mientras que una frecuencia de monitoreo anual debería ser suficiente para los agentes menos prevalentes, como el LCMV o la Ectromelia. Además de esos agentes obligatorios, en la lista de FELASA también definió algunos agentes adicionales, que no necesariamente tienen que ser incluidos en un programa de control sanitario, dependiendo de su relevancia individual para la instalación o ensayo a realizar. Lo que es más importante, los autores de la lista también señalaron que el panel de agentes controlados debe adaptarse críticamente a la situación actual y que por lo tanto se deben incluir más agentes, si se considera relevante. Entonces, la lista proporcionada no debe interpretarse como tallada en piedra, sino más bien como una base sólida sobre la que trabajar. Otra consideración esencial es el tamaño adecuado de una colonia, para lo cual se deben resumir los resultados del control sanitario. Por lo tanto, se deben definir unidades muestrales, que se caracterizan como aquellas partes de una instalación en las que los animales, el personal y el material se trasladan libremente, sin medidas sanitarias, y que, en consecuencia, se puede suponer que albergan el mismo espectro de gérmenes. El tamaño de una unidad muestral de este tipo puede variar enormemente, dependiendo de las medidas sanitarias aplicadas. Puede ser simplemente una habitación para uno o muchos animales, si los animales se alojan en sistemas de jaulas abiertas y cada habitación tiene su equipo individual de protección (ropa, guantes, barbijo, cofia, etc). Sin embargo, también puede ser un piso completo, que consta de varias salas para animales, si se permite que el personal cambie de sala sin cambiarse la ropa de protección. El tamaño mínimo puede ser incluso de una sola jaula, si los animales se mantienen en condiciones de microaislamiento, como las que existen en los sistemas de alojamiento en rack o cabina individual ventilada (IVC) y realizando el manejo de cambio de cama, alimentación y apareamiento de animales utilizando una cabina de seguridad de flujo laminar o también llamada estación de cambio y los procedimientos de desinfección implícitos. Los sistemas de jaulas IVC pueden prevenir de manera efectiva la transmisión de infecciones dentro de una colonia, pero también pueden complicar los

procedimientos de control sanitario de rutina, ya que el mismo obviamente no se puede realizar en el nivel de contención de cada jaula o caja. Para resolver este problema, entre de los métodos tradicionales de control de la salud se utilizan animales centinelas que se detalla más adelante. Dado que este enfoque tiene sus limitaciones y no es adecuado para todos los agentes, es esencial incluir pruebas directas en animales de colonia, especialmente cuando muestran signos clínicos de enfermedad, para mejorar el éxito del diagnóstico de agentes infecciosos (FELASA, 2014; Dubelko *et al.*, 2018; Compton *et al.*, 2004; Bruggeman *et al.*, 1989; de Souza & Smith 1989).

10. Descripción general de las infecciones prevalentes

La calidad de los animales utilizados en la investigación tiene un impacto directo en el valor de esa investigación. En el contexto de los ratones de investigación, esto significa utilizar animales genéticamente apropiados para una investigación específica y libre de la variabilidad inducida por infecciones. Desde una perspectiva genética, los investigadores abordan los problemas de calidad de los animales analizando la consistencia de los antecedentes genéticos en sus ratones y, en el caso de los ratones mutantes modificados genéticamente (*Genetically Engineered Models* o GEM, por sus siglas en inglés), buscando evidencia directa de la presencia de genes específicos de interés (o ausentes en el caso de los *Nocauts*). Es prudente realizar esta prueba antes de comenzar un proyecto de investigación costoso (Fahey *et al.*, 2013). Del mismo modo, es prudente verificar el estado de salud de las colonias de ratones de investigación para excluir los ratones comprometidos por infecciones. Incluso en ausencia de signos clínicos de enfermedad, las infecciones en ratones son bien conocidas como una fuente de variabilidad que puede tener efectos adversos en la investigación o presentar un peligro para la salud del personal de laboratorio (es decir, infecciones zoonóticas de ratones) y, por lo tanto, deben evitarse al realizar la investigación. Encuestas de prevalencia de agentes infecciosos murinos realizadas en instituciones de investigación de América del Norte (Carty, 2008), Europa (Mahler y Kohl, 2009), Japón (Hayashimoto *et al.*, 2013), Australasia (McInnes *et al.*, 2011) y Taiwán (Liang *et al.*, 2009) durante la última década han demostrado una prevalencia consistente de los agentes infecciosos en las colonias de ratones de laboratorio. Las especies y la prevalencia de los agentes (virus, bacterias, parásitos y hongos) consideradas dependieron de las áreas geográficas e instituciones seleccionadas. Sin embargo, estos datos indican que a pesar de los esfuerzos realizados en muchas instituciones

de investigación en todo el mundo para eliminar los agentes infecciosos y elevar el estado de salud de sus instalaciones de animales, los agentes infecciosos aún persisten, además, de aquellos que se están descubriendo y se encuentran con más frecuencia ahora que el control sanitario se realiza por métodos moleculares y de secuenciación del genoma, se vuelve más rápido, específico, sensible y menos costoso. El Astrovirus murino (MuAstV) es un ejemplo ya que el virus fue identificado por primera vez en 1985 por microscopía electrónica después de un brote de enterocolitis en una colonia de ratones desnudos y no fue caracterizado hasta 2013 mediante el uso de metagenómica viral. La disponibilidad de técnicas sofisticadas de diagnóstico molecular, el mayor uso de ratones inmunodeficientes, transgénicos y humanizados, así como el creciente intercambio de animales de investigación y productos animales entre los laboratorios, garantizan a nivel nacional e internacional que esta tendencia de enfermedades infecciosas emergentes/reemergentes continuarán. Entonces para evitar o minimizar los problemas generados por infecciones en los animales de laboratorio, las colonias deben someterse a pruebas periódicas para detectar agentes patógenos y establecer las medidas adoptadas para prevenir, controlar y eliminar infecciones (Blank *et al.*, 2011, Macy *et al.*, 2011). Los programas de control sanitario ofrecen los medios óptimos para detectar brotes de enfermedades en instalaciones para animales. La Federación de Asociaciones Europeas de Ciencias del Laboratorio (FELASA) enfatiza regularmente este hecho al describir meticulosamente directrices de control sanitario para roedores de laboratorio mantenidos en instalaciones de producción e investigación (Mahler *et al.*, 2014). Los programas de control sanitario generalmente se basan en listas estandarizadas establecidas desde hace mucho tiempo, sin embargo, es común que las instituciones que trabajan con animales de laboratorio adapten estos programas para satisfacer las necesidades específicas de sus instalaciones y ensayos, de manera rentable, ya que la prevalencia de patógenos murinos varía según la institución. Comprender los programas de control sanitario también es esencial para el bienestar de los animales como la preservación de la integridad de los datos y por eso, es importante, especialmente para estudiantes graduados, becarios posdoctorales, nuevos investigadores y otros con experiencia limitada que son responsables de controlar las infecciones en colonias de animales de laboratorio, que conozcan los programas sanitarios de sus propias instalaciones. Cuando se realiza con regularidad, el control sanitario animal proporciona a los responsables de las instalaciones de animales un flujo continuo de datos de prueba que les permite evaluar y ajustar los programas sanitarios preventivos diseñados para reducir y eliminar agentes

patógenos. Por ejemplo, en la década de 1960 y 1970, fue el inicio del desarrollo de programas de control sanitario en instalaciones para animales de laboratorio, en donde los patógenos murinos eran muy frecuentes y el objetivo del control sanitario era principalmente identificar los agentes patógenos que causan enfermedades y muertes en las instalaciones de animales. Hoy en día, muchos de estos agentes de enfermedades han sido completamente eliminados o severamente reducidos en colonias de ratones y el seguimiento de los ratones es dirigido al control de infecciones de agentes no deseados en la investigación debido a su posible interferencia en los resultados. Un programa de control sanitario debe contener una selección de agentes infecciosos, métodos de diagnóstico, medidas preventivas y planes de respuesta para hacer frente a alteraciones en la bioseguridad de las barreras sanitarias y brotes de infecciones o enfermedades. Existen pautas básicas para el establecimiento de programas estandarizados de control de salud (Mahler *et al.*, 2014). Sin embargo, el diseño de dichos programas requiere una evaluación de riesgos en la exposición potencial de los animales a agentes infecciosos relevantes para cada institución en particular y, por lo tanto, deben ser adaptables y flexibles. Se debe tener en cuenta una variedad de factores: los tipos de estudios que se realizan, sistemas de alojamiento, números y cepas/stock de animales, prevalencia local de agentes infecciosos específicos, prácticas de cuidado de los animales, historial de salud, infraestructura de las instalaciones, presencia de modelos animales no murinos y presupuesto disponible. Por lo general, como parte del proceso de planificación de un programa de control sanitario, el responsable de la producción y el cuidado de los animales debe establecer un diálogo con los investigadores para adquirir información detallada sobre las necesidades individuales de los mismos, pues son esenciales para desarrollar e implementar un programa eficiente y rentable (Besselsen 2009; FELASA, 2014)..

Con el auge del intercambio mundial de ratones mutantes modificados genéticamente (GEM) y materiales biológicos, se ha propuesto la armonización internacional de las normas para el control sanitario junto con la promoción de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento) en animales de laboratorio. Las instituciones y laboratorios que comercializan estos animales para usar en experimentación, se han esforzado por lograr dichos estándares basados en las recomendaciones de FELASA y otras instituciones internacionales. Sin embargo, los programas de control sanitario en instituciones de investigación y universidades son más complejos que los utilizados por proveedores comerciales, debido a los múltiples factores que se deben

considerar, como se mencionó anteriormente y por lo tanto, los estándares universales no siempre son aplicables y viables (FELASA, 2014; Compton *et al.*, 2017).

11. Cultivo microbiológico e identificación de bacterias, hongos y parásitos

El examen microscópico directo de muestras frescas se utiliza con frecuencia como el principal método de detección para la identificación de endo y ectoparásitos. Los endoparásitos como *Trichomonas* spp. pueden identificarse en el ciego y tejidos de colon triturados en solución salina, al igual que para otros parásitos protozoarios. La identificación de oxiuros y huevos de oxiuros también se puede hacer mediante un proceso, en donde los huevos se pueden concentrar mediante el pretratamiento de muestras de contenido intestinal con zinc o sulfato de sodio cuyas gravedades específicas permiten que los huevos "floten" sobre el medio después de la centrifugación. Luego, los huevos se adhieren a un cubreobjetos de vidrio, se unen a un portaobjetos para poder observar bajo un microscopio. Los ectoparásitos, como los ácaros de la piel, también se identifican mediante la evaluación microscópica directa de animales o de muestras del pelaje arrancadas de la cabeza y el cuello. En todos los casos, se requiere experiencia en la identificación microscópica de parásitos para confirmar de manera confiable la presencia de parásitos. Actualmente, la tendencia en el diagnóstico de parásitos se inclina hacia el uso de PCR en aquellas cepas inmunodeficientes y GEM, ya que las mismas, tienen una mayor susceptibilidad a los agentes infecciosos que sus contrapartes inmunocompetentes. Ocurre de igual manera en el caso de los hongos en donde *Pneumocystis murina* que es un patógeno oportunista ubicuo en ratones inmunocompetentes produce una infección clínicamente silenciosa controlada por una respuesta inmune mediada por células T. Sin embargo, en muchas cepas de ratones inmunodeficientes, *P. murina* produce infecciones pulmonares letales (Weisbroth, 2006). Dado que muchas cepas de GEM son "inmunovagas" (Treuting *et al.*, 2012), es decir, tienen una capacidad desconocida o variable para generar una respuesta inmune adquirida eficaz, estas cepas deben considerarse potencialmente susceptibles a las infecciones letales por *Pneumocystis*. Actualmente, el mejor método para identificar este agente en ratones es mediante PCR en una muestra de tejido pulmonar de animales potencialmente afectados. Esto requiere que los ratones sean sacrificados humanitariamente y que se envíe una muestra de pulmón a un laboratorio de diagnóstico. Por lo tanto se recomienda para la vigilancia de la salud de

las colonias de ratones inmunodeficientes, que los ratones inmunodeficientes sean tomados directamente de las poblaciones o sino los ratones centinela inmunodeficientes, para detectar la presencia de *Pneumocystis* en una colonia. Los ratones inmunodeficientes también son generalmente más susceptibles a infecciones con bacterias oportunistas que sus contrapartes inmunocompetentes. Pueden observarse abscesos, infecciones por mordeduras, otitis media y falta de desarrollo. El desarrollo de una enfermedad debida a infecciones internas puede deberse a la exposición de cepas de ratones inmunodeficientes a bacterias oportunistas que, de lo contrario, podrían no ser patógenas en ratones inmunocompetentes como es el caso de *Helicobacter* spp., *K. oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, algunas especies de *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Rodentibacter pneumotropicus* y *Corynebacterium bovis* que se encuentran entre las bacterias oportunistas más comúnmente identificadas en ratones inmunodeficientes infectados. Las fuentes de estas bacterias incluyen el ambiente local, técnicos del bioterio y el personal de investigación, así como también materiales no esterilizados (p. ej., alimento, jaulas, lecho) que no han sido esterilizados. Los agentes virales infecciosos suelen causar una infección aguda en ratones inmunocompetentes, seguida de una recuperación completa sin signos clínicos. Por el contrario, las infecciones en ratones inmunodeficientes pueden ser asintomáticas y persistentes. Los ratones se convierten en portadores crónicos de la colonia, especialmente si el virus se elimina a través de las heces (Effler *et al.*, 2008; Dole *et al.*, 2013; Charles Rivers, 2020; Buchheister *et al.*, 2008; Bootz *et al.*, 1998).

12. Prevención de infecciones

Las medidas diseñadas para prevenir las infecciones en los animales de investigación garantizan la salud y el bienestar de los mismos y se consideran inversiones valiosas tanto desde el punto de vista experimental como económico. Las medidas de bioseguridad, es decir, la suma de las prácticas de gestión de riesgos, emplean sistemas de barrera para minimizar el riesgo de introducción (bioexclusión) y propagación (biocontención) de agentes infecciosos dentro o entre unidades de animales de laboratorio y pueden implementarse en todos los niveles de una instalación de animales de investigación o producción, desde el diseño del edificio hasta la actividad del personal en una sala con animales. Ejemplos de bioseguridad aplicados a nivel de edificio son la filtración de aire de

partículas de alta eficiencia (HEPA) del ambiente de la sala y pasillos, como también los controles de acceso al “área limpia” para el personal de modo que solo las personas aprobadas puedan ingresar a una sala de animales mediante procedimientos detallados para el movimiento del personal y los animales de una sala a otra. Otro aspecto es el uso de materiales de construcción que puedan resistir la desinfección química repetida y la separación física de las áreas donde se preparan y manipulan los materiales de insumo limpios y esterilizados, lejos de los desechos de los animales y elementos de descarte. En términos generales, los investigadores, becarios doctorales y los estudiantes de posgrado no participan en la supervisión o el uso de medidas de bioseguridad en este nivel. En realidad estos deberían ser supervisados por el personal de administración de las instalaciones. No obstante, es preciso que conozcan y cumplan las medidas de bioseguridad a nivel de edificio en su institución en donde se encuentran las instalaciones con los animales. En otros casos, como la bioseguridad a nivel de la sala de los animales es muy crítica, puede darse una oportunidad para que los usuarios de ratones participen en la protección de sus animales contra la exposición a agentes infecciosos. Los animales de laboratorio (por ejemplo rata y ratón) generalmente se alojan en jaulas convencionales con o sin tapa de filtro y se colocan en estantes de un rack abierto en una sala (sin filtro HEPA) o puede ser, sistemas de racks con estantes y jaulas (con o sin filtro) en los que la sala está conectada de forma segura a un sistema que proporciona aire de entrada y salida filtrado por HEPA, sin exposición al aire exterior y generalmente con presión positiva en el ambiente, o también en jaulas ventiladas individualmente (IVC). Los sistemas de jaulas IVC se consideran muy seguros con respecto a la exposición de los animales a agentes infecciosos adventicios. Aunque el alojamiento en IVC ofrece una mayor protección contra la exposición inadvertida a agentes infecciosos (independientemente si los animales alojados son convencionales o SPF), los riesgos reales están asociados con el manejo de los animales durante los cambios de jaula, lecho, así como el uso experimental y otros manejos que presentan oportunidades para la exposición a los agentes infecciosos. Por lo tanto, la aplicación de medidas estrictas de bioseguridad en estos momentos críticos es imprescindible para minimizar el riesgo de un brote, como por ejemplo el contacto humano directo con ratones no es aconsejable ya que aumenta el riesgo de transmisión de bacterias oportunistas humanas a los ratones por exposición a la piel humana, aliento, secreciones nasales u orales. Para recoger y manipular ratones se deben usar guantes desinfectados o pinzas o fórceps que hayan sido tratados con

un desinfectante. Actualmente en concordancia con el bienestar animal se recomienda recoger los ratones en una disposición en copa (utilizando las manos) para el cambio de jaula. La combinación específica de equipo de protección personal (EPP) varía según la institución; sin embargo, en general, el personal que trabaja de forma rutinaria con animales siempre debe usar guantes y una bata/guardapolvo de laboratorio o un uniforme limpio o estéril. En las salas con una condición microbiológica más estricta (SPF) se deben usar máscaras, gorros y cubrezapatos o zapatos exclusivos para la sala de los animales. Los ratones inmunodeficientes y GEM alojados en salas o en aisladores con muchas barreras de bioseguridad absolutas, generalmente requieren un EPP más estricto. Se recomienda seguir las prácticas institucionales de bioseguridad, ya que cada uno de los artículos de PPE mencionados sirve para reducir la exposición de los ratones a la microflora humana y a los patógenos de los animales, ya que los humanos también pueden servir como fómites no intencionales para los agentes que se adquirieron en el ambiente fuera de las instalaciones de los ratones. Se deben tomar medidas de bioseguridad adicionales durante la manipulación experimental de los animales y el movimiento de ida y vuelta al laboratorio, o durante el movimiento entre salas. Lo ideal es que los procedimientos de investigación se realicen en un área de procedimiento asociada a la sala de los animales para evitar transportar a los mismos fuera de la sala de alojamiento. Los usuarios deben desinfectar periódicamente la sala de procedimientos y el equipo para evitar la transmisión de agentes infecciosos entre animales de diferentes proyectos o salas donde se alojan. La separación física de los animales según el estado de salud (grupo en cuarentena y residente) y la regulación del movimiento de los mismos y el tráfico humano es otra medida de bioseguridad que se emplea en muchas instituciones. Por esta razón, no se recomienda el movimiento de animales entre salas a menos que sea necesario. Además, cada habitación de animales puede tener su propia microflora ambiental, de la misma manera que la presente en los mismos. Por esta razón, mover animales a diferentes salas tiene el potencial de alterar esa microflora y constituir un cambio que podría afectar los resultados de la investigación. También es importante tener en cuenta que controlar todos los productos biológicos utilizados en los animales (p. ej., células, anticuerpos, proteínas, otras moléculas biológicas) por la potencial presencia de patógenos y evitar una transmisión involuntaria de enfermedades infecciosas. Aunque los métodos modernos de detección y los programas de control sanitario han facilitado la erradicación de muchos agentes infecciosos que eran comunes hace décadas en las colonias de

investigación, en la actualidad requieren de esfuerzos de colaboración para prevenir brotes inesperados. En términos generales, el personal responsable del cuidado de los animales está integrado por veterinarios, biólogos, biotecnólogos, técnicos de bioterio y directivos de las instalaciones quienes comparten el objetivo común de garantizar la integridad de la investigación a través del cuidado adecuado de la investigación con animales. Para lograr este objetivo, el personal debe estar familiarizado con los modelos animales y objetivos de investigación de cada ensayo. La comunicación entre el personal investigador y los responsables del cuidado de los animales juegan un papel fundamental en el mantenimiento apropiado de los programas de control sanitario, prácticas de bioseguridad y procedimientos de cuarentena que sirvan para prevenir brotes infecciosos y que las pruebas de salud se realicen correctamente, así como los resultados de las mismas se interpreten correctamente y los eventos imprevistos dentro de las instalaciones de animales sean atendidos con prontitud. Cuando eventos inesperados surgen, como el descubrimiento de animales enfermos o muertos o problemas con las salas de alojamiento de animales (p. ej., variaciones de temperatura, luz y humedad), se recomienda que el personal de investigación discuta los problemas con el personal de la instalación de inmediato para obtener asesoramiento y asistencia en el tratamiento de la situación. El personal del cuidado de los animales también puede ayudar a los nuevos miembros de la comunidad científica en familiarizarse con el uso de los animales en su investigación. Por ejemplo, las instituciones de investigación han requerido programas de entrenamiento para nuevos usuarios de animales. Estos programas presentan una oportunidad para que los investigadores obtengan información pertinente sobre la instalación en general, los animales, programas de salud y el marco legal e institucional (Fontaine *et al.*, 2015; FELASA 2014; Dubelko *et al.*, 2018).

13. Programa de control sanitario

El control sanitario de las colonias consiste en un programa definido de test repetitivos y estandarizados, para evidenciar la presencia de determinadas infecciones y/o patógenos presentes en una colonia de animales y es el principal mecanismo para asegurar en forma continua, la calidad microbiológica de los mismos. Es de gran valor cuando se lo utiliza en colonias de animales que se mantienen bajo un sistema de barreras sanitarias donde puede aplicarse un riguroso control microbiológico y de esta forma, asegurar la eficiencia de los

sistemas de barrera, las técnicas de manejo adoptadas, así como los informes sobre morbilidad y mortalidad que permiten la identificación anticipada de infecciones presentes y potenciales. Las investigaciones exhaustivas de enfermedades, muertes y resultados experimentales erróneos o inesperados, son componentes esenciales de este programa de salud en las colonias de animales. (Besselsen *et al.*, 2008; Voipio *et al.*, 2008; Fox *et al.*, 2006; Rehbindler *et al.*, 2000; Nicklas *et al.*, 2002; Nevalainen *et al.*, 2000).

En primer lugar, se debe entender la razón por la cual se debe realizar un control de salud y también considerar que es fundamental diseñar un control sanitario en base a las necesidades de cada institución o bioterio. En el caso de ser un bioterio de producción de animales de laboratorio es necesario certificar que la colonia está libre de patógenos y únicamente es posible hacerlo mediante un control sanitario; además de considerar que este requisito es muy importante para un centro productor de animales SPF. También hay controles de salud diseñados para aquellos casos en los cuales se van a recibir animales provenientes de otras instituciones que ayudan a prevenir la introducción de patógenos en las colonias. En estos casos se recomienda realizarlos como parte de la cuarentena.

Se pueden diseñar programas para diagnosticar la causa de enfermedades y eliminar rebrotes de infecciones en la colonia. Como también para ayudar a interpretar resultados dudosos o confusos de ensayos, donde se sospecha que las variables experimentales podrían deberse a la presencia de microorganismos en los animales y este control de salud podría ser la respuesta al problema (Besselsen *et al* 2009).

El objetivo es implementar un programa de control sanitario que sea adecuado, que permita obtener resultados útiles y no sea demasiado costoso. En muchos casos el costo es el factor determinante frente al presupuesto con que cuenta el bioterio. Obviamente, este es muy significativo, pero también debemos considerar la importancia que tiene el poder contar con un programa de salud que apoye a los investigadores, la investigación y a las experiencias que se realizan de las que se espera la obtención de resultados confiables. Es así que en un programa de control sanitario es importante considerar los siguientes factores: el costo, la experiencia que se va a realizar, el tipo de bioterio y los animales que se van a utilizar. También en las decisiones que se deben tomar al momento de diseñar un programa de salud adecuado, hay que considerar los siguientes aspectos: los patógenos que se van a incluir en el diagnóstico, la frecuencia con que se va a realizar el control, si se van a utilizar o no animales centinela, la

elección del laboratorio que va a realizar este control y el tipo de muestra a enviar (Hsu *et al.*, 2006; Prichett-Corning *et al.*, 2009; Hayashimoto *et al.*, 2013; Mähler *et al.*, 2013).

14. Técnicas moleculares RT pcr y PCR

El uso de técnicas moleculares (PCR y RT-PCR) para diagnosticar infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias en animales de laboratorio, se ha vuelto común como metodologías de reemplazando a los métodos serológicos, microscópicos y basados en cultivos. 24 Debido a que la mayoría de los animales de laboratorio son roedores, este libro se centrará en la detección de agentes infecciosos en roedores y su entorno, pero las pruebas de PCR y RT-PCR de muchas otras especies de laboratorio comúnmente utilizadas, como conejos, perros, gatos, hurones, cerdos, peces, ranas y Los primates no humanos están disponibles comercialmente. Organizaciones como FELASA y AALAS han desarrollado recomendaciones sobre qué agentes infecciosos analizar y excluir de las colonias de ratones y ratas, y la frecuencia con la que se deben realizar las pruebas. La PCR se utiliza para monitorear más de 60 agentes infecciosos de roedores (Figura 3).

Microorganismo**Técnica****Bacterias, Protozoos y Hongos**

<i>Corynebacterium kutscheri</i>	PCR/cultivo
<i>Corynebacterium bovis</i>	PCR
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	PCR/cultivo
<i>Helicobacter</i> spp (<i>H. hepaticus</i> , <i>H. bilis</i> y <i>H. rappini</i>)	PCR
<i>Pasteurella pneumotrópica</i>	PCR/cultivo
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	PCR
<i>Filobacterium rodentium</i> (Car-Bacillus)	PCR
<i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer)	PCR
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	cultivo
<i>Streptococcus beta hemolítico</i>	cultivo
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	cultivo
<i>Citrobacter rodentium</i>	PCR/cultivo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	PCR/cultivo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PCR/cultivo
<i>Proteus mirabilis</i>	cultivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	cultivo
<i>Salmonella</i> spp.	PCR/cultivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	cultivo
<i>Pneumocystis carinii</i>	PCR
<i>Cryptosporidium</i> spp.	PCR

Métodos parasitológicos (flotación, sedimentación, cinta engomada y observación directa en MO) para la investigación de ecto y endoparásitos:

Polyplax spinulosa, *Polyplax serrata*, *Radfordia affinis*, *Radfordia ensifera*, *Myobia musculi*, *Myocoptes musculus*, *Spironucleus muris*, *Giardia muris*, *Tritrichomonas muris*, *Trichomonas minuta*, *Himenolepis diminuta*, *Himenolepis nana*, *Chilomastix bettencourt*, *Entamoeba muris*, *Eimeria* sp, *Hexamastix*

Virus	
Microorganismo	Técnica
Virus diminuto del ratón (MVM)	PCR/ELISA/IFI
Parvovirus del ratón (MPV)	PCR/IFI
Parvovirus del riñón (MKPV)	PCR
Virus de la Hepatitis del Ratón (MHV-3)	RT-PCR/IFI
Virus de la Sialodacrioadenitis	RT-PCR/IFI
Rotavirus del ratón (EDIM)	RT-PCR/IFI
Norovirus murino	RT-PCR
Virus de la encefalomiелitis del ratón (TMEV GD VII)	RT-PCR/IFI
Virus Theiler de la rata	RT-PCR/IFI
Adenovirus del ratón (tipo 1 y 2)	PCR
Reovirus tipo 3	RT-PCR/IFI
Parvovirus de la rata:	
(Virus Kilham, Virus H-1 (Toolan)	
Parvovirus de la rata (RPV) y	
Virus diminuto de la rata (MVR)	PCR/IFI
Virus de la viruela del ratón (Ectromelia)	PCR
Virus de la Pneumonia del ratón	RT-PCR
Virus Sendai	RT-PCR/IFI
Astrovirus del ratón	RT-PCR

Figura 3: Agentes controlados y técnicas utilizadas en el control sanitario del LAE.FCV.UNLP.

También se han publicado guías de seguimiento de la salud de FELASA para hámsters, cobayos, conejos y primates no humanos.

La PCR o la RT-PCR pueden superar muchas de las limitaciones de otros métodos de detección de patógenos y, por lo tanto, representan un perfeccionamiento del control de la salud en el bioterio. Dicho en forma breve, los métodos de diagnóstico basados en PCR amplifican el genoma de los virus presentes o liberados de células infectadas o el ADN de bacterias, hongos o parásitos. Existen varias ventajas de la PCR y que son su velocidad, sensibilidad y especificidad. A diferencia de las técnicas serológicas o microbiológicas, el diagnóstico molecular puede amplificar una región específica de un gen desde unas pocas copias hasta billones en unas pocas horas. Sin embargo, la alta sensibilidad de la PCR

puede dar lugar a falsos positivos si las muestras o reactivos están contaminados con ácidos nucleicos del agente infeccioso (controles positivos) o productos de ensayos de PCR recientes. Por otro lado, debido a que el ARN es propenso a la degradación por las RNasas, la RT-PCR puede ser propenso a falsos negativos si no se tiene cuidado para evitar la degradación del ARN durante la recolección de muestras y la extracción de ARN. De todas maneras, lo atractivo de utilizar la PCR es su versatilidad, ya que se puede utilizar en muestras de tejido o excrementos de cualquier especie de animal o de muestras tomadas del entorno de animales de laboratorio. La recolección de muestras para las pruebas de PCR requiere saber qué tejidos se infectan con el agente de interés y dónde se elimina el patógeno. Los cebadores de ADN seleccionados para la PCR determinan su especificidad y se diseñan basándose en los datos de secuencias disponibles y pueden ser específicos al amplificar una sola especie de un agente (por ejemplo, *Mycoplasma pulmonis*) o genéricos al amplificar varios agentes relacionados (todas las especies de *Mycoplasma*). Para agentes que evolucionan rápidamente, como los virus de ARN, un cambio de nucleótido en la región del cebador puede provocar un resultado falso negativo en el sentido de que el agente está presente en la muestra, pero el gen objetivo no está amplificado, es por eso que conviene conseguir cebadores que amplifiquen regiones más conservadas y no aquellas variables. Por mencionar un ejemplo se observa en los Norovirus una variabilidad genética que hace difícil el desarrollo de una prueba de amplificación simple y genérica. Por ello, se recomienda efectuar esta diferenciación por técnicas de secuenciación genómica para su confirmación (Bauer *et al.*, 2016; 2004; Besselsen *et al.*, 2003; Blank *et al.*, 2004).

15. PCR en infecciones virales

Los signos clínicos y/o histopatología producidos por algunos virus son específicos de un solo virus. Por ejemplo, las lesiones dérmicas características del virus Ectromelia, la cromodaciorrea y los estornudos provocados por el coronavirus de rata, los sincitios de enterocitos en ratones jóvenes provocados por el virus de la hepatitis murina (MHV) o las inclusiones intranucleares acidófilas en las glándulas salivales provocadas por el virus de la Ectromelia y el citomegalovirus de la rata. Todos pueden usarse para hacer un diagnóstico presuntivo. Sin embargo, los virus que causan lesiones distintivas graves esencialmente se han eliminado de las colonias de roedores de laboratorio, lo que ha resultado en centrarse

en virus que causan poca o ninguna patología o morbilidad. Por lo tanto, el diagnóstico de infecciones virales en roedores mediante serología se ha convertido en el método de diagnóstico más común. Los métodos serológicos detectan anticuerpos específicos del agente infeccioso en la sangre extraída de un animal. La serología es un método indirecto para detectar infección; por lo tanto, no es necesario conocer el tejido que alberga la infección. Debido a que en la mayoría de las pruebas serológicas se utilizan anticuerpos secundarios específicos de especie, se limitan a aquellas especies para las cuales se encuentran disponibles fuentes comerciales de anticuerpos específicos de especie. Los anticuerpos específicos del virus se detectan por primera vez en animales inmunocompetentes entre 5 y 7 días después de la infección y los niveles máximos de anticuerpos se detectan entre 10 y 20 días después de la infección. Debido a que los anticuerpos pueden persistir durante meses, es posible que un animal seropositivo no sea diagnosticado de infectado y es posible que el agente infeccioso ya haya sido eliminado. La presencia de anticuerpos virales en un ratón o rata de destete, puede representar una transferencia de anticuerpos maternos de una madre infectada, en lugar de una infección del animal destetado. Las pruebas serológicas no son apropiadas para animales inmunocomprometidos o previamente neonatos que no generan una respuesta de anticuerpos adecuada. Aunque se pueden cuantificar las respuestas serológicas, una respuesta de anticuerpos más fuerte no se correlaciona con la presencia de cargas virales más altas en el animal. La serología en animales centinela se utiliza en muchas instalaciones de roedores de laboratorio para monitorear la salud, ya que el suero de un único animal centinela se puede usar para determinar si se produjo una infección en cualquiera de las jaulas de ratones o ratas experimentales de las cuales se recogió el lecho sucio de cama. Una limitación de los centinelas es que los virus que no se transmiten por vía fecal-oral, como el virus Sendai, el virus de la coriomeningitis linfocitaria y el coronavirus de rata, no se detectarán eficazmente. El crecimiento de virus en cultivos de células comerciales se puede utilizar para la detección de infecciones virales en las primeras etapas de la infección, antes de que se produzca una respuesta inmune contra el virus en los animales. Sin embargo, los métodos de detección viral basados en cultivos están limitados por el hecho de que no todos los virus pueden cultivarse en células y pocos laboratorios con animales de laboratorio están equipados para cultivo de virus. Además, muchos virus no producen efectos citopáticos visibles en los cultivos de células o deben realizarse varios pasajes del cultivo antes de que los efectos citopáticos sean

evidentes, lo que dificulta determinar si se ha producido una infección. Además, si se analiza una muestra en busca de múltiples virus, es posible que se necesiten varios tipos de células diferentes para cultivar todas las especies virales que están presentes. Una vez que se ha aislado un virus de un cultivo de células, se utilizan otros métodos, como la serología o la PCR, para especificar el virus. La PCR de ácidos nucleicos virales extraídos de tejido infectado puede detectar la presencia de un virus mucho más rápidamente que los métodos basados en cultivos. Los métodos de diagnóstico basados en cultivos solo detectan formas infecciosas del virus, y pueden ser necesarios días o semanas de incubación antes de que el virus sea detectable. En cambio, la PCR detecta virus infecciosos, formas no infecciosas del virus y transcripciones virales presentes en células infectadas. Para la detección por PCR, es crucial saber qué tejidos están infectados por el virus, para tomar muestras de los sitios correctos. La PCR cuantitativa (qPCR o qRT PCR) se puede utilizar para medir la cantidad de ácidos nucleicos virales presentes en la muestra. Si bien la cantidad de genomas virales y la cantidad de partículas virales infecciosas generalmente no son iguales, la PCR se puede utilizar para comparar los títulos virales en reservas o tejidos virales. La PCR es útil para determinar el título relativo de virus que no pueden cultivarse *in vitro* (por ejemplo, el virus elevador de lactato deshidrogenasa y el astrovirus murino). Durante un brote, la PCR seguida de la secuenciación del producto amplificado se puede utilizar para determinar si la cepa del virus es la misma en dos grupos de animales (por ejemplo, animales de colonias residentes o establecidas en comparación con animales recién llegados o en cuarentena). La capacidad de la PCR para detectar tempranamente infecciones virales antes de que se produzca la seroconversión puede ser de ayuda y se utiliza para determinar qué animales deben retirarse de la sala, para disminuir el riesgo de transmisión viral dentro de una población de animales de laboratorio. Para algunos virus, como el parvovirus del ratón, no todas las cepas de ratones son igualmente susceptibles a la infección, así como también la duración de la infección y la cantidad de virus eliminado varía entre cepas, por lo que puede ser necesario realizar pruebas en múltiples cepas de ratones para detectar la presencia de un agente infeccioso. Por lo tanto, se recomiendan varios controles de pruebas de salud en el año, antes de considerar una instalación libre de un agente infeccioso. La PCR también se puede utilizar para detectar virus en especies animales para las cuales los ensayos serológicos no son factibles debido a la falta de anticuerpos secundarios específicos de la especie o para las cuales no se dispone de líneas celulares adecuadas para el crecimiento y la titulación del virus. Por ejemplo, se han

detectado viruela del simio en ratas gigantes (*Cricetomys gambianus*) y perros de las praderas de cola negra (*Cynomys ludovicianus*) mediante PCR (Bootz *et al.*, 2003; Dillehay *et al.*, 1990; Charles River, 2020; Compton *et al.*, 2004).

16. PCR en infecciones bacterianas

Tradicionalmente, las infecciones bacterianas se han diagnosticado mediante el cultivo en medios nutritivos o selectivos en condiciones aeróbicas, microaerófilas o anaeróbicas. El cultivo de bacterias puede variar, en donde puede darse algunas de crecimiento lento, como las micobacterias, que pueden tardar hasta 6 semanas o en sitios donde prevalece la flora normal puede provocar un crecimiento excesivo de bacterias normales no patógenas que puede enmascarar la presencia de bacterias patógenas. Si se analiza una muestra para detectar múltiples bacterias, es posible que se requieran múltiples tipos de medios de cultivo y condiciones de cultivo. Una vez que se ha cultivado una bacteria, se puede realizar una coloración bacteriana para determinar la morfología bacteriana.

La espectrometría de masas o desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se puede realizar en un aislado bacteriano para especificar las bacterias.

También se puede determinar la susceptibilidad a los antibióticos de un aislado bacteriano. Las infecciones bacterianas también se pueden detectar en muestras de tejido teñidas, como por ejemplo, *Filobacterium rodentium* (anteriormente: bacilo respiratorio asociado a cilios o CAR-Bacillus) y *Helicobacter* sp. que se pueden visualizar en el tracto respiratorio o gastrointestinal usando una tinción a base de plata como Warthin-Starry. Existen métodos serológicos disponibles para la detección de infecciones con algunas especies bacterianas como puede ser la Microaglutinación en placa (MA) para detectar anticuerpos contra *Corynebacterium kutscheri* y *Bordetella bronchiseptica*.

Las infecciones respiratorias bacterianas son difíciles de detectar utilizando animales centinelas, ya que las bacterias generalmente no están presentes en el lecho de cama sucia, en concentraciones suficientes para causar infección y la posterior seroconversión del centinela. Por ejemplo, *F. rodentium* no se detecta eficazmente utilizando centinelas de ropa de cama sucia, pero puede detectarse mediante PCR en tejidos respiratorios congelados o fijados de roedores infectados, o a partir de hisopos orales o nasales. Se han desarrollado ensayos de PCR para detectar una amplia gama de agentes bacterianos de roedores, y la PCR puede ser muy eficaz para diferenciar patógenos de especies bacterianas no patógenas estrechamente

relacionadas. Por ejemplo, las pruebas bioquímicas de bacterias cultivadas de la piel de ratones desnudos infectados con *C. bovis* pueden revelar varias bacterias del género *Corynebacterium* con el mismo perfil bioquímico, mientras que MALDI-TOF o un ensayo de PCR dirigido al gen de virulencia de *C. bovis* detectará específicamente esa especie. No todas las bacterias se pueden cultivar. Del mismo modo, las diferentes tasas de crecimiento de las bacterias presentes en la muestra, pueden provocar un crecimiento excesivo de especies bacterianas de crecimiento más rápido y, por tanto, dificultar o evitar la detección de especies bacterianas de crecimiento más lento y de interés en el diagnóstico. Además, es posible que no se detecten bacterias en la muestra que requieren medios o condiciones de crecimiento especiales, si no se utilizan los medios correspondientes o las condiciones de crecimiento durante la detección. Un excelente ejemplo de esta limitación del cultivo como técnica de diagnóstico es *Helicobacter*, en donde más de 10 especies de *Helicobacter* pueden infectar a los roedores. y consideradas bacterias fastidiosas o difíciles de cultivar y por lo tanto, estos factores crean un desafío a la hora de determinar la especie de *Helicobacter* presente en los animales infectados. Por el contrario, si se utiliza la PCR como método de diagnóstico, se pueden utilizar cebadores genéricos de *Helicobacter* que detectan la mayoría de las especies, o se pueden diseñar cebadores para detectar solo una especie, como por ejemplo, *Helicobacter hepaticus*. Alternativamente, se pueden usar múltiples conjuntos de cebadores para detectar varias especies de *Helicobacter* en un solo ensayo (PCR múltiple). La PCR múltiple, al igual que otros ensayos multiplexados como los inmunoensayos fluorométricos multiplexados, utiliza menos reactivos y menos material de muestra que los ensayos individuales múltiples y por lo tanto es más rentable. Cuando se utilizan cebadores genéricos de *Helicobacter*, el producto de la PCR puede secuenciarse para determinar la especie de *Helicobacter* que se amplificó. La PCR también se puede utilizar para detectar rápidamente otras bacterias que crecen lentamente en medios de cultivo bacterianos, como *Mycobacterium* y *Mycoplasma*, incluso para bacterias que pueden cultivarse fácilmente, como *Rodentibacter*, la PCR es más sensible y más rápida que el cultivo. Para las bacterias zoonóticas, como *Streptobacillus moniliformis*, el uso de PCR en lugar de métodos de detección basados en cultivos tiene la ventaja adicional del beneficio de disminuir el tiempo y el riesgo para el personal de laboratorio (Fornes et al., 2018; Fermér et al., 2002).

17. PCR en infecciones parasitarias

La infestación de roedores con ácaros del pelaje (*Myobia musculi*, *Myocoptes musculinus* y *Radfordia affinis*) se ha diagnosticado tradicionalmente mediante la visualización de ácaros adultos, sus larvas y ninfas, o sus huevos mediante microscopía, debido a que la transmisión de los ácaros del pelaje a través del lecho sucio de las jaulas no es confiable. Por lo tanto se recomienda utilizar directamente ratones de la colonia para el muestreo. La PCR del ADN extraído de hisopados de piel fue más sensible que las pruebas de pelaje y piel en cinta adhesiva, y su sensibilidad fue similar a los exámenes de pelaje y piel para detección de ácaros por PCR. Esta técnica permite también detectar el ADN de los ácaros en todas las etapas de su ciclo de vida. Debido a que los genes de ARNr de *M. musculi* y *R. affinis* son 99% homólogos, ambos ácaros pueden amplificarse utilizando los mismos cebadores. También se ha utilizado la PCR de heces para detectar la presencia de *M. musculinus* ingerida por los ratones. La capacidad de detectar la infestación por *M. musculinus* en una colonia de ratones mediante PCR se puede ver afectada por la edad de los ratones evaluados, ya que los ratones más viejos tienen menores cargas de huevos y ácaros. Para una detección óptima, se debe considerar el sitio de muestreo en el ratón, ya que *M. musculinus* adulto se detecta con mayor prevalencia en muestras de piel del abdomen y la base dorsal de la cola, pero el número de huevos por lo general es mayor a lo largo de la línea media dorsal. Debido a que la PCR detecta ADN de ácaros vivos y muertos, los resultados positivos de la PCR con hisopo de piel de ratones tratados con Los antiparasitarios pueden indicar una infección activa residual, así como la presencia de ácaros muertos residuales en el ratón. Los ácaros foliculares como *Demodex musculi* generalmente se consideran comensales, pero pueden causar enfermedades en ratones inmunodeprimidos y se ha detectado *D. musculi* en muestras de piel de ratones inmunodeprimidos mediante PCR. Es de esperar que la detección *antemortem* de *D. musculi* en ratones inmunocompetentes sea un desafío debido a la muy baja carga de ácaros presente en los animales y tanto los métodos convencionales como los basados en PCR de prueba de ácaros pueden no detectar *D. musculi* en ratones en cuarentena, lo que conlleva a la introducción involuntaria de este ácaro en colonias de ratones residentes o establecidas.

Los oxiuros de los roedores (*Aspiculuris tetraptera*, *Syphacia obvelata* y *Syphacia muris*) se han diagnosticado tradicionalmente mediante el examen de heces, contenidos

intestinales o muestras de cinta adhesiva de la región perianal mediante microscopía; estas especies se pueden distinguir morfológicamente. La PCR para oxiuros es muy específica para diferenciar las tres especies de oxiuros, incluso cuando los roedores están infectados con más de una especie de oxiuros. También se puede utilizar la PCR de ADN fecal para detectar huevos y gusanos de *A. tetraoptera*. Varios estudios han comparado la sensibilidad de la PCR para *A. tetraoptera* con métodos de concentración y flotación fecal, con resultados divergentes. En algunos casos, la flotación fecal, la concentración por centrifugación fecal o la detección directa de adulto en las pruebas de detección fueron positivas para *A. tetraoptera*, mientras que la PCR fecal de *A. tetraoptera* fue negativa. Si bien cientos de *A. tetraoptera* adultos pueden estar presentes en el intestino de un solo ratón infestado, y cada gusano hembra adulto puede arrojar huevos varias veces durante su vida reproductiva de 21 a 26 días, el número de huevos presentes en el intestino y, por lo tanto, en las heces, puede variar ampliamente. Debido a que el número de huevos aislados de las heces fue mayor en ratones de 8 a 12 semanas de edad, se recomienda realizar pruebas en las heces de ratones adultos jóvenes cuando se analiza una colonia para detectar *A. tetraoptera*.

La PCR del ADN fecal se puede utilizar para detectar huevos de *Syphacia obvelata* o *Syphacia muris* y gusanos adultos. La PCR es más sensible que las pruebas con cinta perianal o la detección directa de gusanos desde el intestino, debido a que las hembras adultas de *S. obvelata* migran al ano y liberan sus huevos en una sola ráfaga, las pruebas con cinta adhesiva pueden dar resultados falsos negativos si las pruebas se realizan entre períodos de la liberación de huevos así como también la liberación intermitente de huevos puede dar lugar a resultados falsos negativos de la PCR para oxiuros si las heces se recolectan en momentos en que no se están eliminando los huevos. Puede ser necesaria la recolección y análisis repetidos de muestras fecales para confirmar la presencia o ausencia de infección por oxiuros. *Syphacia muris* muestra una periodicidad de eliminación de huevos de 2 a 3 semanas, siendo los huevos eliminados en mayor número a media tarde. Otros parásitos intestinales como *Entamoeba muris*, *Giardia muris*, *Spironucleus muris* y *Tritrichomonas muris* se pueden visualizar en el contenido intestinal y también se han desarrollado pruebas de PCR para estos parásitos intestinales que se realizan de forma rutinaria como parte de los procedimientos de control sanitario y de

cuarentena (Gerwin *et al.*, 2017; MetcalfPate *et al.*, 2011; Dole *et al.*, 2011; Effler *et al.*, 2008; Fain *et al.*, 2008).

18. PCR en infecciones por hongos

En general, los hongos crecen lentamente en cultivo y las infecciones fúngicas a menudo se diagnostican mediante histología. Los hongos patógenos más comunes presentes en roedores, *Pneumocystis murina* y *Pneumocystis carinii*, se han diagnosticado tradicionalmente mediante PCR de muestras de pulmones, lavados o aspirados broncoalveolares. Se utiliza también lavados nasofaríngeos e hisopos orales para detectar ADN de *Pneumocystis* spp.

Otro agente a considerar es *Batrachochytrium dendrobatidis* considerado un patógeno fúngico de gran preocupación en los anfibios (anuros, urodelos y cecilias). Para la detección de dicho agente por PCR se han utilizado hisopos de muestras de piel de ajolotes (*Ambystoma mexicanum*) y de tritones de piel rugosa (*Taricha granulosa*).³⁴ Se pueden utilizar cebadores específicos de los patógenos cuando se sospecha de una especie de hongo en particular. Si se busca una infección por hongos en un animal y ninguna especie de hongo en particular cultivada o identificada morfológicamente, entonces usando cebadores fúngicos genéricos y/o cebadores específicos de género por PCR, seguido de una secuenciación del producto de la misma, se puede utilizar para especificar los hongos que se detectan (Del Valle & Eisthen, 2019; Feldman & Ramirez, 2014; Davidson *et al.*, 2003; Feldman *et al.*, 1996; Icenhour *et al.*, 2001).

19. PCR en pruebas de contaminantes biológicos

Todas las muestras (tumores, líneas celulares, etc.) que se vayan a inocular en roedores deben analizarse para detectar la presencia de virus de roedores y *M. pulmonis*. Los tumores, tejidos y cepas de xenoinjertos derivados de pacientes humanos destinados a ser introducidos en ratones desnudos también deben analizarse para detectar *C. bovis*. La prueba de producción de anticuerpos en ratón (MAP) se desarrolló hace más de 70 años e implica la inoculación del material biológico en ratones a través de varias vías (intraperitoneal, intranasal y oral), seguida varias semanas después por la extracción de sangre de los ratones para pruebas serológicas. Las pruebas MAP requieren de un área específica para el aislamiento de los ratones inoculados y separados del resto de la colonia.

Una vez que se desarrollaron métodos basados en cultivos celulares para cultivar la mayoría de los agentes que debían controlarse, entonces se comenzó a utilizar pruebas basadas en cultivos celulares para detectar contaminantes biológicos. Este método implica la inoculación de varias líneas celulares susceptibles con la sustancia de prueba y luego tinción de las células inoculadas con anticuerpos antivirales para determinar si las células han producido antígenos virales.

Las pruebas MAP y los métodos de cultivo celular ahora han sido reemplazados por PCR/RT-PCR para detectar ácidos nucleicos virales y bacterianos presentes en las muestras de células, tejidos o tumores cultivados. Las pruebas moleculares de materiales biológicos tienen una sensibilidad equivalente o mayor que las pruebas MAP tradicionales y las pruebas de contaminantes biológicos basadas en PCR son más rápidas que las pruebas basadas en inoculaciones en animales o cultivos celulares, como también son coherentes con el principio de las 3R en el sentido de que los animales se sustituyen por un método alternativo. La PCR se puede utilizar para detectar agentes que no pueden cultivarse fácilmente en cultivos celulares, como el virus de la lactato deshidrogenasa. Además, las pruebas de PCR no dan como resultado una producción de virus en células o animales y que pueden infectar a roedores o humanos; y esto es importante para virus zoonóticos como el virus de la coriomeningitis linfocitaria (Henderson *et al.*, 2013; Ike *et al.*, 2007).

20. PCR de muestras recolectadas de forma no invasiva de roedores

La detección de infecciones mediante muestras recogidas con métodos no invasivos tiene varias ventajas; en primer lugar, es probable que proporcione un mejor bienestar animal que la recolección invasiva y en segundo lugar, pueden realizarse con más frecuencia. En tiempos pasados, la realización de múltiples pruebas serológicas requería más de 100 uL de sangre que se extraía del seno retroorbitario de animales anestesiados y era posible realizarlo semanalmente si se alternaban los ojos de los cuales se tomaban las muestras. Los métodos serológicos comerciales más nuevos (ELISA Multiplex) requieren menos sangre, de modo que a animales no anestesiados se les puede tomar muestras de sangre de la vena facial, safena o de la cola; sin embargo, se necesita sujeción y también puede ser necesario realizar una sedación, vasodilatación y rasurado del pelaje. Por el contrario, la recolección de heces, hisopos de muestras de piel se puede realizar diariamente sujetando al animal con la mano. La capacidad de recolectar múltiples muestras durante un periodo corto del mismo, permite

determinar el curso temporal de la infección, desarrollo de la enfermedad y posible eliminación del agente. Se pueden usar muestras secuenciales para determinar cuándo un animal ha eliminado la infección y, por lo tanto, ya no está disponible y no representa un riesgo de transmisión a otros animales de la colonia. Los agentes que se diseminan sólo durante un corto período de tiempo (como el rotavirus murino) o que se eliminan de forma intermitente (como los oxiuros), la infección puede pasar desapercibida si se recoge una sola muestra. Para este tipo de agentes infecciosos, la PCR debe utilizarse junto con los métodos tradicionales (serología, bacteriología o parasitología). La PCR de muestras tomadas de colonias individuales de ratones para el seguimiento de la salud es menos rentable debido a la gran cantidad de muestras que tendrían que analizarse, en comparación con la serología o las pruebas basadas en PCR de animales centinela. Sin embargo, debido a la alta sensibilidad de la PCR, se pueden combinar (pool) hasta 10 heces fecales de varios animales o hisopos fecales antes de la extracción del ácido nucleico y aun así producir un resultado positivo. Por lo tanto, todos los animales de una jaula se pueden analizar como una sola muestra. El efecto de la combinación de muestras sobre la sensibilidad de la PCR no se ha probado para todos los agentes, y la combinación de muestras podría complicar la detección de agentes que se eliminan de manera deficiente o intermitente. Una sola muestra fecal puede producir suficientes ácidos nucleicos para detectar un panel de más de 20 virus, bacterias y parásitos intestinales de roedores. Las muestras también se pueden combinar para otros métodos de diagnóstico (serología, cultivo y microscopía). El uso de cebadores del gen 16S rRNA bacteriano puede dar como resultado la amplificación de varias especies bacterianas estrechamente relacionadas (como múltiples especies de *Helicobacter*) en muestras fecales. Por el contrario, para la detección de una única especie patógena de bacteria en las heces y se utilizan cebadores específicos. A menudo se utilizan genes del factor de virulencia. Por ejemplo, se pueden utilizar cebadores específicos para el gen espB de *Citrobacter rodentium* para pruebas de PCR en heces de ratón. Agentes respiratorios, como el virus Sendai, *F. rodentium* y *Rodentibacter pneumotropicus*/*Rodentibacter heylii* (anteriormente *Pasteurella pneumotropica* biotipos Jawetz y Heylii) han sido difíciles de detectar usando centinelas de lecho sucio. Es probable que la cantidad de estos agentes que se eliminan en lecho sucio y que siguen siendo infecciosos sea muy baja. La PCR de muestras fecales se puede utilizar para detectar agentes respiratorios porque los animales tragan secreciones respiratorias que

contienen formas infecciosas y no infecciosas del agente. Sin embargo, la sensibilidad de la detección de agentes respiratorios en las heces es menor que aquellos agentes del sistema digestivo. Alternativamente, se pueden usar hisopos orales o nasales mínimamente invasivos para detectar patógenos respiratorios. Es recomendable utilizar una combinación de heces, piel e hisopos orales para analizar animales en cuarentena en busca de un panel de más de 30 virus, bacterias, hongos y parásitos de roedores. Por lo tanto, las pruebas directas en animales en cuarentena mediante PCR son consistentes con el principio de las 3R, en el sentido de que elimina la necesidad de centinelas de contacto (mejor que la variante de lecho sucio) en cuarentena y el riesgo de tener camadas no deseadas cuando las parejas reproductoras se alojan con ratones centinelas hembra (Fredricks *et al.*, 1999; Manuel *et al.*, 2016; Mailhoit *et al.*, 2020; Hoggatt *et al.*, 2016; Henderson *et al.*, 2013)

21. PCR de muestras ambientales

La recolección de muestras ambientales es incluso menos estresante que la recolección de heces o muestras de piel, ya que no requiere manipulación de los animales. Aunque el cultivo de agentes infecciosos de superficies ambientales tiene un uso limitado, ya que la desecación disminuye drásticamente la infectividad de muchas bacterias y virus. Sin embargo, se pueden recolectar muestras de sitios del ambiente, incluido el lecho sucio, las tapas de los filtros de las jaulas y las rejillas de las jaulas con ventilación individual (IVC), para realizar pruebas de PCR. Un inconveniente del control de la salud mediante PCR con hisopos, heces o piel y pelaje es que solo detecta agentes infecciosos que se encuentran en ese momento o más reciente en un aspecto temporal, dentro o sobre el animal. El uso de PCR de muestras ambientales como parte de un programa de monitoreo de salud permite la detección de agentes depositados durante un período más largo, ya que cada muestra representa la acumulación de agentes infecciosos y desechos no infecciosos depositados en el medio ambiente desde la última vez que se limpió el sitio de muestra. Se debe considerar de cual lugar tomar la muestra, con qué frecuencia y con qué desinfectar el ambiente si se detecta un agente es importante al diseñar un programa de monitoreo ambiental basado en PCR para agentes infecciosos en colonias de investigación o cría. Los agentes infecciosos diseminados por múltiples vías (fecal, oral, respiratoria, piel, pelaje) pueden detectarse mediante PCR en las superficies de las jaulas y/o en el lecho sucio. Un estudio demostró que durante un brote de coronavirus en ratas (que se

derraman con lágrimas y estornudos), la RT-PCR con hisopo de la superficie de la jaula fue más sensible que la RT-PCR de las glándulas salivales y de Harder y se pudo obtener resultados de la infección antes que los obtenidos por pruebas serológicas.

Otro estudio reveló que durante un brote de parvovirus de ratón (MPV), que se elimina en las heces, la PCR del ADN extraído de hisopos de la parte de la jaula que incluía el lecho sucio fue más efectiva para detectar MPV en una infección tardía que en los animales centinelas, pero menos efectivo que las PCR de materia fecal. También se han utilizado muestras de hisopos de jaulas o de lecho sucio para detectar ácaros del pelaje. En jaulas que contienen animales infectados/infestados con varios agentes infecciosos (como ser ratones silvestres o aquellos obtenidos en tiendas de mascotas), los hisopos de jaula, lecho sucio y heces representan las muestras que se puede analizar para detectar múltiples agentes mediante PCR.

Se han desarrollado varios métodos para controlar el polvo presente en el aire expulsado de las jaulas y estantes del IVC. Estos métodos se pueden utilizar para controlar colonias de animales de laboratorio en busca de agentes infecciosos, aunque las diferencias en el flujo de aire en diferentes modelos de los equipos pueden afectar la sensibilidad del método. Para los sistemas IVC en los que el aire se filtra a medida que sale de la jaula, las pruebas se realizan mejor al nivel de la jaula. El control a nivel de jaula se puede lograr colocando trozos de gasa o papel de filtro en la parte inferior de la tapa de las jaulas de los animales de la colonia o de los centinelas. En un estudio de control sanitario mediante PCR de ácidos nucleicos extraídos del material de recolección después de 1 a 90 días pudo detectar MHV, MPV, norovirus murino (MNV), virus Sendai, *Helicobacter* spp., *Rodentibacter* spp., *M. muscoli*, *M. musculus*, *A. tetraaptera*, *R. affinis*, *S. obvelata*, *Spironucleus muris* y *E. muris*. Los filtros colocados en las tapas de las jaulas centinela durante 3 meses, en comparación con 1 mes, tuvieron una mayor tasa de detección probablemente porque estuvieron expuestos a 12 muestras de lecho sucio en lugar de solo 4 muestras. En la PCR de ADN extraído del filtro con hisopos también fueron eficaces para detectar ácaros, oxiuros y *C. bovis*. Un estudio reciente demostró que el material de filtro colocado en la parte inferior de una jaula IVC que no contenía ratones centinela pero que recibía lecho sucio cada dos semanas durante 1 a 3 meses fue eficaz para detectar MNV, *Helicobacter* spp., *Rodentibacter* spp., *Spironucleus muris* y *E. muris* si las jaulas se agitaban durante 15 segundos dos veces por semana para aerosolizar pequeñas partículas

del lecho sucio. Para los sistemas de estantes IVC en los que el aire de salida se filtra al nivel del estante superior, el polvo del aire de salida se puede controlar mediante una PCR del material filtrante colocado en el prefiltro de salida. Varios estudios han investigado las pruebas del prefiltro de salida de los IVC utilizando varios modelos de equipos, la permanencia del material a controlar y la prevalencia de agentes infecciosos en los equipos IVC.

En un estudio que utilizó la PCR para muestras de gasa colocadas en el prefiltro de salida del IVC durante 1 a 42 días fue eficaz para detectar MHV, MPV, virus Sendai y *Helicobacter* spp. y que fueron extraídas de 4 jaulas de ratones infectados experimentalmente con cada agente. La PCR de ácidos nucleicos extraídos de una gasa colocada en el prefiltro de escape del IVC durante 1 a 12 semanas detectó MHV, MPV, *Helicobacter* spp., *Rodentibacter* spp., *E. muris*, *T. muris*, *M. musculus*, *R. affinis*, *A. tetraoptera* y *S. obvelata*, *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis* pero no MNV, provenientes de 1 a 5 jaulas de ratones infectados con cada agente.

Varios estudios han informado el uso de hisopos para monitorear el polvo del aire de salida de una variedad de IVC en los que el aire de salida no se filtra al nivel de la jaula y se pudo detectar ADN de ácaros de la piel (*M. musculus*, *A. tetraoptera* y *R. affinis*), incluso en el caso de existir una sola jaula de ratones infestados con ácaros. En otro estudio se detectó ADN de *C. bovis* en las conexiones de aire de salida de un IVC a una semana de haber sido infectados con ese agente una única jaula del rack ventilado. En un estudio reciente, se controlaron mediante PCR más de 1700 hisopos de las conexiones de aire de salida de varios IVC para detectar 14 bacterias oportunistas y *P. murina*; *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus aureus*, *R. pneumotropicus*, *R. heylis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados dieron positivo en al menos el 1% de los hisopos. Con esta información se observa que la duración de la exposición al polvo del aire de salida necesaria para detectar un agente, parece depender de la cantidad de agente infeccioso liberado al flujo de aire. Entonces es necesario un tiempo más corto, si la mayoría de las jaulas del estante albergan ratones infectados/infestados o durante infecciones agudas cuando se producen altos niveles del agente. Varios fabricantes de equipos IVC han realizado un diseño para facilitar el control del polvo del aire de salida mediante la incorporación de filtros y portafiltros especialmente diseñados. Un estudio reciente comparó 2 de estos sistemas y demostró que *Entamoeba*

spp., *Helicobacter* spp. y *Rodentibacter* spp. podían detectarse con cualquiera de los sistemas de filtro. En otro estudio, el control del polvo del aire de salida utilizando filtros especialmente diseñados fue más sensible que los centinelas de lecho sucio para detectar infecciones endémicas con *Helicobacter* spp. y *Rodentibacter* spp. Un aspecto esencial a tener en cuenta del uso de pruebas de PCR a partir de componentes de un IVC, es la descontaminación completa de la gradilla de muestra, antes de realizar pruebas en la misma, ya que el arrastre de ácidos nucleicos que pueden persistir puede dar lugar a resultados falsos positivos. También pueden ocurrir falsos positivos si los cebadores utilizados amplifican especies estrechamente relacionadas, como ocurrió con la detección de nematodos rhabditidos en lechos de marlo de maíz no esterilizados en autoclave usando cebadores de *Aspiculuris*. También debe considerarse que cualquier lugar de una instalación para animales de laboratorio, en el que se acumulen desechos generados por los mismos, puede analizarse para detectar ácidos nucleicos de agentes infecciosos. La PCR de los desechos de cama recolectados del prefiltro de una estación de cambio para animales de laboratorio, detectó varios agentes infecciosos endémicos en la colonia de ratones (MNV y *Helicobacter* spp.) y varios agentes infecciosos presentes en un pequeño número de jaulas de ratones infectados experimentalmente (MPV, *M. pulmonis*, *S. obvelata* y *M. musculus*). Después de la descontaminación con peróxido de hidrógeno vaporizado en una instalación que había alojado ratones infectados con *C. bovis*, se utilizó la técnica de PCR en muestras de hisopos de equipos, superficies en la sala y en los pasillos adyacentes para validar el proceso de descontaminación y no hubo resultados positivos. Para especies acuáticas, el agua o el sedimento del acuario o tanque se pueden analizar también mediante PCR para investigar el ADN de agentes infecciosos. Existen trabajos que informan que la PCR de hisopos de agua de salida con detritos de los acuarios es más sensible que la PCR del pez cebra para detectar micobacterias y microsporidios. También se detectó ADN de *Pseudoloma neurophilia* en óvulos y espermatozoides del pez cebra y del agua del acuario si la muestra se sonicaba para disgregar las esporas. En pruebas de PCR de muestras de filtros de agua y sedimentos en acuarios que albergan pez cebra se detectaron *Mycobacterium* spp., *Myxidium streisingeri*, *P. neurophilia*, *Pseudocapillaria tomentosa* y *Mycobacterium* spp.. *Pseudocapillaroides xenopi* fue detectado mediante PCR de sedimentos de acuarios que alojan ranas africanas (Dubelko *et al.*, 2018; Compton *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2013; Mahabir *et al.*, 2018; Mocho, 2016).

22. PCR en animales libres de gérmenes y análisis del microbioma

Además de los controles de salud de rutina y otras pruebas de diagnóstico en animales de laboratorio inmunocompetentes e inmunodeficientes que están colonizados con una amplia gama de organismos comensales, muchas instalaciones también mantienen colonias de animales gnotobióticos (incluidos los libres de gérmenes) que requieren un seguimiento de la salud especializado. La técnica de PCR que utiliza cebadores bacterianos de ARNr 16S, además del cultivo bacteriano, se utiliza para confirmar la ausencia de bacterias en animales libres de gérmenes. La PCR en heces de animales libres de gérmenes puede revelar rastros de ADN bacteriano de dietas basadas en ingredientes naturales, incluso después de que la dieta se haya esterilizado en autoclave, dando la impresión de que el animal y/o el aislador han visto comprometida su bioseguridad. Por lo tanto, no se debe utilizar la PCR por sí sola para determinar si se ha producido una violación de las barreras de bioseguridad.

Dentro de los usos de los animales libres de gérmenes encontramos el estudio del rol de los diferentes microbiomas en modelos animales utilizados para enfermedades como el cáncer, enterocolitis y la diabetes. El microbioma de los animales libres de gérmenes puede reconstituirse en algunos ensayos con un único agente bacteriano o con una mezcla compleja de agentes bacterianos para estudiar cómo estos afectan el fenotipo de la enfermedad. Tanto los factores de cría (alojamiento, dieta, lecho de cama) como los animales (genotipo, edad, sexo y origen) pueden alterar el microbioma fecal del ratón. Si bien en la actualidad el análisis del microbioma no se realiza de forma rutinaria como herramienta de diagnóstico en la medicina de los animales de laboratorio, comprender cómo se analiza el microbioma y qué puede alterarlo, es esencial para este campo. Un método que se utiliza para analizar el microbioma es la PCR de ARNr 16S, seguido de la secuenciación del conjunto de productos de PCR generados. El nuevo método de secuenciación metagenómica no requiere PCR, sino que implica romper el ADN microbiano presente en la muestra en pequeños fragmentos para la secuenciación y mediante el análisis bioinformático de los millones de secuencias generadas por estos métodos, es posible determinar la abundancia relativa de cada especie microbiana en la población. A medida que la secuenciación del microbioma completo (bacterias, virus, hongos y parásitos) se vuelve más asequible, esta metodología puede reemplazar los métodos de diagnóstico actuales para identificar agentes infecciosos conocidos en roedores y otros animales de laboratorio y tiene el potencial de identificar nuevos agentes causantes de enfermedades.

En relación al control sanitario, la PCR tiene muchos usos en la ciencia de los animales de laboratorio y se observa que en algunas situaciones, las pruebas basadas en PCR han reemplazado a otros métodos, mientras que en otros casos, el uso de PCR junto con otros métodos mejora la capacidad de controlar agentes infecciosos en colonias de animales de investigación y su entorno. La alta especificidad de la PCR es ventajosa porque puede usarse para diferenciar cepas patógenas y no patógenas, estrechamente relacionadas de un agente infeccioso. Sin embargo, pequeños cambios en los sitios de los cebadores de nuevas cepas de un agente pueden dar lugar a falsos negativos. La segunda ventaja de la PCR es su sensibilidad (la capacidad de detectar sólo unos pocos agentes infecciosos); sin embargo, esta alta sensibilidad puede producir falsos positivos si los reactivos de extracción de ADN o elementos utilizados durante la PCR, se contaminan con niveles bajos de ácidos nucleicos extraños. Los diagnósticos moleculares son rápidos y, cuando se utilizan ante un brote, es posible detectar rápidamente qué animales están eliminando el agente y representan un riesgo de transmisión a otros animales en la colonia. La PCR se puede utilizar en una amplia gama de especies, tipos de tejidos, heces y muestras ambientales. Una faceta importante del uso de la PCR es saber en qué parte del animal es más probable encontrar el agente infeccioso y recolectar muestras sólo durante la infección activa. Por el contrario, las pruebas de PCR de muestras ambientales revelan infecciones tanto actuales como pasadas, ya que detecta todos los agentes depositados en el sitio de muestreo desde la última vez que se desinfectó el sitio. La PCR detecta una amplia gama de agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos y parásitos) y puede usarse para detectar agentes que no pueden cultivarse o que se transmiten de forma deficiente a los centinelas, como son los agentes respiratorios. La mínima invasividad del muestreo y la reducción del número de animales necesarios y de los procedimientos de muestreo son coherentes con los principios éticos de las 3R (Fontaine *et al.*, 2015; Montonye *et al.*, 2018; Thoene-Reineke *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2018; Ooi *et al.*, 2014; Jovel *et al.*, 2016; Hansen *et al.*, 2014; Bidot *et al.*, 2018; Costa y Weese, 2019).

23. Muestras para control sanitario

A continuación se detallan los procedimientos técnicos para la obtención de muestras en función de que se trate de tejidos, heces, células o fluidos, como también los tiempos a considerar para un correcto mantenimiento de la muestra. La calidad de las muestras depende en gran medida de la rapidez y de la forma de obtención, así como del procesamiento y del tipo de transporte hasta llegar al banco de muestras. Además, debido a la enorme variabilidad

biológica, algunos tipos de muestras (tejidos, tumores, heces, etc) pueden necesitar un tratamiento individualizado. Estas variables son especialmente importantes cuando se pretende la extracción y el posterior uso del ARN. Por ello, es recomendable un inmediato traslado de las muestras, en especial las obtenidas por procedimientos quirúrgicos, punciones y biopsias, desde el lugar de obtención hasta el servicio en el que se van a realizar los estudios diagnósticos.

Los tiempos desde la extracción a la conservación deben establecerse con un máximo de tiempo desde la extracción quirúrgica hasta la congelación a partir del cual el material se rechazará. Este tiempo puede variar con el tipo de tejido y el objetivo para el cual se ha obtenido (extracción de ARN, ADN, proteínas, histología, etc.). Como regla general, toda muestra que haya tardado más de dos horas en este proceso y que haya estado a temperatura ambiente debe ser descartada. En el caso de extraer ARN, el estándar de calidad se sitúa en un tiempo menor de 30 minutos. Estos tiempos varían con el tipo y el tamaño del tejido (Hoggat *et al.*, 2016; Regan *et al.*, 2016; Compton *et al.*, 2017; Hsu *et al.*, 2016; Körner *et al.*, 2019). Los procedimientos técnicos para la preparación de cualquier tipo de muestras serían los siguientes:

- Se aconseja el uso de guantes estériles a lo largo de todo el proceso para evitar la contaminación de la muestra por manipulación y para minimizar el riesgo de infección causado por la misma, ya que no siempre se conocerá su capacidad infecto-contagiosa. Si se dispone de una cámara de flujo laminar, se debe llevar a cabo el procesamiento de la muestra en la misma para mantener la deseada esterilidad.
- Se debe utilizar una base limpia para el manejo de las muestras.
- Asimismo, en el caso de muestras sólidas, es recomendable tomar improntas y/o extensiones sobre portaobjetos de cada muestra, algunos de los cuales se pueden fijar en alcohol o acetona y almacenar para su uso en diferentes estudios, o bien teñir para un control rápido de la calidad del tejido/muestra seleccionada.
- Se recomienda el uso de cuchillas de bisturí desechables y nuevas, tijeras bien afiladas y limpias, así como pinzas en las mejores condiciones, preferentemente esterilizadas. En caso de que se utilice una misma pieza del instrumental para tejidos normales y aquellos con alteraciones, entonces, resulta aconsejable realizar primero la toma de tejido normal.
- La toma de los fragmentos tisulares se hará en las áreas donde no se sospeche la existencia de fenómenos de necrosis o isquemia que redunden en una pobre preservación.

24. Técnicas moleculares en el procesamiento de muestras (ADN y ARN)

Para estudios moleculares en el diagnóstico de enfermedades de los animales de laboratorio, se puede utilizar tanto el ADN como el ARN, pero hay que saber en cada momento cuál de estas moléculas es la necesaria para una investigación determinada. Actualmente, en la mayoría de los controles se parte de la PCR o de la reacción en cadena de la polimerasa, capaz de amplificar el ADN de una sola célula. Esta extraordinaria sensibilidad introduce un riesgo de contaminación por otra muestra de otra procedencia, por lo que es necesario de forma general una esterilidad y un cuidado riguroso en la manipulación de las mismas.

Para la preparación y extracción del ADN se debe considerar que existe una gran variedad de fuentes a partir de las cuales se puede obtener el mismo, por lo cual se han desarrollado protocolos muy diversos que se pueden llevar a cabo mediante sistemas automáticos o manuales. Las técnicas de extracción de ácidos nucleicos son relativamente sencillas y, básicamente, las mismas para todo tipo de células. En todos los casos, el objetivo es obtener la máxima cantidad de ADN y de óptima calidad y pureza.

25. Protocolo para el tratamiento de las muestras en la técnica de PCR para la extracción de ADN y ARN

- En primer lugar, empieza por romper o lisar las células, ya sea por métodos mecánicos o químicos.
- Posteriormente, se incuban las células con una proteinasa para extraer las proteínas del ADN.
- A continuación, se separan el ADN y el ARN del resto de los constituyentes de la célula, utilizando una mezcla con fenol, o sino una solución salina sobresaturada. La forma de extracción más habitual es mediante el sistema llamado de precipitación con fenol-cloroformo, donde los ácidos nucleicos se distinguen de las restantes sustancias bioquímicas que no se disuelven en fenol. Por este motivo, tras una centrifugación, el fenol se separa de la fase acuosa; las proteínas y las grasas permanecen en el fenol, y el ADN y el ARN en la fase acuosa. Los restos de fenol se eliminan con cloroformo, porque el fenol se disuelve en el cloroformo, mientras que los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa.
- Finalmente, una vez conseguida una solución relativamente pura de ácidos nucleicos, la adición de sal y etanol frío hasta elevar la concentración de etanol al 66% hará que el ADN se vuelva insoluble y precipite. El ADN genómico tiene tal peso molecular que ese precipitado es visible, semejante a un trozo de algodón (si hay suficiente material), y puede ser extraído

fácilmente de la solución con una punta curva de vidrio y disuelto de nuevo en una disolución de agua y ácido etilendiaminotetracético (EDTA), listo para su análisis o conservación. Los tejidos humanos o animales son una fuente excelente de ADN genómico por su alta densidad celular. Por ejemplo, un gramo de tejido hepático contiene un número de células tal que, para obtener un número equivalente de células nucleadas sanguíneas, se requeriría aproximadamente un litro de sangre. Sin embargo, presentan el inconveniente de la facilidad de degradación de los ácidos nucleicos, pero se soluciona procesándolos tan pronto como sea posible después de su extracción, o bien congelándolos de inmediato como ya se ha descrito. Para la extracción de ADN de los tejidos, se requieren unos procesos preliminares para romper el tejido en trozos finos a partir de los cuales las células se pueden lisar y el ADN queda liberado. Esto se puede realizar, bien disgregando finamente la muestra por homogeneización o en un mortero en el caso del tejido congelado. Si la muestra es fresca y no muy grande, se puede cultivar. Muchos tejidos conservados en Patología están generalmente embebidos en parafina. El ADN en estas muestras es estable durante muchos años, aunque está fragmentado. Para trabajar con estas muestras y antes de extraer el ADN, hay que realizar secciones con un microtomo y, a este material, se le ha de quitar la parafina mediante un tratamiento con xileno. El resto de la técnica es idéntica a la descrita anteriormente. Existen publicaciones con numerosos protocolos de variantes de la técnica general que intentan recuperar el ADN lo menos degradado posible. Por ejemplo, se ha descrito una técnica en la que no hace falta la desparafinación previa de la muestra y que da resultados bastantes buenos, simplemente modificando el protocolo de extracción mediante incubación con proteinasa K entre 24 horas y cinco días. La cantidad de ADN que se obtiene es óptima y de un tamaño que puede alcanzar las 5 kb. Existen en el mercado muy diversos kits de extracción comercializados que también facilitan el proceso. Generalmente, se obtiene con ellos una pureza muy buena de ADN, si bien menor cantidad que con las técnicas manuales, por lo que su uso depende del tipo de laboratorio y del tipo de material que se esté procesando. El ARN mensajero se encuentra sólo en aquellos tejidos en los que se expresa; en consecuencia, si se quiere estudiar cómo incide una mutación en la funcionalidad de una célula, se tendrá que acudir al órgano específico. Por esta razón, se debería saber extraer ARN de todo tipo de tejidos aunque muchos genes se expresen también en sangre periférica. Hay que tener en cuenta, no obstante, una particularidad muy especial del ARN: la facilidad de degradación enzimática de esta molécula por medio de las ribonucleasas. Las ribonucleasas

son enzimas muy estables y activas presentes en múltiples sistemas biológicos (incluidas bacterias y hongos ambientales) que, por lo general, no requieren cofactores. Por lo tanto, las precauciones que han de tomarse a la hora de extraer una muestra para obtener ARN deben ser extremas. Todo el material que entre en contacto con la muestra (tubos, frascos, jeringas, agua, soluciones, etc.) ha de estar libre de RNAsas y completamente esterilizado. Como precaución adicional es bueno, además, que los materiales y las soluciones hayan sido tratadas con los inhibidores de las RNAsas, como el dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,1%. Con respecto a la sangre, primero se ha de anticoagular para realizar una buena obtención del ARNm, lo que hasta hace poco se lograba, igual que para el ADN, simplemente con EDTA. Recientemente, han salido al mercado diversos tubos especiales de varias casas comerciales, para la toma de muestras, que combinan el anticoagulante con reactivos que mantienen la estabilidad del ADN y que, además, se encuentran libres de RNAsas. En cuanto a los tejidos sólidos, se debe hacer la extracción del ARN de inmediato o congelar dichos tejidos antes de la extracción. En este último caso y para obtener el ARN, el método de congelación de elección es la inmersión directa en nitrógeno líquido de la biopsia de tejido o colocar en freezer a -80°C . Como en el caso del ADN, si el procesamiento es inmediato, el tejido se coloca en tubos con suero fisiológico, pero además se añaden inhibidores de las RNAsas. En la preparación del ARN total el aislamiento y el almacenamiento del ARN son herramientas de suma importancia dentro de la investigación en Biología Molecular. Debido a la facilidad de degradación del ADN es indispensable que, en el proceso de extracción y en cualquier tipo de muestra o tejido, se tomen todas las precauciones necesarias en el laboratorio valorando las posibles fuentes de contaminación con RNAsas y actuando en consecuencia para evitarlas:

- Las superficies de trabajo: representan una fuente de contaminación al estar expuestas al ambiente (bacterias, hongos y células humanas) y, por ello, es necesario tratar todas las superficies con soluciones inhibidoras de la RNasa. En general, suele servir la limpieza con etanol al 70% o aplicar algún producto comercial. Esta limpieza se ha de hacer en todas aquellas superficies de contacto, tales como la cabina de flujo, los materiales a usar como ser las pipetas, la centrifuga, etc. Para una mayor esterilización de la superficie de trabajo, antes y después de la manipulación, se debe dejar actuar además una luz UV durante más de tres horas.
- La contaminación corporal: puede suceder tanto por los fluidos (saliva o sudor) como por la piel, ya que contienen una elevada concentración de RNAsas, por lo que es necesaria la

utilización de guantes estériles durante cualquier manipulación del ARN. Asimismo, deberían cambiarse frecuentemente a lo largo del proceso y siempre que se entre en contacto con cualquier otra superficie.

- El material con el que se realiza la extracción (eppendorff y tips): son también una fuente de RNAsas que se debe evitar, para lo cual se debe utilizar en todo momento materiales libres de nucleasas, puesto que no es suficiente el autoclave en estos casos por tratarse de enzimas termorresistentes que se mantienen estables a temperaturas superiores de 100 °C.
 - Las soluciones *Buffer* y agua utilizados deben estar libres de nucleasas. Además de la posible contaminación por RNAsas, es indispensable evitar la contaminación por ADN, ya que los extractos de ácidos nucleicos contienen también nucleasas y ribonucleasas en altas concentraciones. Igualmente, al evitar el contacto con el ADN se evitan falsos positivos en la extracción de ARN. Para ello, es necesario tomar también las siguientes medidas:
 - Separar, en la medida de lo posible, la zona de trabajo del ADN de la del ARN.
 - Utilizar un juego de pipetas automáticas exclusivas para la manipulación del ARN.
 - Usar tips o puntas estériles con filtro para evitar la contaminación del extremo de la pipeta.
 - Incubar con DNasa durante la extracción del ARN para eliminar los posibles restos de ADN.
- Los ácidos nucleicos, que son estables en la célula intacta, llegan a ser muy vulnerables a la digestión por las nucleasas endógenas.

Siguiendo todas estas precauciones, las técnicas de extracción de ARN, en general, consisten en un primer paso para obtener células lo más limpias posibles que, posteriormente, se lisanán para obtener el ARN. Estas células una vez homogeneizadas, se pueden congelar a -80 °C sin que la diferencia afecte significativamente a la extracción del ARN. Es aconsejable el proceso de la congelación en alícuotas, dada la inestabilidad del ARN, para asegurar tener muestras de respaldo. A partir de ahí, hoy en día se aconseja aislar el ARN con algún kit comercial a tal efecto que permita asegurar las extremas condiciones de seguridad del protocolo de trabajo descrito. Existen diversos kits en el mercado, todos los cuales básicamente comprenden los mismos pasos esenciales:

- En la lisis eficaz de las células y desnaturalización de los complejos de nucleoproteínas presentes en los extractos celulares se utiliza para ello una combinación de detergente (SDS) con tiocianato de guanidina (TCG), que inactiva las RNAsas y permite así que el ARN quede en solución y aislado de las proteínas.

- Para la inactivación de la actividad de las ribonucleasas presentes en la célula se lleva a cabo con la combinación de TCG y beta-mercaptoetanol.
- Para la eliminación de las proteínas se realiza gracias a la precipitación de las proteínas celulares a altas concentraciones de TCG mientras el ARN permanece en solución. Acto seguido, una centrifugación limpia el lisado celular de proteínas y restos, logrando que el ARN precipite selectivamente.
- Para la eliminación del ADN contaminante de las células se suele incubar con la enzima DNAsa I libre de RNAsas.
- Para la dilución del ARN se disuelve en agua libre de RNAsas.

En el caso de tejidos, la extracción de ARN es algunas veces más difícil, ya que la RNAsa endógena es activa mientras la muestra está siendo procesada. Dos tejidos, en particular, contienen una elevada actividad catalítica de RNAsa: el páncreas y el bazo; mientras que el hígado y el intestino presentan una menor actividad de dicha enzima. De cualquier modo, como se ha expuesto anteriormente, se recomienda usar tejidos tan frescos como sea posible, cortados en trozos pequeños (menos de un gramo cada uno), y congelarlos rápidamente en nitrógeno líquido o a -80°C hasta que se vaya a comenzar la extracción.

Las mejores condiciones de conservación de las muestras de ADN son conservar congeladas por debajo de 20 °C. Teóricamente, la mejor opción es a -80 °C, pero existen laboratorios que prefieren conservarlas a -20 °C y que manifiestan que nunca han tenido problemas de degradación. En el caso del ARN, el almacenamiento es un paso crítico para la integridad del ARN extraído, puesto que pequeñas cantidades de RNAsas pueden deteriorar el ARN guardado si no se mantiene a temperaturas de refrigeración extremas de -70 a -80 °C que inhiban la actividad enzimática. Independientemente de la técnica usada, las muestras de ARN se pueden conservar más de un año congeladas en agua que contenga un inhibidor de RNAsas, como el isotiocianato de guanidina, entre otros. Si el destino es la realización de RT-PCR, una buena alternativa es congelar la muestra después de su retrotranscripción a ADNc, molécula que es mucho más estable que el ARN (Buchheister *et al.*, 2019; Compton & Macy, 2015; Jensen *et al.*, 2015; Macy *et al.*, 2009; Zorn *et al.*, 2016).

26. Consideraciones claves del monitoreo de salud de rutina

En general, dos factores afectan el éxito general del diagnóstico (implica la idoneidad del método elegido): la precisión de la prueba y el tamaño de la muestra. La precisión de una

prueba diagnóstica se puede describir por su sensibilidad y especificidad (Figura 4), siendo la primera ciertamente más importante para la probabilidad de encontrar simplemente un determinado agente infeccioso y la segunda definiendo la relevancia diagnóstica de los resultados. Cuanto mayor sea la sensibilidad del diagnóstico, menor será la cantidad de resultados falsos negativos, manteniendo al mínimo el número de casos positivos erróneos en un diagnóstico. La especificidad diagnóstica será mayor cuanto menor sea la cantidad de falsos positivos, manteniendo al mínimo el número de casos negativos erróneos en el diagnóstico. Ambos parámetros son cruciales para la interpretación de los resultados, ya que definen el valor predictivo positivo y negativo de un procedimiento de prueba. El tamaño de la muestra determina el número requerido de animales, que deben analizarse para encontrar de manera confiable un patógeno dentro de una colonia, y puede calcularse estadísticamente. La ecuación subyacente (como se muestra en la Figura 4 consta del intervalo de confianza deseado (que expresa el mayor riesgo de un resultado falso negativo), la sensibilidad de la prueba, la prevalencia esperada del patógeno monitoreado, así como el tamaño (número de animales) de la colonia Mailhoit *et al.*, 2020; Macy *et al.*, 2009; Zorn *et al.*, 2016).

Dos factores afectan el éxito general del diagnóstico que implica la idoneidad del método elegido:

- ❑ La precisión de la técnica o prueba elegida ➡ sensibilidad (VP) y especificidad (VN)
- ❑ El tamaño de la muestra ➡ intervalo de confianza deseado (95%)

Precisión de la prueba	Muestras/Animales		
	Infectados	No Infectados	
	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)	Valor predictivo positivo =VP/(VP+FP)
	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)	Valor predictivo negativo =VN/(VN+FP)
	Sensibilidad =VP/(VP+FN)	Especificidad =VN/(VN+FP)	
Determinación del tamaño de la muestra	Variables		Tamaño de la muestra =LOG(C)/LOG[1-P*S]
	Nivel de Confianza deseado (C)	Prevalencia esperada (P)	

Figura 4: Cuadros de sensibilidad, especificidad e intervalo de confianza.

Es importante tener en cuenta que esta ecuación solo es válida en los casos en que los agentes infecciosos pueden infectar aleatoriamente a todos los animales dentro de una unidad de cría, lo que es bastante improbable en las condiciones modernas de alojamiento en cajas/jaulas con ventilación individual (IVC). Por lo tanto, las formas de cría, que mantienen a los animales dentro de contenciones a nivel de caja/jaula, requieren alternativas a la elección aleatoria de animales de la colonia, lo que puede realizarse mediante el uso de los llamados animales centinela. Los centinelas están expuestos intencionalmente al material infeccioso, con el objetivo de causar una infección con (todos) los patógenos presentes en una colonia. El control sanitario de esos centinelas puede entonces revelar de manera representativa el estado de salud de la colonia. Existen diferentes tipos de sistemas centinela, que difieren en el tipo de exposición al patógeno. El método más común es exponer a los centinelas al lecho sucio de los

animales de la colonia, lo que se describió como un sistema de control adecuado para los agentes infecciosos que se diseminan en las heces, la orina o fómites de los animales. Para aumentar la carga de patógenos, se puede evitar la “dilución” involuntaria de agentes infecciosos alojando a los animales centinela directamente en las jaulas usadas de la colonia (centinelas convivientes), donde también entran en contacto con material de anidación, comida, picos y botellas de agua. Aunque este enfoque requiere un período de tiempo más largo para monitorear sistemas completos de estantes IVC, la tasa de éxito del diagnóstico probablemente será mayor, ya que se demostró que los agentes críticos como *Rodentibacter* spp. fueron detectables usando este método. Sin embargo, independientemente de la variante utilizada, los centinelas de lecho sucio no son adecuados para la detección confiable de ectoparásitos (p. ej., ácaros de la piel) o patógenos, que se transmiten únicamente a través de aerosoles (p. ej., SeV). En esos casos, son obligatorios otros tipos de centinelas (centinelas convivientes o también llamados de contacto directo o sino centinelas de polvo de aire de extracción), pruebas directas de animales de colonia o enfoques de pruebas ambientales (Mahabir *et al.*, 2018; Mailhoit *et al.*, 2020).

27. Avances recientes en el monitoreo estándar de la salud

En las últimas décadas, el uso de la PCR y, en el caso de los virus de ARN, las técnicas de transcripción inversa (RT) PCR se han validado ampliamente como una alternativa valiosa a los métodos tradicionales de detección de patógenos por cultivo bacteriológico, parasitológicos y serológicos. Dado que las pruebas de PCR se basan en la detección molecular de secuencias genéticas específicas de los agentes infecciosos, este método se puede utilizar para detectar incluso cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos en varios tipos de muestras, lo que no solo mejora la sensibilidad diagnóstica sino que también facilita el uso de material de muestra ambiental como alternativa a las pruebas directas con animales. Dado que los animales infectados eliminan los agentes infecciosos a través de múltiples vías (heces, orina, saliva, piel/pelo, etc) en el entorno de su caja/jaula, este material se puede analizar en lugar de analizar muestras obtenidas directamente de los animales. Dependiendo de los patógenos respectivos, se pueden usar diferentes tipos de muestras, ya sea a nivel de jaula individual (lecho y/o material de anidación, heces, hisopos de caja/jaula o material de filtro de las tapas de caja/jaula) o también muestras a nivel de los estantes. Una solución alternativa, especialmente en términos de detección de cohortes de animales más grandes, es el análisis

del material de polvo del aire de salida o extracción (EAD), que también se puede muestrear al nivel de la caja/jaula, pero también es posible para un sistema completo de estantes IVC, dependiendo de la ubicación del procedimiento de filtración de aire. En caso de filtración de aire, las muestras se pueden obtener limpiando directamente la cámara de salida o analizando el material del prefiltro de la corriente de aire de extracción. Para el último método, hay disponibles diferentes sistemas comerciales que son igualmente eficientes para los métodos de detección de patógenos basados en PCR. Sin embargo, también hay informes de implementación exitosa de técnicas alternativas que utilizan material de gasa, colocado manualmente en los prefiltros o en las tapas de las cajas/jaulas o el análisis directo del material de la parte superior del filtro. Cada vez hay más publicaciones que describen que el análisis de material de muestra ambiental, y aquí especialmente el uso de EAD, es superior en comparación con los sistemas centinela tradicionales y cada vez más instalaciones informan que han reemplazado por completo el uso de animales centinela por implementación de pruebas EAD. Este cambio de paradigma está particularmente en línea con las 3R, ya que la mayoría de los programas de control sanitario clásicos implican sacrificar ratones centinela (según los tipos de muestra), mientras que el muestreo ambiental puede conducir a una reducción de los animales utilizados para los programas de control de salud o incluso reemplazarlos por completo. Además, existe evidencia común de que la detección basada en PCR de material de muestra ambiental puede aumentar significativamente el éxito diagnóstico del procedimiento de control sanitario, lo que puede reducir aún más la cantidad de animales necesarios para las experiencias, ya que esto mejora significativamente su estandarización sanitaria. Finalmente, las técnicas de muestreo ambiental también pueden refinar la experimentación con animales en términos de una mejora general de la salud de la colonia debido a la prevención de enfermedades infecciosas. Hasta ahora, los enfoques de monitoreo basados en EAD demostraron ser adecuados para una amplia variedad de agentes infecciosos, como MNV, MHV, Astrovirus murino, Virus Elevador de la Lactato Deshidrogenasa (LDEV), *Rodentibacter* sp., *Helicobacter* sp., *Mycoplasma* sp., *Pneumocistis* sp., ácaros de la piel, oxiuros y protozoos entéricos. Sin embargo, las infecciones con parvovirus murinos y *Klebsiella oxytoca* no han podido ser confirmadas por este método hasta el momento, y en el caso de *Staphylococcus aureus* existen resultados contrastantes. Pero podría complementarse con muestras de heces para la detección de esos agentes. De todas maneras, se necesitan estudios futuros para cerrar esta brecha de conocimiento y

validar la idoneidad de las pruebas basadas en EAD para todos los patógenos relevantes para los roedores de laboratorio, especialmente para aquellos con concentraciones de diseminación más bajas, como los parvovirus. La principal ventaja de las pruebas basadas en PCR (sensibilidad mejorada del método y una marcada reducción de resultados falsos negativos) también puede ser uno de sus inconvenientes, ya que la contaminación de la muestra puede ocurrir fácilmente. Los resultados falsos positivos pueden tener efectos dramáticos en términos de consecuencias debido a la toma de decisiones sanitarias (por ejemplo, la eliminación de toda una colonia), por lo que un único resultado positivo de PCR siempre debe conducir a la confirmación posterior de una infección. Esto es especialmente importante, ya que la detección molecular de ácidos nucleicos de patógenos no implica automáticamente que la colonia esté realmente infectada, por la razón de que este método no puede distinguir entre organismos vivos y muertos y aún pueden ocurrir resultados positivos después de la detección de ADN residual. /ARN presente en el material de muestra. Los ácidos nucleicos residuales aún pueden estar presentes después de los procedimientos de descontaminación comunes, como la esterilización en autoclave o la irradiación, por lo que los procedimientos de lavado de las jaulas y los sistemas completos de estantes IVC desempeñarán un papel esencial para evitar la identificación errónea concurrente. En general, para superar esto, los resultados positivos siempre deben confirmarse utilizando métodos de detección tradicionales, por ejemplo, serología, si es posible, para asegurarse de que la colonia esté realmente infectada. Además del riesgo de resultados falsos positivos, también pueden ocurrir resultados falsos negativos, especialmente cuando los cebadores utilizados para la amplificación génica no son adecuados, por no ser genéricos, para detectar todos los resultados como ser subcepas de un agente. Por lo tanto, un ensayo de PCR solo puede ser tan bueno como su diseño molecular, que depende principalmente de la precisión y actualidad de las bases de datos subyacentes. En particular, los patógenos que evolucionan rápidamente obtienen con frecuencia mutaciones puntuales dentro de sus genomas, lo que puede conducir a la falla de la unión del cebador y, en adelante, a resultados falsos negativos. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta la deriva genética de los agentes y los ensayos utilizados deben adaptarse permanentemente a la investigación actual. Además, la PCR solo detecta secuencias genéticas definidas, mientras que el uso de cultivos o métodos microscópicos puede exponer la totalidad de los agentes (cultivables) presentes en el material de muestra y revelar cambios dinámicos dentro de una colonia. Esto es de gran valor ya que podría

indicar una fuga dentro de una barrera sanitaria, lo que requiere el inicio inmediato de medidas preventivas. El presupuesto también puede desempeñar un papel, ya que los métodos de detección molecular pueden ser costosos, especialmente cuando el análisis de muestras lo realizan laboratorios comerciales. Sin embargo, hay informes de que las pruebas basadas en PCR del material de EAD son en realidad menos costosas que el enfoque centinela tradicional. En conjunto, el uso de material de prueba de PCR de muestra ambiental es beneficioso en los conceptos modernos de control de salud y debe usarse como una herramienta valiosa, que complementa los métodos de diagnóstico básicos, particularmente en términos de bienestar animal (Buchheister *et al.*, 2019; Compton & Macy, 2015; Jensen *et al.*, 2015; Macy *et al.*, 2009; Zorn *et al.*, 2016).

28. Cuando la PCR es siempre la respuesta, entonces quizás las preguntas sean equivocadas

Algunas empresas han optado cada vez más por ofrecer servicios completos de detección basados únicamente en un panel de pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), realizadas principalmente en heces. Aunque esto parece ofrecer una oportunidad fantástica para examinar una unidad completa con solo enviar algunas muestras fecales combinadas y posiblemente algunos hisopos de piel para buscar ácaros, aunque es de preocuparse que esta metodología esté dando a algunas instalaciones una falsa sensación de seguridad de que están limpias, cuando, en realidad, los patógenos están presentes pero se pasaron por alto, y no se controlaron varios de los mismos.

El uso de PCR para detectar múltiples virus y bacterias se realizó por primera vez de forma regular para detectar contaminación en líneas celulares y tejidos trasplantables. Esto se consideró el reemplazo perfecto para las pruebas de producción de anticuerpos de ratón (MAP) y de producción de anticuerpos de rata (RAP), en las que se inyectaban células en un ratón o rata para infectar al animal con cualquier patógeno murino presente en las células. Luego se dejó al animal durante algunas semanas para que se seroconvirtiera a cualquier infección que se hubiera transmitido y luego se le realizaron pruebas serológicas para buscar anticuerpos. La PCR tiene dos ventajas importantes sobre los métodos tradicionales MAP y RAP. En primer lugar, no se utilizan animales y, en segundo lugar, el tiempo de respuesta se reduce de semanas a días. Este sigue siendo un uso perfecto para la tecnología de PCR: probar una alícuota de lo que debería ser una muestra homogénea, de modo que cualquier muestra sea representativa de todo el vial de células. Bolitas fecales: individuales, agrupadas, quizás

ninguna.

La principal diferencia entre esto y la prueba de pellets fecales es que un solo pellet fecal de un roedor puede o no ser representativo del ratón o rata que lo produjo. Puede contener o no material genómico de cualquier patógeno con el que esté infectado el animal. Las posibilidades de encontrar virus o bacterias en las heces dependen de a qué órgano o tejido en particular se dirige el organismo. Es mucho más probable que un agente que afecta al intestino se excrete en las heces que un agente que reside en los pulmones. Algunos agentes se eliminan en las heces sólo durante un breve periodo de tiempo después de la infección y otros se eliminan de forma intermitente. Es posible que otros no se excreten de forma fiable en las heces.

Muchos protocolos de detección basados en PCR sugerirán que se pueda combinar un sedimento de cada una de las diez jaulas en una muestra que cubra a todos los animales en las diez jaulas. Estos protocolos también sugieren que se envíen hisopos orales y de piel para detectar toda la gama de patógenos incluidos en el panel. Esta muestra por jaula no sirve como muestra fiablemente representativa de esas diez jaulas de animales, especialmente si sólo se analizan las heces, como suele ser el caso. Hay otras razones para preocuparse de que las pruebas basadas en PCR no detecten todos los agentes infecciosos presentes. Cuando se examina un animal en busca de ectoparásitos, se recolectarán e identificarán todos los artrópodos observados. Las pruebas de PCR de ácaros disponibles actualmente detectarán muchos ácaros comunes, incluidos *Myobia* y *Mycoptes*, pero no *Ornithonyssus*. Un resultado de PCR negativo podría dar una falsa sensación de seguridad de que los animales estaban libres de ácaros, cuando no lo estaban. De manera similar, al utilizar una mezcla de agares específicos y no específicos. La bacteriología de rutina detectará cualquier bacteria posiblemente patógena, no sólo una lista estrictamente definida. Un ejemplo de esto es que muchas pruebas basadas en PCR buscan únicamente *Pasteurella pneumotropica*, mientras que la Federación de Asociaciones de Ciencia de Animales de Laboratorio (FELASA) sugiere reportar cualquier bacteria de la familia Pasteurellaceae (Ouellet *et al.*, 2011; Parel *et al.*, 2008; Parkinson *et al.*, 2011).

29. Lo positivo no siempre es positivo y viceversa

En el otro extremo del espectro, con la PCR siempre existe la posibilidad de que resultados intrascendentes se eleven al nivel de resultados positivos. Algunas empresas afirman ahora que sus pruebas de PCR pueden detectar tan solo un solo organismo. ¿Cuál es la importancia clínica de un solo organismo, especialmente cuando ese organismo podría estar muerto? En un

trabajo se comparaba el servicio y resultados de dos laboratorios para *Helicobacter* por PCR. Se encontraron positivos donde el otro laboratorio no los encontraba. Esto puede dejar perplejo al cliente, ya que ambos laboratorios fueron coherentes en sus conclusiones. El cliente realizó una prueba ciega en la que a ambos laboratorios se les envió muestras. Un laboratorio encontró la mitad fuertemente positiva y la otra mitad débilmente positiva; el otro laboratorio sólo detectó los positivos fuertes. Las muestras consistían en duplicados de muestras positivas, una de las cuales había sido esterilizada en autoclave y la otra no. ¿Este resultado significa que?

Un laboratorio poseía una metodología superior, ya que aún podía detectar ADN de *Helicobacter* en niveles mucho más bajos encontrados en las muestras esterilizadas en autoclave, o que nuestra prueba era inferior porque era demasiado sensible? ¿Realmente es importante detectar lo que podrían ser niveles clínicamente insignificantes de material genómico de organismos no viables, particularmente cuando esto podría conducir a búsquedas costosas de posibles infecciones inexistentes?

Mucha gente piensa que la PCR dará una respuesta "en blanco y negro", pero, como ocurre con muchas otras técnicas, los resultados aparecen en tonos de gris. La experiencia y los conocimientos de la persona que interpreta los resultados pueden marcar la diferencia.

La detección basada en PCR es una herramienta importante que se desarrolló por muy buenas razones. Pero no se debe confiar completamente en ningún método para obtener los resultados más precisos. El cribado tradicional también tiene limitaciones: puede que no siempre sea posible sacrificar animales para el cribado, y no todos los agentes se transfieren fácilmente a los animales centinela en programas de lechos sucios en jaulas con ventilación individual. La PCR puede brindar una instantánea del estado actual de un animal, por ejemplo, si está eliminando virus y, por lo tanto, representa una amenaza importante para una instalación. Es inmediato y puede detectar nuevas infecciones, pero puede pasar por alto infecciones más antiguas en las que la eliminación ha disminuido o se ha detenido. Las técnicas serológicas, por otro lado, dan una perspectiva histórica de a qué ha estado expuesto el animal durante todo el período de detección, pero no son apropiadas para detectar infecciones que tienen solo unos días. El uso de métodos de detección basados en PCR como complemento de la detección convencional, cuando sea necesario y apropiado, brindará a los resultados de la detección un nivel adicional de confianza y debe considerarse el estándar de oro (Nicklas *et al.*, 2012; Nicklas *et al.*, 2002; Buer & Balling, 2003).

30. Cómo garantizar la validez

En general, los ensayos en animales deben ser reproducibles, replicables y registrables para garantizar el valor traslacional de la investigación respectiva. Dado que el estado sanitario de los animales de laboratorio puede mostrar un factor de confusión importante que afecta los resultados del estudio, es necesario controlarlo. Si bien los programas de control sanitario de rutina, según lo recomendado por FELASA, incluyen la detección de patógenos típicos, existe evidencia clara de que otros agentes, así como la composición del microbioma o el historial microbiano de un animal, también pueden influir en distintos fenotipos, según el modelo animal. El conocimiento sobre los impactos potenciales es esencial para garantizar la validez de los datos de la investigación; sin embargo, los agentes causales a menudo no forman parte del programa de control de salud de rutina de las instalaciones. Por lo tanto, el control de estos agentes o del microbioma de los grupos experimentales actualmente debe ser solicitado explícitamente o realizado por los investigadores responsables (Nicklas *et al.*, 2012; Buer & Balling, 2003; Strech & Dirnagl, 2018).

31. Impacto microbiano en los fenotipos modelo y la validez de la investigación

Algunos agentes, que colonizan las superficies mucosas de los animales como comensales típicos, se consideran patobióticos (patobiontes) y exacerbaban ciertos fenotipos de enfermedades o incluso pueden inducir patologías de forma independiente en cepas susceptibles. En este contexto, se demostró que *Proteus mirabilis* induce daños en las neuronas dopaminérgicas y las funciones motoras en ratones, por lo que influye fuertemente en los modelos de la enfermedad de Parkinson. Del mismo modo, los animales con deficiencia de interleucina-10 libre de gérmenes desarrollaron inflamación intestinal después de la monocolonización con *Enterococcus faecalis*, un microorganismo intestinal común de animales y humanos. Las listas completas de otros ejemplos ya están informados y se debe acceder de manera crítica en la fase de planificación del proyecto para tener en cuenta el posible impacto y/o implementar nuevos procedimientos de detección de colonias de reproducción o grupos de animales para experiencias.

Con la creciente utilización de métodos de detección molecular de alto rendimiento, como el análisis de secuenciación del gen 16S rRNA u otras técnicas metagenómicas, la cantidad de estudios que demuestran la influencia de los comensales comunes en los modelos animales está aumentando rápidamente, debido a que algunos agentes tienen efectos perjudiciales

sobre los fenotipos de la enfermedad y, por lo tanto, aumentan la susceptibilidad a la enfermedad, mientras que otros podrían identificarse como factores protectores, mejorando ciertas funciones inmunitarias. Por ejemplo, *Akkermansia muciniphila* demostró confundir los datos de investigación inmunológica, ya que su abundancia controla la obesidad inducida por la dieta en ratones con deficiencia de leptina, así como la autoinmunidad de los islotes pancreáticos o de Langerhans en el modelo NOD que protege a los animales de los fenotipos diabéticos. Por otro lado, *Akkermansia muciniphila* exacerbó la inflamación intestinal inducida por *Salmonella typhimurium* en un modelo de ratón gnotobiótico, mientras que protegió a los ratones del desarrollo de inflamación intestinal inducida por DSS, revelando efectos contrastantes en los fenotipos de colitis. Del mismo modo, las bacterias filamentosas (SFB) podrían identificarse como factores protectores durante la infección por *Salmonella enteritidis* y también se demostró que mejoran la inflamación intestinal en ratones gnotobióticos deficientes en IL10 después de la coinfección con MNV y comunidades microbianas definidas, dependiendo de su capacidad de colonización intestinal. Sin embargo, también se pudo demostrar que SFB indujo inflamación intestinal en un modelo de colitis por transferencia de células T y provocó artritis autoinmune, estimulando una respuesta inmunitaria impulsada por Th17. *Faecalibacterium prausnitzii* y *Bacteroides* sp. también se consideraron relevantes, particularmente en modelos experimentales de colitis, donde principalmente protegen a los animales del desarrollo de inflamación intestinal. En un excelente artículo de revisión, publicado por Hansen *et al.*, se resumieron las especies bacterianas relevantes y su impacto potencial en los modelos animales, lo que sirvió como base valiosa para la consideración individual y la inclusión en los protocolos de control sanitario. Para comprender el impacto de los comensales en modelos animales e investigar su posible papel en el desarrollo de enfermedades, la gnotobiología es un instrumento poderoso. Después de la rederivación libre de gérmenes mediante histerectomía o transferencia de embriones en condiciones estériles, los animales pueden asociarse con microorganismos definidos para estudiar interacciones microbianas-huésped complejas durante experiencias con animales. Sin embargo, la influencia en los modelos animales no siempre está mediada exclusivamente por agentes individuales, sino que está influenciada por comunidades completas microbianas, que colonizan una parte diferente del animal. Especialmente, la mucosa gastrointestinal es un hábitat importante para una gran cantidad de bacterias, protozoos, hongos, arqueas y virus, que forman una comunidad compleja de más de 100

mil millones de microorganismos por gramo de contenido intestinal, también conocida como "microbiota intestinal" o "microbioma intestinal". Estos microorganismos son esenciales para las funciones fisiológicas del huésped, como la digestión de las fibras y el suministro de vitaminas, pero también pueden estar asociados con el desarrollo de ciertas enfermedades. Los avances recientes en el uso de técnicas moleculares como la secuenciación genética y los análisis cuantitativos a gran escala, que pueden denominarse análisis de microbiomas, revelan la sorprendente influencia de las composiciones de microbiotas individuales en modelos animales y correlacionan esos datos con ciertos fenotipos de enfermedades. Dado que los enfoques de secuenciación basados en rRNA 16S se restringen al análisis de comunidades bacterianas, las técnicas denominadas "*Next generation Sequencing*" hacen uso de la amplificación aleatoria de fragmentos de genes más cortos (*shotgun sequencing*) y el posterior alineamiento utilizando bases de datos bioinformáticas, lo que facilita la detección simultánea de todo tipo de agentes infecciosos, incluidos también los virus. La inmunología intestinal probablemente constituya la mayoría de las áreas de investigación afectadas por las composiciones del microbioma, ya que la inflamación intestinal puede ser desencadenada por varios factores microbiológicos. En este contexto, es bien sabido que los ratones deficientes en interleucina-10 difieren en la gravedad del desarrollo de la enterocolitis, dependiendo de las condiciones de alojamiento e incluso cuando se mantienen en diferentes instituciones y que la composición del microbioma intestinal es un determinante principal de la gravedad de la enfermedad. Este modelo también podría usarse para demostrar la influencia de diferentes comunidades bacterianas mínimas, a saber, *Altered Schaedler Flora* (ASF) y el llamado *Oligo Mouse Microbiota*12 (OMM12), en el nivel de inflamación intestinal después de la inducción de enterocolitis desencadenada por MNV, demostrando que la gravedad de la enfermedad depende del contexto microbiano. Otros modelos de enterocolitis murina también dependen de la composición de la microbiota, ya que el desarrollo de enterocolitis después de la transferencia de células T vírgenes a receptores inmunodeficientes también depende en gran medida del microbioma. Además, también hay varios informes sobre la influencia de la composición de la microbiota en los fenotipos en modelos de enterocolitis que utilizan inflamación intestinal inducida químicamente. Asimismo, la susceptibilidad a la infección por *Salmonella* está fuertemente influenciada por Enterobacteriaceae endógenas y la adherencia epitelial intestinal y la subsiguiente supervivencia colónica de *Citrobacter rodentium*, un modelo

común para el estudio de la infección con *Escherichia coli* enteropatógena y enterohemorrágica (EPEC y EHEC) en humanos], señalando la estricta dependencia de los enayos de infección en toda la microbiota. Además, las composiciones del microbioma también modulan la tumorigénesis del colon, los fenotipos diabéticos y también afectan los modelos de enfermedad hepática, como se informó en otros estudios. Además de las áreas de investigación en el sistema gastrointestinal, el microbioma de un animal también desempeña un papel importante en los procesos neurológicos, lo que influye en los comportamientos autistas o relacionados con la ansiedad y también en el resultado de la encefalomiелitis autoinmune inducida experimentalmente. Por lo tanto, el análisis del microbioma o los análisis selectivos de los factores de interferencia conocidos del estudio deben complementar cada enfoque de un control sanitario sólido (Thoene-Reineke *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2018; Ooi *et al.*, 2014; Jovel *et al.*, 2016; Hansen *et al.*, 2014; Bidot *et al.*, 2018; Costa y Weese, 2019).

32. La validez de los resultados del control de salud en la actualidad

El beneficio de los repetidos procedimientos de re-derivación higiénica y la estricta crianza de barrera facilitó la exclusión de patógenos, con el objetivo de mejorar la salud general de los animales y aumentar el nivel de estandarización higiénica. Sin embargo, la cría aislada también dio forma a una diversidad limitada del microbioma intestinal. Esto resultó en una variación significativa de las composiciones de la microbiota intestinal, no solo entre distintas instalaciones para animales, sino posiblemente también dentro de una instalación, cuando las cepas se alojan individualmente en diferentes barreras o biocompartimentos. Esto induce involuntariamente una falta de controles "complementarios" de estandarización microbiológica, que puede desempeñar un papel crucial en el creciente número de informes de datos de investigación que no se pueden replicar cuando los llevan adelante diferentes grupos de investigación, y que actualmente se conoce como la llamada "crisis de reproducibilidad". Una solución es mejorar el nivel de estandarización del microbioma, ya que mejorará la capacidad de los investigadores para reproducir los resultados de los estudios con animales y, por lo tanto, es una medida para garantizar la validez interna. Sin embargo, existe una creciente preocupación de que esos hallazgos solo sean ciertos para el tipo de estudio que se realiza en esa instancia, pero que potencialmente tiende a disminuir la generalización de los resultados. En este contexto, algunos estudios proponen introducir intencionalmente un cierto nivel de variación controlada, para probar la robustez

de un fenotipo frente a los variantes factores naturales y, por lo tanto, aumentar el valor de traducción para estudios clínicos adicionales. En una revisión publicada por Witjes *et al.* se informa los pros y los contras de la estandarización en el contexto de la variación del microbioma y concluyó que la estandarización debe aumentar cuando se realizan estudios fundamentales, especialmente aquellos que tienen como objetivo identificar los mecanismos de la enfermedad, para reducir los factores de confusión del estudio, mientras que más estudios traslacionales requieren pruebas de robustez utilizando ratones con diferentes microbiomas para garantizar la generalización y aumentar la validez externa de los resultados del estudio. Las posibles soluciones para inducir la variación son la diversificación intencional del microbioma utilizando medidas más bien extremas, como una nueva generación de roedores de laboratorio o el uso del microbioma como cofactor en estudios científicos, por ejemplo, en estudios que se realicen en varias instituciones al mismo momento (Nicklas *et al.*, 2012; Buer & Balling, 2003; Strech & Dirnagl, 2018; Ouellet *et al.*, 2011; Parel *et al.*, 2008; Parkinson *et al.*, 2011).

33. La estandarización del Microbioma

Dado que la reproducibilidad está estrechamente relacionada con la validez de la investigación, puede verse como una medida y valor de traducción de los resultados, lo que determina la relevancia de los hallazgos. Volver a mejorar el nivel de estandarización microbiológica aumenta la llamada "validez interna", que se puede lograr al tener en cuenta las interacciones recíprocas entre el microbioma y el huésped con el objetivo de minimizar la variación debida a factores de confusión microbiológicos. Sin embargo, los factores que influyen en el microbioma del animal son innumerables y van desde factores relacionados con el alojamiento, como alimentos, agua, sistemas de jaulas, material de cama y los tratamientos descontaminantes, como autoclave, irradiación o acidificación hasta factores relacionados con el huésped, como la genética, la edad y el sexo del animal. Además, también las infecciones con patógenos primarios o el estrés psicológico conducen a una enorme variación del microbioma fecal, lo que da forma a una variabilidad masiva del microbioma entre las diferentes instalaciones de proveedores de animales. Existen diferentes fuentes de variabilidad del microbioma intestinal y medidas para abordar esta variabilidad para mejorar la reproducibilidad de la investigación. Estos factores harán que sea prácticamente imposible ajustar exactamente el microbioma de varias colonias en las instalaciones aún con barreras. Sin embargo, dentro de

las barreras e incluso dentro de los estudios, se puede lograr la estandarización del microbioma. La estandarización del microbioma dentro de los estudios requiere hacer coincidir la composición de la microbiota entre los grupos de animales, lo que se vuelve particularmente crítico cuando los animales modificados genéticamente (p. ej., una cepa de ratón con un determinado gen *knockout*), que se crían en una instalación de animales, se comparan con los animales silvestres respectivos. Esta tarea se puede abordar mediante el uso de dos estrategias diferentes, que tienen como objetivo hacer coincidir los microbiomas de cohortes de animales separadas y, por lo tanto, facilitar el uso de grupos de control apropiados: (1) camada o (2) método de convivencia. Además, se están desarrollando colecciones bacterianas y enfoques gnotobióticos que permitirán a los científicos seleccionar microbiomas definidos para sus modelos en estudio. El enfoque de compañeros de camada es principalmente una estrategia de cría, basada en obtener todos los animales experimentales del mismo plantel reproductor. Dependiendo de los genotipos requeridos, las parejas reproductoras (obtenidas a través de un cruzamiento P1 aleatorio de las cepas homocigotas de tipo salvaje y mutantes) que tienen alelos heterocigotos para genes de tipo salvaje y mutados (wt/mut) producirán descendencia (= compañeros de camada) que tienen composiciones de microbiomas similares mientras expresan diferentes combinaciones de genes. Debido a la ley de Mendel, el 25 % de la camada expresará alelos homocigóticos para los genes de tipo silvestre y mutante (wt/wt y mut/mut) y podrá utilizarse posteriormente para los siguientes experimentos. La principal ventaja de este método es que los hermanos tendrán una microbiota similar desde el nacimiento, lo que garantiza una maduración análoga de las funciones inmunitarias en el desarrollo temprano de la vida. Además, también habrá automáticamente el nivel más alto posible de estandarización genética, ya que todos los animales tendrán un de homología de antecedentes genéticos. Sin embargo, desafortunadamente, el 50 % de las crías no se pueden usar para experimentos, ya que esos animales expresarán alelos heterocigotos (wt/mut), lo que conducirá a un número relativamente alto de exceso de reproducción. Además, este método requiere procedimientos constantes de determinación del genotipo de la colonia, lo que puede resultar costoso y consumir mucho tiempo, y hace que sea necesario realizar una biopsia (invasiva). Mientras que convivencia o convivencia de grupos experimentales también facilitará la disminución de la variación del microbioma. Por lo tanto, los animales deben permanecer juntos durante al menos cuatro semanas, ya que se demostró que

este período es más eficiente y da como resultado los niveles más altos de similitud de microbiomas. Este método es probablemente la forma más fácil de lograr la adaptación del microbioma; sin embargo, el momento de iniciar el procedimiento de alojamiento compartido sigue siendo crítico, ya que funciona mejor en animales muy jóvenes y finalmente no funcionará para machos (agresivos). En este caso, la cría cruzada sería una mejor estrategia, pero requiere el marcado de los animales en un momento muy temprano o, como el método de compañeros de camada, el genotipado constante después del destete. También hay que tener en cuenta que el alojamiento compartido conducirá a la transmisión asimétrica de microbiota entre dos poblaciones de ratones, ya que se demostró que la microbiota de ratones obtenida de *Jackson Laboratories* era más abundante que la microbiota de *Taconic*, después de terminar co-procedimiento de vivienda. En un estudio compararon los métodos de convivencia y compañeros de camada y demostraron que el uso de compañeros de camada F2 era la estrategia superior para la estandarización del microbioma (Fontaine *et al.*, 2015; Montonye *et al.*, 2018; Thoene-Reineke *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2018; Ooi *et al.*, 2014; Jovel *et al.*, 2016; Hansen *et al.*, 2014; Bidot *et al.*, 2018; Costa y Weese, 2019).

34. Gnotobiología

La gnotobiología o microbioma a elección sirve como un poderoso instrumento para estudiar las interacciones microbianas y huésped complejas durante experimentos con animales. Además, el uso de animales gnotobióticos asociados a una microbiota definida es sin duda la estrategia más estricta y definitiva para estandarizar el microbioma de un animal. Para este propósito, están disponibles varios consorcios microbianos definidos que se pueden usar para asociar colonias reproductoras de ratones y ratas dentro de sistemas de aislamiento. La llamada "flora de Schaedler" fue establecida por primera vez por Russel W. Schaedler, quien asoció animales libres de gérmenes con cinco cultivos bacterianos aislados de ratones convencionales. El contenido original fue modificado más tarde por RP Orcutt, lo que resultó en la "Flora de Schaedler alterada" (ASF, por sus siglas en inglés), que ahora se usa comúnmente y consta de ocho microorganismos. La "Microbiota intestinal humana simplificada" (SIHUMI) consta de siete especies bacterianas, según la importancia numérica y las capacidades fermentativas en el intestino humano. Sin embargo, esos consorcios mínimos no pueden compensar la complejidad de las comunidades microbianas naturales. En este contexto, Norin y Midvedt ya demostraron en 2010 que los ratones colonizados con ASF son

más similares a los animales libres de gérmenes que a los animales colonizados convencionalmente, lo que indica que los consorcios mínimos definidos pueden provocar reacciones artificiales y la pérdida de fenotipos de la enfermedad. Incluso pueden ocurrir los mismos problemas cuando se utilizan animales alojados en sistemas de barrera estrictos, ya que su microbioma también carece de su diversidad natural y se transformó en un estado bastante limitado, indicado por una diversidad alfa reducida (riqueza) de especies bacterianas consistentes. Por lo tanto, sería óptimo tener acceso a comunidades microbianas más complejas, pero definidas, para crear un "microbioma a elección o pedido" donde los científicos puedan elegir la composición del microbioma ideal, con perfiles de inclusión o exclusión individuales. Existen proyectos como el establecimiento de la " recolección de bacterias intestinales de ratón" que servirán como un recurso esencial, ofreciendo acceso a bacterias y comunidades microbiológicas definidas, que representa a 12 miembros de los principales filos bacterianos en el intestino murino y que brindan resistencia a la colonización contra *Salmonella typhimurium*. Este consorcio bacteriano está modificando actualmente para mejorar la complejidad o para seleccionar ciertas características de la comunidad que podría representar un sistema modular ideal para el futuro. En la diversificación intencional del microbioma que se mencionó anteriormente, la pérdida de fenotipos resistentes a enfermedades pueden ocurrir en animales que albergan un microbioma limitado o menos diverso, como suele ser el caso en la actualidad en colonias reproductoras con estado "SPF" o incluso "SOPF" (especificado oportunista y libre de patógenos). Esta situación artificial puede tener efectos dramáticos en las funciones inmunológicas, como Beura et al, demostró que los ratones de laboratorio "SPF" carecen de ciertas células T de memoria, lo que se parece más a los humanos recién nacidos que a los adultos. Luego, los autores hicieron uso de ratones silvestres y también de comercios de venta de mascotas, que tenían una experiencia microbiana más diversa, y pudieron probar que estos animales no solo expresaban un perfil de células T más similar al de los adultos humanos, sino que también eran capaces de inducir esas poblaciones de células en los ratones de laboratorio después de co-alojarlos con los animales salvajes. Asimismo, otros también demostraron que el sistema inmunitario celular de los ratones silvestres se encuentra en un estado más activo ya que la alta exposición a patógenos induce una activación de las células mieloides, lo que ayuda a mantener la homeostasis inmunitaria natural y también que los experimentos con ratones que viven en un entorno más natural con enriquecimiento del hábitat, y con el uso compartido de picos y botellas de agua de bebida con ratones de

comercios de venta de mascotas, pueden generar fenotipos inmunitarios dramáticamente diferentes. El análisis de la "microbiota de ratón silvestre" reveló que su composición muestra una variación interindividual relativamente alta, que puede explicarse principalmente por la ubicación geográfica, y que sufre una marcada variación estacional. Sin embargo, la mayoría de las bacterias permanecen relativamente estables al entrar en cautiverio. En general, se puede afirmar que el estado de salud de los roedores silvestres es más sólido y que los animales se benefician de la gran diversidad de microbiota, lo que mejora la aptitud del huésped y la resistencia. En un estudio donde utilizaron la técnica de transferencia de embriones con ratones capturados en la naturaleza como madres para transferir los genotipos deseados a la condición de microbioma "silvestre" deseada. En el estudio se consideró el estado patógeno de los animales silvestres capturados y fueron usados solo aquellos que estaban libres de patógenos conocidos. Por lo tanto, el grupo demostró que la microbiota de los animales salvajes fenocopiaba de manera excelente las respuestas inmunitarias humanas y que la reproducibilidad de los estudios preclínicos podía mejorarse utilizando un modelo compuesto por microbiota natural y ciertos patógenos. Graham ha publicado recientemente una excelente revisión sobre el efecto de la "naturalización de modelos de ratones", que va mucho más allá del microbioma, ya que incluye factores bióticos y abióticos. Aunque la diversificación intencional con estrategias bastante extremas, como el volver al estado silvestre o *re-wilding*, ofrece grandes oportunidades para la investigación inmunológica, también presenta grandes desafíos, especialmente con respecto a la presencia de patógenos potencialmente dañinos. Dado que existe un compromiso ético, que también se ve reforzado por la legislación europea de bienestar animal, para mantener a los animales sanos, el alojamiento en hábitats naturales debe combinarse con la garantía clásica de salud y calidad, como se describe anteriormente. Esto incluye estrategias clásicas de control de la salud, medidas de bioseguridad para excluir zoonosis y control de brotes de enfermedades, como también, tareas de bienestar y puntos finales humanitarios debido a enfermedades infecciosas. Como se estudian animales modificados genéticamente con un estado inmunitario poco claro, entonces se exige inspecciones sanitarias diarias de cada animal, así como alojamiento a prueba de ingreso y escape. Especialmente el último se vuelve muy relevante para los modelos de ingeniería genética. La liberación intencional de organismos modificados genéticamente está estrictamente regulada y estos animales deben separarse de las poblaciones silvestres locales. Por lo tanto, los estudios que utilicen esas técnicas de diversificación deben proporcionar

descripciones claras y completas de todas las medidas preventivas para abordar las preocupaciones pendientes con respecto a los aspectos del bienestar animal y los conceptos generales de genética y bioseguridad. Las diferencias en el microbioma se pueden usar para inducir variaciones intencionalmente al realizar estudios multiinstitucionales, que se han vuelto estándar en los estudios clínicos y están evolucionando también en la investigación preclínica, o al estudiar modelos en diferentes sistemas de barreras en un lugar de investigación. Si bien ambos enfoques son factibles con la infraestructura disponible, tienen sus propios costos: todavía se basan en fenotipos que son válidos en el mundo clásico "SPF" que aumentan considerablemente la complejidad del estudio, el número de animales para un estudio determinado y controlar los entornos experimentales, entonces es necesario establecer un control rutinario del microbioma y estandarizarlo. Los enfoques de barreras múltiples son mucho más fáciles de realizar dado que en una instalación hay diferentes sistemas de barreras con cepas de roedores idénticas (que requieren estandarización genética), pero es poco probable que este enfoque se realice de forma rutinaria, sino más bien para la validación, como se describe anteriormente. Además, el control del microbioma en diferentes sistemas de barreras supondría un nuevo paso en el diseño de una estrategia de vigilancia de la salud. Dado que los conceptos comunes del control de salud solo tienen como objetivo controlar una lista de patógenos definidos, obviamente existe una falta de conocimiento sobre la composición general de la microbiota de las colonias. Incluir el control o análisis del microbioma en los procedimientos de control de la salud de rutina podría ofrecer excelentes oportunidades para hacer frente a los próximos desafíos. Las técnicas moleculares, como la secuenciación del genoma, podrían ser herramientas poderosas para lograr tanto la detección de patógenos como el control de las composiciones de microbiomas dentro de sistemas de barrera complejos. Especialmente, los sistemas de cabinas o racks ventilados (IVC) podrían mejorar aún más con los métodos de secuenciación, ya que los filtros de polvo del aire de salida pueden servir como objetivos potenciales para la detección prospectiva y retrospectiva de comunidades de microbiota completas dentro de una colonia. Dado que casi todos los agentes infecciosos contienen ácidos nucleicos específicos, la secuenciación es un enfoque atractivo para la detección de patógenos. En un estudio de medicina veterinaria, la secuenciación metagenómica se usó con éxito para analizar la resistencia a los antimicrobianos en criadores de cerdos, usando muestras fecales del piso del corral. Los autores del estudio concluyeron que el mapeo de lectura metagenómico superó a las técnicas basadas en cultivo en términos

de predicción de la resistencia esperada a la tetraciclina. Los principales desafíos de este método son las necesidades de los llamados métodos de agotamiento del huésped, que deben usarse para disminuir la señal de fondo genético del huésped en los datos de secuenciación, para que no interfieran con el análisis de datos. También pueden surgir desafíos a resolver del problema que puede ser la potencial contaminación de la muestra, lo que complica la interpretación de los resultados. Independientemente de todos los conceptos y métodos de control de la salud utilizados para el seguimiento, la tarea más importante es, sin duda, la notificación adecuada de los resultados. Compartir información sobre el estado higiénico de un animal y, en el futuro, sobre su microbioma, es la base esencial para crear un entorno en el que la reproducibilidad sea al menos posible. Desafortunadamente, una gran cantidad de trabajos de investigación retiran esa información de las partes de materiales y métodos, a veces por falta de espacio, a veces por otras razones. Mientras tanto, a medida que la mayoría de las revistas se hicieron más conscientes de la necesidad de una filosofía de información estandarizada, se publicaron pautas para ayudar y promover la transferencia sistemática de información sobre los protocolos de estudio, incluido el estado higiénico de los animales.

El control sanitario de los roedores de laboratorio evolucionó durante el siglo pasado, a medida que la competencia creciente cambió el enfoque de los procedimientos de control. Al principio de la domesticación de roedores, los patógenos primarios que causaban enfermedades infecciosas más o menos graves eran la principal preocupación de los veterinarios e investigadores. Los extensos procesos de re-derivación eliminaron la mayoría de los patógenos de las colonias infectadas de forma natural, no solo mejorando la salud animal en general, sino también haciendo que el trabajo con animales sea seguro con respecto a las enfermedades zoonóticas. Las estrategias clásicas en forma de exámenes clínicos y procedimientos completos de necropsia son habilidades básicas para mantener saludables a los animales. Los métodos tradicionales de diagnóstico microbiológico, virológico y parasitológico respaldan esas habilidades básicas y ayudan a definir sistemáticamente la calidad higiénica de los animales. Las recomendaciones concretas para el control de salud de roedores de laboratorio publicadas por FELASA condujeron a la armonización del proceso y ayudaron a definir el estado sanitario de las colonias de reproducción y experimentales, mejorando la calidad general de los ensayos. Las recomendaciones sirven como una base sólida para una definición orientada al riesgo de detección de patógenos, que debe ajustarse individualmente al

incluir otros agentes que puedan ser relevantes para los respectivos proyectos de investigación. Aquí, las habilidades básicas de diagnóstico deben unirse con las tecnologías moleculares para complementar los programas de control sanitario tradicionales al incluir el análisis de material de muestra ambiental, como el EAD de los sistemas de racks IVC. Con un conocimiento cada vez mayor sobre la relevancia de las composiciones completas de microbiota para los datos de investigación biomédica, se debe respetar la influencia de los microbiomas individuales al estandarizar las composiciones de microbiomas dentro de los estudios de investigación y al incluir técnicas de secuenciación metagenómica en los programas modernos de control de salud. Dado que la cría aislada dentro de sistemas de barrera estrictos condujo al desarrollo de colonias muy limpias con una diversidad limitada de microbiota intestinal, los investigadores pueden tener que enfrentarse a la pérdida de ciertos fenotipos de enfermedades en modelos animales. La introducción de una variación controlada del microbioma utilizando diferentes sistemas de barreras o la diversificación microbiológica utilizando cohortes de animales silvestres puede mejorar el valor de traducción de los estudios de investigación biomédica. Sin embargo, quedan preocupaciones con respecto a las medidas genéticas y de bioseguridad cuando se trabaja con colonias alojadas en entornos más naturales. Además, el compromiso ético general de los veterinarios e investigadores en el cuidado de los animales les obliga a mantener las colonias sanas y libres de patógenos, especialmente cuando se trabaja con animales inmunocomprometidos. Un enfoque de control sanitario mejorado que utilice el método de secuenciación metagenómica, podría combinar la detección de patógenos con el análisis de microbiomas, aumentando el valor informativo de un método de prueba de una muestra.

En conclusión, existe evidencia acumulada de que “cuanto más limpio no siempre es mejor”, y que diferentes modelos requieren diferentes necesidades para las composiciones de microbiota. Dado que algunas investigaciones inmunológicas se beneficiarán de la presencia de ciertos agentes oportunistas que estimulan poblaciones especiales de células inmunitarias, entonces esos los factores de confusión conocidos deben excluirse para garantizar la validez del estudio. Se considera que los animales inmunodeficientes tienen que ser alojados dentro de estrictas barreras libres de oportunistas para garantizar su integridad sanitaria general. Esos aspectos ya deben considerarse en la etapa de planificación del proyecto y deben ser abordados explícitamente por los respectivos investigadores e instituciones de financiación. Sin embargo, es aún más importante mejorar la rutina general de notificación o información del

estado de salud de los animales, así como los posibles impactos de las composiciones de microbiomas individuales en los resultados del estudio. Por lo tanto, se supone que el control de salud debe incluirse como un elemento esencial en todas las recomendaciones relevantes, pues esto aumentará la conciencia de la comunidad científica de que modelar escenarios coincidentes para las necesidades de estudio individuales es un desafío y requiere estrategias complejas. Sin embargo, esta es una tarea necesaria para combinar medidas clásicas de calidad centradas en el bienestar y con la demanda de una creciente validez científica. Por lo tanto, los expertos en animales de laboratorio deben adquirir una competencia sobresaliente en los conceptos modernos de control de salud, continuando su progreso (Besselsen *et al.*, 2008; Voipio *et al.*, 2008; Fox *et al.*, 2006; Reh binder *et al.*, 2000; Nicklas *et al.*, 2002; Nevalainen *et al.*, 2000; Nicklas *et al.*, 2012; Buer & Balling, 2003; Strech & Dirnagl, 2018; Ouellet *et al.*, 2011; Parel *et al.*, 2008; Parkinson *et al.*, 2011).

35. Patógenos de los animales de laboratorio

Se describen a continuación los agentes patógenos más relevantes según los sistemas que afectan (Nicklas *et al.*, 2012; Buchheister *et al.*, 2019; Compton & Macy, 2015; Jensen *et al.*, 2015; Macy *et al.*, 2009; Besselsen *et al.*, 2008; Voipio *et al.*, 2008; Fox *et al.*, 2006; Reh binder *et al.*, 2000; Nicklas *et al.*, 2002; Nevalainen *et al.*, Martinez *et al.*, 2010; 2000; Keely *et al.*, 2012; Nicklas *et al.*, 2012; Buer & Balling, 2003).

35.1. Patógenos del Sistema Respiratorio

35.1.1. Virus de Sendai (SV)

El virus Sendai (SV) es uno de los más importantes patógenos de ratones y ratas. Los hámsters también pueden ser infectados, aunque su infección es asintomática. El SV es un virus ssRNA de la familia Paramyxoviridae, género Paramyxovirus, y de la especie parainfluenza 1 aunque múltiples cepas han sido descritas. SV es extremadamente contagioso; la transmisión es a través del contacto y la infección por aerosoles del tracto respiratorio. La infección natural de las ratas con SV es generalmente asintomática, con efectos menores sobre la reproducción y el crecimiento de las crías. Infecciones naturales en ratones se presentan como enzoóticas o infecciones epizoóticas. Las infecciones enzoóticas son aquellas endémicas de una colonia, donde el suministro constante de animales susceptibles mantiene la infección. Los ratones se infectan poco después del destete a medida que disminuyen los niveles de

anticuerpos maternos y muestran poca señales o signos. Dado que no hay estado portador, el cese de la reproducción eventualmente resulta en la eliminación de la infección, aunque los títulos de anticuerpos permanecen en animales previamente infectados. Las infecciones epizooticas ocurren con la primera introducción del virus a una colonia.

Los signos clínicos pueden incluir rechinar de los dientes, disnea prolongada, problemas en la gestación como crecimiento deficiente y muerte de ratones jóvenes. Mientras exista reproducción en la colonia, el patrón enzoótico se mantiene. El SV contiene activa la proteína HN (espículas de hemaglutinina y neuraminidasa) y la glicoproteína F, que produce fusión celular que permite la entrada y actividad hemolítica. La conversión a la forma activa de la glicoproteína F depende de las proteasas del huésped y es inhibida por el surfactante pulmonar. Existen diferencias considerables en la susceptibilidad a SV entre cepas de ratas y ratones. Entre las cepas de ratas, LEW, Brown y Noruega (BN) son más susceptibles que las cepas de ratas F344. Entre las cepas de ratón, 129 / J y DBA son las más susceptibles mientras que SJL / J y C57BL / 6J están entre las más resistentes. Debido a esto existen diferencias en la susceptibilidad y las lesiones patológicas varían en su severidad. La característica distintiva de la infección por SV es la hipertrofia transitoria, necrosis y la reparación del epitelio de las vías respiratorias a medida que el virus desciende por el tracto respiratorio. La reparación del epitelio de la vía aérea en epitelio genera hiperplasia, metaplasia escamosa y formación de células sincitiales. Al llegar a los pulmones produce neumonía intersticial focal que si va acompañado de infecciones por *Mycoplasma pulmonis* produce cambios inflamatorios e hiperplásicos que son más severos alrededor de los bronquiolos terminales, que afecta más vías aéreas y los pulmones aparecen enrojecidos focalmente. La replicación viral ocurre en el tracto respiratorio únicamente por 1 semana postinfección, por lo que las lesiones se resuelven rápidamente y eventualmente consiste en aparición de linfocitos peribronquiales y perivascuales. Las lesiones son más severas y variadas cuando se adicionan otros patógenos tales como *M. pulmonis*. Los ratones y ratas inmunodeficientes infectados con SV desarrollan una forma grave de neumonía, con depuración viral tardía (*clearance*). La inmunidad a SV es tanto celular como mediada por anticuerpos. Infección natural con SV podría interferir profundamente con una amplia variedad de trabajos de investigación que involucren ratones y ratas, ya que se ha demostrado que la SV afecta a roedores en muchas maneras. Los efectos reportados incluyen interferencia en principio en el desarrollo embrionario y crecimiento fetal; alteraciones de macrófagos, células asesinas

naturales (NK) y la función de las células T y B; citoquina y producción de quimioquinas; alteraciones en las poblaciones de mastocitos bronquiales; hipersensibilidad pulmonar y rechazo de isoinjertos; fisiología de las vías respiratorias; respuesta a tumores transplantables y aloinjertos pulmonares; respuesta a carcinógenos; tasas de apoptosis y cicatrización de heridas.

35.1.2. Virus de la P neumonía del ratón (PVM)

La especie huésped son ratón, rata, hámster y cobayo. Organotropismo por el tracto respiratorio.

Enfermedad clínica: asintomático en inmunocompetentes pero produce neumonía crónica y muerte en ratones inmunodeficientes. La patología se manifiesta como rinitis necrosante atenuada, bronquiolitis necrozante y neumonía. La morbilidad es de 20% en ratones y hasta 50% en ratas y hámsters y la mortalidad no se ha informado ninguna excepto en ratones inmunodeficientes. PVM produce una marcada morbilidad (encorvamiento y arrugamiento de la piel), pérdida de peso y mortalidad (solo en inmunodeficientes). Inflamación profunda y edema pulmonar en con la cepa altamente patógena PVM J3666. La infección por PVM en adultos jóvenes (de 8 a 12 semanas) hasta de edad (hasta 78 semanas) no produce cambios en la cinética de la replicación. Curiosamente, no hay datos publicados sobre la replicación de la PVM y la patogenia de la enfermedad en ratones neonatales. La interferencia en la investigación puede darse con un incremento en el desarrollo de diabetes en tratamientos o experiencias con estreptomycin, y pérdida de peso en las ratas. También neumonía en el epitelio bronquial de ratones. El PVM tiene la ventaja de experimentar una replicación robusta y provocar una enfermedad sintomática en ratones inmunodeficientes. Aunque el interés en este patógeno ha reaparecido recientemente, PVM fue descubierto originalmente en 1939 por los investigadores Horsfall y Hahn. Se aisló PVM a partir de tejido pulmonar de ratones. En la estructura genómica de PVM junto con RSV humano y bovino, se los clasifica como virus de la familia Paramyxoviridae, subfamilia Pneumovirinae, género Pneumovirus, que son virus de ARN monocatenario envueltos, de sentido negativo. Existen cepas patógenas de PVM siendo dos cepas patógenas principales caracterizadas pero no producen muerte (excepto en inmunodeprimidos). La cepa 15, que es altamente patógena en casi todas las líneas de ratones. La cepa PVM 15 provoca una respuesta inflamatoria en la cepa BALB / c, pero produce poca o ninguna enfermedad en la cepa C57BL / 6 que es menos susceptible a dosis

de inoculación similares. Una segunda cepa, la cepa PVM J3666, es altamente patógeno en casi todas las líneas de ratones. Las diferencias más notables están en las regiones seleccionadas de la G (proteína de unión) que pueden contribuir a su virulencia diferencial, y en toda la secuencia de la glicoproteína hidrófoba pequeña SH. La transmisión es vía aerosol y la exposición por contacto al tracto respiratorio. Las infecciones son de corta duración y generalmente sin signos clínicos en ratones y ratas eutímicos, y no hay estado portador. En contraste, los ratones atímicos nude (nu / nu) desarrollan neumonía crónica y pueden morir. Las lesiones patológicas no han sido reportadas en ratones o ratas infectados naturalmente. Infecciones intranasales experimentales en ratones han dado lugar a rinitis leve y neumonía intersticial. La susceptibilidad en ratones y ratas puede incrementarse por una variedad de factores estresantes locales y sistémicos, y la capacidad de respuesta inmune es dependiente del estrés. Los ratones atímicos infectados experimentalmente desarrollan una neumonía intersticial persistente mientras que las infecciones naturales que generan neumonía parecen ser de poca importancia en roedores inmunocompetentes. El agente antiviral, ribavirina, es muy eficaz para bloquear la replicación del PVM tanto en el cultivo de tejidos como en ratones. El modelo de PVM replica este escenario, ya que la ribavirina en concentraciones de $> 10 \mu\text{g} / \text{ml}$ es eficaz para bloquear la replicación del virus en cultivos de tejidos y en concentraciones de $75 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{día}$, al bloquear la replicación del virus en tejido pulmonar de ratón in vivo. Sin embargo, análogamente a las observaciones realizadas en estudios clínicos, la administración de dosis efectivas de ribavirina sola a ratones sintomáticos infectados con PVM tiene poco impacto en el resultado final de la enfermedad, cuando se mide en términos de morbilidad y mortalidad]. Junto con esta observación, encontramos que, aunque la ribavirina fue bastante eficaz para bloquear la replicación del virus, no tuvo impacto en la producción en curso de quimiocinas proinflamatorias y el reclutamiento asociado de granulocitos en el tejido pulmonar. Claramente, existe una cierta desconexión entre la replicación del virus y la respuesta inflamatoria resultante, ya que la inflamación no se controla necesariamente de manera efectiva en un momento dado reduciendo o eliminando el estímulo primario. La serología (MFIA, ELISA, IFA o HI) es el medio principal para analizar colonias de ratones para determinar la exposición a PVM. Se ha aplicado inmunohistoquímica para detectar antígenos virales en secciones de pulmón; sin embargo, un muestreo adecuado (consulte el Capítulo 4.4, "Gestión y seguimiento de la salud") es fundamental para establecer el diagnóstico debido a la naturaleza focal de la infección. También se ha informado de un ensayo de RT-PCR para detectar ARN viral en

tejidos del tracto respiratorio. Sin embargo, el uso de métodos directos requiere un buen momento porque el virus está presente sólo hasta unos 10 días en ratones inmunocompetentes. La transferencia de embriones o la derivación por cesárea seguida de mantenimiento de la barrera se pueden utilizar para criar ratones que están libres de PVM. Dado que la infección activa está presente en el ratón inmunocompetente individual durante un período breve, el aislamiento estricto de unos pocos ratones (preferiblemente seropositivos) con el cese temporal de la reproducción también podría tener éxito en la eliminación del virus. La infección por el virus en los ratones podría alterar la arquitectura pulmonar e interferir con los estudios inmunológicos. La infección natural de ratones atímicos produce la muerte y, por lo tanto, interferir los estudios con estos animales.

35.1.3. *Filobacterium rodentium* o CAR-Bacillus (Bacilo Asociado a las Ciliadas Respiratorias)

Este un bacilo es un patógeno de ratas salvajes y de laboratorio y, en menor medida, ratones y conejos. También se ha utilizado en infecciones experimentales de cobayo, cerdos y hámsters. El bacilo CAR es un agente gramnegativo como una varilla filamentosa de incierta clasificación. Por el análisis de las pequeñas subunidades de las secuencias de ARNr indican que el bacilo CAR de la rata puede estar estrechamente relacionado con *Flavobacterium ferrugineum* y *Flexibacter sancti*. Estudios recientes sugieren que el bacilo CAR de rata y conejo pueden ser cepas distintas y se sugiere que, el CAR de ratas en ratones, puede ser más virulento que las de origen de los conejos. La transmisión es probablemente a través de una exposición por contacto al sistema respiratorio. La información sugiere que el bacilo CAR suele ser un patógeno más importante que *M. pulmonis* en ratas, y que exacerba las lesiones de micoplasmosis respiratoria murina. Sin embargo, la infección primaria en ratas con CAR presenta signos clínicos similares a las de las vías respiratorias murinas graves por Micoplasmosis que incluye postura encorvada, letargo, pelaje áspero y exudado periocular de porfirina. Las lesiones de infección por el bacilo CAR son similares a las de *Mycoplasma*. La infección produce bronquiolectasias severas, abscesos pulmonares, y atelectasia de lóbulos pulmonares enteros. Estas lesiones se deben principalmente a la acumulación de pus en las vías respiratorias y se pueden observar grandes cantidades de bacilos CAR entre los cilios de las superficies epiteliales respiratorias y causan el borde ciliado de consistencia densa. Las

lesiones también se pueden encontrar en el epitelio de las superficies de las fosas nasales, laringe, tráquea y oído medio.

35.1.4. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es una bacteria gramnegativa que habita normalmente el tracto intestinal de ratas, ratones y muchos otros animales. La enfermedad en roedores inmunocompetentes son raras y *K. pneumoniae* por lo tanto se considera un patógeno oportunista. La prevalencia en colonias de roedores es alta y puede aumentar si se realiza un tratamiento con antibiótico que elimina otras bacterias. La transmisión es principalmente fecal-oral pero la transmisión de aerosoles es efectiva también. Los signos clínicos en ratones incluyen disnea, estornudos, linfadenopatía cervical, desorientación, postura encorvada y pelaje áspero y en ratas incluye además abscesos cervicales e inguinales, luego de una diseminación hematógena con formación de abscesos focales. Esto puede ocurrir en cualquier órgano y en el caso de los pulmones de ratones, resulta en una neumonía granulomatosa. Los signos clínicos en ratones inmunocomprometidos son los mencionados con anterioridad pero más severos. *K. pneumoniae* produce un polisacárido capsular de alto peso molecular y que es uno de los factores de virulencia dominantes.

35.1.5. *Mycoplasma pulmonis*

M. pulmonis es uno de los patógenos más importantes que infectan ratas y ratones de laboratorio. La célula de *M. pulmonis* carece de pared y tiene actividad hemolítica asociada a la membrana. Las tasas de prevalencia pueden ser altas dentro de las instalaciones de los animales. La transmisión es principalmente intrauterino y por aerosoles. El organismo establece fácilmente la infección colonizando la nasofaringe y oído medio. La infección suele ser asintomática, causando que algunos investigadores consideren a *M. pulmonis* una bacteria comensal en condiciones ideales. Sus efectos patológicos varían, dependiendo de una variedad de hospedadores, organismos, y factores ambientales, incluida la infección concurrente con copatógenos. Los niveles de susceptibilidad difieren según el stock y la cepa. En este sentido, las cepas de ratón más resistentes incluyen C57BR / cdJ, C57BL / 6NCr, C57BL / 10ScNCr y C57BL / 6J. Los signos clínicos suelen seguir a una infección crónica e incluyen rales, en ratas y ratones, disnea, pérdida de peso, xifosis o postura encorvada, letargo y, en ratas, puede aparecer porfirina periocular y perinasal. Los ratones pueden ser

asintomáticos. *M. pulmonis* coloniza preferentemente las superficies lumbinales del epitelio respiratorio y el revestimiento de las vías respiratorias proximales. Esta característica dio ascender a la designación anterior de "enfermedad de la vía aérea proximal". En general, los pulmones aparecen consolidados focalmente y las vías respiratorias contienen un exudado altamente viscoso. Microscópicamente, el espectro de los cambios patológicos puede incluir rinitis, otitis media, laringitis, traqueítis, bronquitis supurativa, bronquiectasias, abscesos y alveolitis pulmonar. *M. pulmonis* es un mitógeno (factores que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular) para los linfocitos de rata e induce la hiperplasia de tejido linfoide asociado con bronquios que histológicamente es algo distintivo en ratas. La gravedad de la enfermedad de la vía aérea puede estar influenciada por los perfiles de producción de citoquinas, por interacciones con las fibras nerviosas sensoriales, y por la viabilidad de los macrófagos alveolares. Los ratones inmunodeficientes son igualmente susceptibles a neumonía y muerte en comparación con los inmunocompetentes y pueden desarrollar artritis severa después de una infección por *M. pulmonis*.

La micoplasmosis genital también ocurre, particularmente en ratas LEW. Un estudio reciente demostró que el momento de la infección juega un papel importante en la determinación del resultado de la preñez y la propagación de la infección del tracto genital al tracto respiratorio. En los ratones, las respuestas humores contribuyen pero no garantizan una protección de la infección sistémica, mientras que en ratas, la inmunidad celular es más importante. La capacidad de respuesta del sistema inmune está relacionada con la edad. *M. pulmonis* puede diseminarse ampliamente en todo el huésped y por lo tanto puede alterar los resultados experimentales que incluyen alteración de carcinógeno pulmonar e inmunitario, en las respuestas de la función ciliar y cinética celular; función y eficiencia reproductiva, artritis inducida por adyuvante y colágeno.

35.1.6. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae es un diplococo grampositivo que se encuentra comúnmente en colonias de roedores de laboratorio. Existen más de 80 cepas, agrupadas por tipo capsular. La transmisión es principalmente a través de aerosoles de humanos infectados. El organismo es considerado un comensal en la mayoría de las condiciones, aunque depende de las diferencias de susceptibilidad de la cepa del huésped. Un estado portador es típicamente establecido en las fosas nasales y oído medio.

Los signos clínicos no son frecuentes, aunque se han informado brotes naturales de la enfermedad. Cuando están presentes, los signos clínicos son inespecíficos y puede incluir disnea, pérdida de peso, postura encorvada o xifosis. La virulencia va acompañada muchas veces con varias bacterias.

Los componentes de la bacteria son principalmente neumolisina, que es una toxina multifuncional con distintas actividades citolíticas y activadoras del complemento. La infección comienza con un cuadro broncopulmonar y la infección se propaga del pulmón a la pleura, pericardio y por vía septicémica difunde al resto del cuerpo. El pulmón afectado se presenta en primer lugar de tipo edematoso, luego se consolida y finalmente se eliminan los residuos celulares. Puede haber lesiones supurativas o fibrinosas en todo el tracto respiratorio y estructuras adyacentes. Estas incluyen comúnmente rinitis supurativa y otitis media, pero también puede incluir cambios similares en y alrededor de los tejidos más profundos del tracto respiratorio. Una septicemia puede resultar en el establecimiento de lesiones supurativas en prácticamente cualquier órgano, siendo la muerte una etapa final común. Los ratones atímicos no son más susceptibles a la enfermedad ya que la inmunidad del huésped es principalmente humoral, con considerable ayuda del complemento y el sistema de fagocitos mononucleares, TNF- α y surfactante pulmonar. La producción de IL-10 se induce después de una infección con *S. pneumoniae* y atenúa la respuesta de la citocina proinflamatoria dentro de los pulmones, dificulta la eliminación de la enfermedad efectiva de la y acorta la supervivencia. Los infectados con *S. pneumoniae* presentan alteraciones del metabolismo de la función hepática, niveles de bioquímicos en suero, pH sanguíneo y electrolitos, función tiroidea y parámetros respiratorios que podría esperarse que interfiera con una variedad de estudios. Dependiendo de la distribución bacteriana posterior a la septicemia, el costo de eliminar el organismo de las colonias debe evaluarse a la luz del uso previsto de los animales.

35.1.7. *Pasteurella pneumotropica*

P. pneumotropica es una bacteria gramnegativa, no hemolítica. Mientras que la mayoría de las especies de roedores pueden albergar el organismo, informes de brotes naturales son raros y generalmente se limitan a ratas y ratones inmunocomprometidos. Se han reportado otitis media en ratones CBA / J utilizados en la investigación de la audición. *P. pneumotropica* fue aislado de los conductos auditivos infectados. Sin embargo, es frecuentemente aislado de varios sitios de ratas y ratones sanos y por lo tanto se considera un agente patógeno

oportunista. La transmisión es probablemente por contacto directo y fomites. La enfermedad clínica, cuando es aparente, es limitada a lesiones de la piel y estructuras anexas, aunque la oftalmitis, la conjuntivitis y la mastitis también se han informado. Las lesiones se caracterizan por ser supurativas y con inflamación. Y la infección natural de ratas con *P. pneumotropica* podría comprometer la investigación que involucra tejidos como la piel y pulmones.

35.1.8. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un coco grampositivo coagulasa-positivo que comúnmente habita en la piel, tracto respiratorio superior y tracto digestivo inferior de muchos animales, incluidos los roedores de laboratorio, en los que ocasionalmente causa enfermedad. La transmisión es directa, y la entrada en el cuerpo es a través de roturas en las barreras normales. La enfermedad ocurre con frecuencia siguiendo los cambios fisiológicos en el huésped (por ejemplo, estrés e inmunosupresión). Una variedad de presentaciones clínicas se ha reportado en ratas y ratones. Estas incluyen lesiones en la cola, dermatitis ulcerativa y pododermatitis traumática en ratas; también abscesos faciales y de la glándula prepuccial; como automutilación del pene en ratones. Las lesiones son más graves en huéspedes inmunocomprometidos. Las ratas infectadas tienen alteraciones a nivel del fibrinógeno en plasma, el nivel de glucosa en suero, recuento total de leucocitos y de histología de las heridas. El sello de la infección por *S. aureus* es la inflamación supurativa, con formación de abscesos en prácticamente cualquier órgano. Comúnmente, la infección ocurre en la piel y en los tejidos subcutáneos, pero también se puede encontrar en las vías respiratorias superiores, los pulmones, la conjuntiva y en otros tejidos. La inmunidad a *S. aureus* se realiza principalmente a través del complemento por neutrófilos. La inmunidad mediada por células también puede ser importante y contribuir de manera secundaria a la patogenia. En las lesiones *S. aureus* produce varios productos biológicamente activos, incluyendo hemolisinas, leucocidinas, nucleasa, coagulasa, lipasa, hialuronidasa, exotoxinas, proteínas de unión a fibronectina y colágeno, proteína A y enterotoxinas. Muchos de estos pueden ser degradados por las células fagocíticas en otros productos activos. Los efectos de estos productos son numerosos e incluyen la lisis celular; aumento en la permeabilidad microvascular pulmonar; shock y fallo multiorgánico; epidermólisis e inducción de exceso de sueño y fiebre. Se ha demostrado que la infección con *S. aureus* altera la respuesta del sistema inmunitario.

35.1.9. *Bordetella bronchiseptica*

El motivo para mantener a *B. bronchiseptica* en listas de agentes patógenos proviene principalmente de su asociación histórica con instalaciones de animales de laboratorio. Faltan informes actualizados de infecciones por *Bordetella* adquiridas naturalmente en ratas y ratones. Se clasificó a *B. bronchiseptica* entre los agentes "no demostrados de manera concluyente como patógenos naturales de ratones o ratas". Un sistema de selección japonés clasificó a *B. bronchiseptica* como un patógeno oportunista, no letal, que puede afectar factores fisiológicos y funciones y para las cuales se recomendó el monitoreo de rutina en ratas, pero no en ratones. En una revisión reciente de patógenos naturales de ratones, ratas y conejos de laboratorio, *B. bronchiseptica* fue notablemente ausente en las revisiones de ratas y ratones. Claramente es diferente para animales inmunodeficientes y axénicos que para animales SPF inmunocompetentes; sin embargo, la incertidumbre que rodea el estado de *B. bronchiseptica* como un patógeno natural de ratones y ratas de laboratorio han planteado interrogantes sobre su control, como por ejemplo si la infección subclínica o colonización por *B. bronchiseptica* interferirá con los usos de investigación de estos animales. En relación a la biología del género se conoce que son bacilos no fermentativos, gramnegativos. Actualmente ocho especies de *Bordetella* están clasificadas en la familia Alcaligenaceae, junto con géneros estrechamente relacionados de *Achromobacter* y *Alcaligenes*. *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, y *B. avium* se asocian con enfermedad del tracto respiratorio *Bordetella pertussis* causa tos ferina en humanos. Las cepas específicas de hospedador de *B. parapertussis* causan enfermedad similar a la tos ferina en humanos y neumonía no progresiva en corderos. *Bordetella bronchiseptica* se asocia con infecciones infecciosas como traqueobronquitis (tos de las perreras) en perros, rinitis atrófica en cerdos y enfermedades del tracto respiratorio en varios otros mamíferos. *Bordetella avium* causa coriza en pavos e infecta varias otras especies aviares. *Bordetella hinzii*, *B. holmesii* y *B. trematum* se han aislado de infecciones oportunistas de diversos tejidos en humanos. *Bordetella hinzii* es una comensal en el tracto respiratorio de los pollos y también se lo encuentra en roedores junto con *B. pseudohinzii*, mientras que *B. holmesii* y *B. trematum* han sido aislados solo de humanos. La nueva especie, *B. petrii*, es inusual en eso, a diferencia de las otras especies estrictamente aerobias asociadas con animales, donde esta es facultativamente anaeróbica y se aisló del medio ambiente. *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* comparten muchos rasgos. Representan una sola genomoespecie, con diferencias de subespecies en la

especificidad del huésped y la virulencia que generan a través de la evolución independiente de un progenitor de *B. bronchiseptica*. *Bordetella avium* y *B. petrii* son especies genéticamente más divergentes. Los principales factores de virulencia de *B. bronchiseptica* pueden ser clasificados en dos grupos: los que promueven la colonización, y los que habilitan la bacteria para escapar de la destrucción en el huésped. La colonización se logra mediante la unión por adherencias bacterianas fimbriales y no fimbriales y por la capacidad de replicarse en el ambiente restringido de la mucosa del tracto respiratorio. Son al menos cinco tipos de fimbrias bacterianas proteicas (FIM) producidas por *B. bronchiseptica*, y dos no fimbriales, adhesinas de proteínas de membrana externa, hemaglutinina filamentosas (FHA) y pertactina (PRN). La replicación en el tracto respiratorio es ayudado por la preferencia de *B. bronchiseptica* por aminoácidos fácilmente disponibles como fuentes de crecimiento y energía y por la producción de sideróforos de hidroxamato y de unión; proteínas que movilizan el hierro de la transferrina, la lactoferrina y hemo. Las propiedades de *B. bronchiseptica* que le permiten escapar de la destrucción en el huésped incluyen: toxina dermonecrótica (DNT), una citotoxina mitogénica vasoconstrictora que inhibe los osteoblastos y otras células al alterar la función de pequeñas proteínas de unión a GTP involucradas en las vías de señalización celular; toxina adenilato ciclasa, (ACT), una hemolisina que forma poros bifuncionales y toxina adenilato ciclasa que inhibe las funciones de los fagocitos; citotoxina traqueal (TCT), un dipéptido de muramilo secretado que estimula el ácido nítrico. Producción de óxido e interfiere con la función mucociliar; productos de secreción tipo III, productos no definidos que requieren una secreción dependiente del contacto para desactivar el factor de transcripción. NF-κB y causan efectos moduladores en la respuesta inmune del huésped; lipopolisacárido (LPS), un endotoxina y antígeno O con efectos biológicos similares a los encontrados en otras bacterias gramnegativas; y la invasión celular y la supervivencia intracelular, propiedades in vitro que involucran al epitelio, células dendríticas y fagocíticas que pueden jugar un papel en la persistencia de la infección. *Bordetella bronchiseptica* es principalmente un patógeno extracelular. Las propiedades de invasión celular y supervivencia intracelular que se están investigando actualmente no se han observado in vivo y no son comparables a los de las bacterias intracelulares facultativas bien conocidas como *Mycobacterium spp.* o *Brucella spp.* La característica más consistente de la infección por *B. bronchiseptica* es la colonización prolongada del epitelio de la vía aérea ciliada. Muchos de los animales infectados no desarrollan enfermedad clínica. Los animales jóvenes son más susceptibles, y la enfermedad a

menudo involucra coinfección con otros agentes. La tos es un signo clínico común de enfermedad; sin embargo, signos que reflejan una inflamación neutrofílica. El término "patógeno oportunista" ha sido utilizado para *B. bronchiseptica* es comúnmente es aislada de animales que no tienen signos clínicos de enfermedad, pero no siempre se detalla si su presencia representa infección primaria, recrudecimiento de la infección, reinfección o persistencia como flora autóctona. *B. bronchiseptica* es una infección y enfermedad natural en ratas, que fue reportada en un resumen de Borden y Kulp en 1939, de Beer en 1959, y por Winsser en 1960. Borden y Kulp la aislaron de los pulmones y la sangre del corazón de un número no especificado de ratas en la "etapa aguda de la neumonía". También afirmaron que la instilación intratraqueal de cultivos de *B. bronchiseptica* reproducía las lesiones macroscópicas e histológicas de la enfermedad original. Sin embargo, no se dieron detalles ni el estado de salud de las ratas donantes o receptoras conocidas con respecto a virus u otras bacterias Beer, concluyó que *B. bronchiseptica* no era un patógeno primario. Winsser mencionó que aisló a *B. bronchiseptica* del tracto respiratorio y bulla de una de ratas que tenían una neumonía mortal con frecuencia. Aunque creía que *B. bronchiseptica* era responsable de las muertes, fue incapaz de reproducir la condición. Desde 1960, no se encontraron informes de enfermedad adquirida de forma natural por *B. bronchiseptica* y también ha habido poca información para confirmar la presencia continua de infección por *B. bronchiseptica* en ratas. Se han utilizado pruebas serológicas para monitorizar *B. bronchiseptica* y encontraron que el 39% de las ratas de colonias usuarias eran positivas mientras que menos del 6% de los ratones analizados en colonias reproductoras fueron positivos para anticuerpos contra *B. bronchiseptica*. Estos informes proporcionan evidencia de que las ratas pueden servir como huésped para *B. bronchiseptica*, pero no indica que sea patógeno. En infecciones experimentales de la rata con *B. bronchiseptica* ha tenido éxito en la creación de lesiones del tracto respiratorio y donde suspensiones o diluciones de cultivo de caldo mataron ratas jóvenes dentro de 24 horas después de la inyección intraperitoneal, pero no tuvo ningún efecto después de la inyección subcutánea. Similarmente altas dosis de organismos indujeron bronconeumonía en el 100% de las ratas inoculadas por vía intratraqueal. Los efectos patológicos que los investigadores observaron en ratas son difíciles de atribuir por completo a la infección por *B. bronchiseptica* ya que otros agentes, especialmente micoplasmas y virus, no estaban monitoreados en todos los casos y las dosis altas utilizadas pueden haber contenido cantidades abrumadoras de endotoxinas. En condiciones normales y después de exposición

intranasal experimental, las ratas tuvieron alta resistencia a la infección clínica, pero desarrollaron un estado portador. En ratones, el único informe publicado sobre la enfermedad adquirida naturalmente debido a la infección por *B. bronchiseptica* es de Keegan en 1920. Las lesiones incluyeron bronconeumonía, con bronquiectasias marcadas, hiperplasia epitelial bronquial e infiltración de linfocitos perivasculares. Estas lesiones son, sin embargo, también es compatible con micoplasmosis y / o infección por *Car-bacillus* asociada a cilios. *B. bronchiseptica* debe ser considerado un invasor secundario. También se ha informado que los ratones albergan una infección subclínica de *B. bronchiseptica*, aunque parecen más resistentes que las ratas a la infección, La infección por *B. bronchiseptica* puede propagarse a ratones en proximidad a cobayos, ratas y otros animales en los que se produce una infección por *B. bronchiseptica*, aunque los ratones son relativamente insensibles a la infección natural. Los resultados sugieren que *B. bronchiseptica* es ocasionalmente aislado de ratones. También se informó que neumonía espontánea por *B. bronchiseptica* en ratones SCID. La prevalencia de *B. bronchiseptica* es baja en colonias de ratones de laboratorio. Informes que describen las lesiones patológicas macroscópicas y microscópicas asociadas con infecciones experimentales en ratas y ratones han sido pocos. Infecciones no letales en ratas inmunocompetentes y en los ratones se caracterizan por la infiltración de neutrófilos y en menor medida, células mononucleares en la mucosa del tracto respiratorio. La severidad ha variado dependiendo de la dosis y la virulencia de la cepa *B. bronchiseptica* infectante. En casos más severos, microabscesos intraepiteliales y acumulaciones intraluminales de exudados purulentos han sido acompañados por la pérdida de cilios e hiperplasia. Se cree que la transmisión de *B. bronchiseptica* se produce principalmente por contacto directo o gotas de aerosol de animales infectados. Poco se sabe sobre el estado del portador. Se ha dicho que las ratas infectadas experimentalmente pueden convertirse en portadoras de por vida y con baja sensibilidad de detección, las tasas de infección dentro de una colonia podría llegar a ser alta antes de ser detectada. *B. bronchiseptica* puede sobrevivir en materiales inanimados, como lecho de cama, basura y agua, por períodos cortos, y potencialmente puede hacerlo. Lo mismo en las superficies de los animales, como el pelo y la piel. Aunque no hay evidencia de que los humanos hayan introducido *B. bronchiseptica* en instalaciones de roedores de barrera. La eliminación de *B. bronchiseptica* de una colonia de roedores es solamente garantizada por la eliminación de los animales infectados y la desinfección de todos los materiales, equipos y superficies estructurales dentro de la instalación. En la actualidad, no es posible identificar a

todos los animales infectados debido a la baja prevalencia de portadores en la población y bajo nivel de desprendimiento en portadores. Aunque el tratamiento con antibióticos puede parecer una alternativa atractiva para grupos pequeños de animales. En los efectos sobre la investigación se debe poner mayor énfasis en el monitoreo de animales inmunocompetentes infectados de manera subclínica para determinar qué efectos que la infección pueden tener en la investigación y propagación a otros animales. Es de esperar que, durante el apogeo de la infección aguda, los efectos fisiopatológicos de la bacteria pudieran tener efectos adversos en investigaciones. Se espera que los animales inmunodeficientes sean más susceptibles a *B. bronchiseptica* que los animales inmunocompetentes, pero no hay información estadística publicada sobre los aislamientos recuperados de animales inmunodeficientes para indicar que están más susceptible a *B. bronchiseptica* que a otros patógenos menos considerados. En hospedadores totalmente inmunocompetentes, al igual que con ratones y ratas inmunodeficientes mutantes y los roedores modificados genéticamente, *B. bronchiseptica* no parece ser un problema importante. Por ejemplo, un laboratorio importante de diagnóstico de roedores con una clientela internacional nunca ha aislado *B. bronchiseptica* de inmunodeficientes o ratones o ratas modificados genéticamente, a pesar de procesar cientos de estos animales cada semana, utilizando medios y técnicas adecuados. Entonces se debe considerar la falta de evidencia convincente de enfermedad natural en ratas o ratones, aunque ambas especies son susceptibles de colonización persistente. En conclusión los informes de enfermedad adquirida naturalmente atribuibles a *B. bronchiseptica* en ratones o ratas han sido pocos desde 1960. Tampoco está claro si los ratones y las ratas son hospedadores naturales de este agente y existe una aparente baja prevalencia del mismo en bioterios.

35.1.10. *Pneumocystis carinii*

Pneumocystis carinii, clasificado como hongo que habita las vías respiratorias de ratones y ratas de laboratorio. Es un agente patógeno solo en condiciones de inmunodeficiencia inducida o inherente. La transmisión es a través de la inhalación de quistes infecciosos y no ocurre en forma transplacentaria. Los signos están ausentes en animales inmunocompetentes excepto si han sido inducidos con corticosteroides. Los signos en animales inmunodeprimidos o inmunodeficientes incluyen actividad reducida, pelaje áspero, disnea, cianosis y muerte. Los pulmones están agrandados, oscuros y gomosos. La neumonía puede exacerbarse por una

coinfección de otros patógenos neumotrópicos. La recuperación de infección con *P. carinii* puede mejorarse con proteína A asociada a surfactante.

La inmunidad (está relacionada con la edad) se produce tanto a través de mecanismos humorales y mediados por células, con macrófagos y neutrófilos. La glicoproteína A es el antígeno inmunodominante de *P. carinii* y ha demostrado alterar la permeabilidad de la membrana capilar de los alveolos. Los animales infectados son propensos a desarrollar neumocistosis severa después de la inmunosupresión y el modelo animal se volverá inadecuado para la mayoría de los experimentos que involucren el sistema respiratorio.

Pneumocystis murina fue aislado por primera vez de ratones de laboratorio, de ahí su nombre. *P. murina* es una especie de hongo perteneciente al género *Pneumocystis*, caracterizado por su morfología multinucleada tipo quiste y asociación con el tracto respiratorio de los mamíferos. *P. murina* es particularmente notable por su infección exclusiva de ratones de laboratorio y su papel como modelo importante para estudiar enfermedades humanas,

específicamente infecciones por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes inmunocomprometidos. *Pneumocystis murina* fue identificada filogenéticamente y descrita por primera vez como una especie distinta por Keely, SP, Fischer, JM, Cushion, MT y Stringer, JR en 2012. Es único por varias razones. En primer lugar, sólo se encuentra en ratones de laboratorio, no en entornos naturales. En segundo lugar, es un patógeno que causa la formación de quistes en el tracto respiratorio de ratones de laboratorio inmunocomprometidos, lo que provoca signos clínicos de infección como disnea, pérdida de peso, postura encorvada y piel escamosa. *P. murina* no es comestible ni cultivable, y no se puede cultivar in vitro.^[8] El hongo se transmite entre ratones por inhalación o mediante la eliminación de *P. murina* de un huésped a otro. Sirve como un modelo importante para estudiar enfermedades humanas, en particular las infecciones por *Pneumocystis jirovecii*, que son una causa importante de morbilidad y mortalidad en personas inmunocomprometidas, como aquellas con VIH/SIDA o pacientes que reciben terapias inmunosupresoras. Los aspectos únicos de *Pneumocystis murina* lo convierten en un modelo invaluable para estudiar el patógeno humano *Pneumocystis jirovecii*, ya que ambos patógenos comparten características biológicas y moleculares similares. La investigación sobre *P. murina* ha contribuido al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y prevención de infecciones por *P. jirovecii* en pacientes inmunocomprometidos. Uno de los desafíos críticos en el estudio de *P. murina* y *P. jirovecii* es su incapacidad para cultivarse in vitro, lo que ha dificultado la comprensión de sus ciclos de vida y el desarrollo de

terapias dirigidas. Sin embargo, los avances recientes en biología molecular y técnicas de imágenes han permitido a los investigadores obtener más información sobre la biología y patogénesis de estos organismos. Las infecciones por *P. murina* en ratones de laboratorio sirven como una herramienta esencial para comprender la interacción huésped-patógeno, la respuesta inmune y los posibles tratamientos para la neumonía por *P. jirovecii* (PJP) en humanos. A medida que la incidencia de PJP continúa aumentando debido al creciente número de personas inmunocomprometidas, la necesidad de estrategias efectivas de tratamiento y prevención es primordial. La investigación sobre *P. murina* y sus características únicas es muy prometedora para abordar este importante desafío de salud pública.

35.2. Patógenos del Sistema Digestivo

35.2.1. Citomegalovirus del ratón (MCMV)

El citomegalovirus de ratón (MCMV) es un virus DNA de la familia Herpesviridae que se encuentra principalmente en las glándulas salivales submandibulares de los ratones. Se cree que su prevalencia en colonias de ratones de laboratorio es baja, aunque los resultados del diagnóstico se ven afectados por el método de detección pues persisten en las glándulas salivales de los animales infectados.

La transmisión es a través del contacto con saliva infectada, generando infecciones latentes pueden darse en los riñones, próstata, páncreas, testículos, corazón, hígado, pulmones, bazo, neuronas de la corteza cerebral e hipocampo, y células del tejido mieloide. Puede ocurrir transmisión vertical transplacentaria. Las infecciones naturales de ratones inmunocompetentes con MCMV son de naturaleza subclínica y los cambios patológicos se limitan a encontrar en células de glándulas salivales agrandadas (citomegálicas) inclusiones intranucleares. En una infección experimental puede generar adenitis aunque sin compromiso de la función suprarrenal. Los efectos de una infección experimental dependen de una variedad de factores del huésped; en ratones recién nacidos e inmunocomprometidos es más severo y los ratones de la cepa BALB / c son más susceptibles a la infección que C57BL / 10 y CBA/J. Aunque los ratones C57BL / 6 infectados con MCMV desarrollan una inflamación más notoria con lesiones que afectan la aorta ascendente y la arteria pulmonar que los ratones BALB / c. La inmunidad es mediada principalmente por células T CD81 y células NK que desempeñan papeles críticos controlando la replicación de MCMV. La infección natural por MCMV no se ha demostrado que pueda interferir con los resultados de la investigación, sin embargo una la infección

experimental puede alterar una variedad de funciones fisiológicas del huésped, incluyendo depresión de anticuerpos y producción de interferón, aumento del número de linfocitos CD41 en lavado de fluidos broncoalveolares, proliferación de linfocitos y rechazo alógeno de injertos de piel; disminución de la fecundidad; trombocitopenia; exacerbación de la calcificación cardíaca normal. Los casos naturales de citomegalovirus de rata (RCMV) han sido reportados en ratas salvajes pero no de laboratorio. La biología y la fisiopatología de las infecciones por RCMV de forma experimental son similares a la de una infección por MCMV. La infección natural de ratones y ratas de laboratorio podrían interferir en la investigación a través de alteraciones de una variedad de funciones inmunológicas.

35.2.2. Parvovirus

El estudio de los parvovirus que infectan a los roedores tiene su origen cuando el MVM, virus Kilham de la rata (KRV) y virus Toolan (H-1) fueron descubiertos como contaminantes de cultivos de células, al igual que la mayoría de las especies de parvovirus. Dos especies infectan naturalmente a los ratones de laboratorio: MVM y el parvovirus del ratón (MPV, del inglés *mouse parvovirus*).

Familia Parvoviridae, subfamilia Parvovirinae, Género Protoparvovirus, Virus que infectan a los roedores. Clasificación propuesta por el Comité internacional de taxonomía viral.

Rodent protoparvovirus 1

- H-1 parvovirus

 - H-1 parvovirus (H1)

- Kilham rat virus

 - Kilham rat virus (KRV)

- Lull virus

 - Lull virus (Lull)

- Minute virus of mice

 - Minute virus of mice (prototype) (MVMp)

 - Minute virus of mice (immunosuppressive) (MVMi)

 - Minute virus of mice (Missouri) (MVMm)

 - Minute virus of mice (Cutter) (MVMc)

Mouse parvovirus 1

Mouse parvovirus 1 (MPV1)

Mouse parvovirus 2 (MPV2)

Mouse parvovirus 3 (MPV3)

Mouse parvovirus 4 (MPV4)

Mouse parvovirus 5 (MPV5)

Hamster parvovirus (HaPV)

Tumor virus X

Tumor virus X (TVX)

Rat minute virus 1 (RMV1)

Rodent protoparvovirus 2

Rat parvovirus 1 (RPV)

35.2.3. Virus diminuto del Ratón (MVM)

El virus diminuto del ratón (MVM, del inglés *Minute virus of mice*) forma parte de la familia *Parvoviridae* (del latín *parvus* = pequeño) que incluye a virus que infectan a vertebrados e invertebrados, están filogenéticamente relacionados y probablemente derivan de un ancestro común ya que comparten propiedades biológicas. Esta familia viral se encuentra actualmente en proceso de reclasificación y sus miembros se agrupan en dos subfamilias, la subfamilia *Densovirinae* (virus de los invertebrados) integrada por cinco géneros y la subfamilia *Parvovirinae* (virus de los vertebrados) constituida por ocho géneros. Los parvovirus que infectan a los roedores, entre ellos el MVM se encuentran dentro del género *Protoparvovirus*. Actualmente son descritos el MVMCR (la cepa original de Crawford -1966-), MVMp (cepa prototipo obtenida por purificación en placa de MVMCR), MVMi (variante inmunosupresora descubierta en 1976), MVMc (cortador) aislada durante la década de 1980 como contaminante de células BHK-21 que eran utilizadas para producir una proteína recombinante en un laboratorio comercial y MVMm (Missouri), aislado de ratones NOD homocigotas infectados de la Universidad de Missouri. En conclusión, desde el descubrimiento de MVM a la actualidad, solo dos cepas han sido estudiadas extensamente, el MVM(p) y el MVM(i) y mientras que MVM(c) y MVM(m) no han generado interés en la investigación debido a que presentan las mismas características que MVM(p). Esta estructura y la ausencia de envoltura hacen que el MVM al igual que el resto de los parvovirus sea extraordinariamente resistente a las

condiciones ambientales. El virus es inactivado después de someterlo a 100°C por 15 minutos, 80°C por 2 horas o 40°C en un máximo de 60 días. También es resistente a la desecación, al pH entre 2 y 11, al cloroformo, éter y al alcohol.

Algunos autores demostraron que la transmisión de MVM entre animales infectados y susceptibles ocurre en forma horizontal principalmente y puede producirse por contacto directo o por contacto nasal-oral, como también por contaminación urinaria o fecal, fómites, comida contaminada y el lecho de la cama sucia. Se demostró que los aerosoles no son importantes en la transmisión.

La infección transplacentaria del feto en desarrollo, fue demostrada por infección experimental para MVM y otros parvovirus en varias especies de roedores, por ende también la transmisión vertical es una posibilidad de propagación de virus en las colonias. En experiencias posteriores se demostró que los embriones de ratón con la zona pelúcida intacta no son susceptibles a la infección por MVM, sin embargo, se encontró la infección de embriones con MVM y MPV en experiencias de transferencia embrionaria de rutina. Esto sugiere que en la técnica de transferencia embrionaria utilizada para la limpieza de colonias contaminadas, podrían existir alteraciones en la zona pelúcida de los embriones y los mismos se infectarían con parvovirus. Se ha demostrado que la sensibilidad de infección por MVM es genotipo y en algunas cepas también género dependiente y se han citado casos de sensibilidad y seroconversión con a MVM en tres fenotipos diferentes de ratones, por ejemplo ratones C57BL/6N, FVB/N (endocriados) y NMRI (exocriados) son resistentes a la infección, requiriendo dosis infectivas del orden de 10 a 100 veces mayores comparadas con las necesarias para infectar a ratones de las cepas BALB/c o CD1. También se demostró que en neonatos de la cepa DBA/2 este virus genera una hemorragia intestinal letal al igual que en la BALB/c y en la C3H. Otros autores también afirman que algunas cepas de ratones heterogénicas e isogénicas como ser SW, ICR, BALB /c y C3H son más susceptibles a la infección por MVM. Los anticuerpos (Ac) maternos de madres no infectadas durante la gestación, protegen a los neonatos durante el período de lactancia hasta 6 a 8 semanas de edad, pero la mayoría de los ratones nacidos en colonias infectadas se infectan luego a los dos o tres meses de edad. El MVM causa una enfermedad aguda y autolimitante a diferencia del MPV que puede causar una infección persistente en ratones jóvenes y adultos y siendo el virus eliminado de forma intermitente durante más de seis semanas. La inmunidad pasiva declina alrededor de las cuatro semanas y los ratones jóvenes son más propensos a contraer la infección por MVM en comparación con los adultos, además

no se produce protección cruzada de inmunidad humoral para MVM o MPV. Los animales infectados con MVM eliminan el virus por períodos relativamente largos y de forma transitoria. MVM puede ser eliminado durante cuatro semanas. Se detectó la eliminación de MVM a través de las heces por la técnica de PCR en muestras de ratones provenientes de una colonia infectada naturalmente y en el 70% de los ratones controlados mostraron que MVM era detectado en los animales a partir de las 5 semanas de edad y declinaba progresivamente hasta llegar a la 13 semana de edad, período en el cual todos los animales fueron negativos para el virus. Los porcentajes más altos de los animales positivos para MVM (70% a 60%) se observaron cuando estos eran de 6 a 9 semanas de edad. Estos datos implican que los ratones jóvenes están protegidos en las primeras semanas de vida por los Ac de la madre. Cuando esta protección pasiva disminuye para el final del primer mes, los animales se vuelven susceptibles y son infectados con el virus. MVM es capaz de establecer una infección enzoótica en colonias de laboratorio, siendo asintomática la infección en animales adultos inmunocompetentes y en ausencia de manipulación experimental. No hay, por lo tanto, procedimientos fiables de inspección externa para un diagnóstico clínico o morfológico de infección por MVM. La infección por MVMP en ratones adultos es restringida al tracto intestinal y se han citado esplenomegalias en inoculaciones experimentales; mientras que MVMI produce infección sistémica con necrosis renal papilar y alteraciones hematopoyéticas. Numerosos estudios sobre la patogenia de MVM han demostrado que, en general, causan anormalidades fetales y neonatales, destruyendo poblaciones específicas de células que proliferan rápidamente durante el curso normal del desarrollo. En los animales adultos esto no ocurre, ya que son resistentes porque los tejidos están mitóticamente inactivos y en consecuencia no hay una enfermedad manifiesta. Un estudio asociado a una infección de origen natural con MVM produjo retraso del crecimiento, reducción de la fecundidad y muerte prematura en ratones NOD homocigotos. Ratones deficientes en linfocitos B (Igh-6^{-/-}) naturalmente infectados con MVM mostraron un síndrome de enanismo, fecundidad reducida prematura, anemia y leucopenia, indicando que MVM había infectado células progenitoras hematopoyéticas en el bazo y la médula ósea. Los ratones inmunodeprimidos son particularmente sensibles a la infección de MVM en los primeros días de vida. En las infecciones causadas por MVM en ratones adultos, encontramos que pueden estar restringidas al tracto entérico sin lesiones excepto en animales inmunodeprimidos, o producir efectos inmunomoduladores por una inducción débil de interferón *in vivo* y de IFN-beta, TNF-alfa e IL6 *in vitro*. También puede

producirse una infección sistémica en neonatos asociada con necrosis papilar renal y la interrupción hematopoyética. En infecciones experimentales con MVMi en los neonatos de C57BL/6 se observa que son muy resistentes a la infección letal, mientras que neonatos de las cepas BALB / c, SWR, SJL, CBA y C3H desarrollan infarto renal con sangrado papilar. La cepa C3H también puede presentar sangrado intestinal y acelerar la involución de la hematopoyesis hepática. Otra característica de la infección por MVM en forma experimental en ratones neonatos es la hipoplasia cerebelar que con frecuencia conduce a una ataxia crónica. De esta manera, se demostró que esta condición era a causa de un agotamiento de origen viral en una población de células que está proliferando rápidamente y en este caso, en células de la corteza granular del cerebelo. Posteriormente se demostró que estas lesiones características ocurren en infecciones naturales por MVM en ratones durante el período prenatal mostrando también hipoplasia cerebelar y ataxia debido a la acción viral selectiva con rápida proliferación de la capa germinal externa del cerebelo. El endotelio vascular y sistemas hematopoyéticos y linforreticulares (que comprenden diferentes tipos de células) que proliferan y se diferencian en el adulto y en el recién nacido, son por lo tanto blancos comunes de MVM y las lesiones y signos clínicos de la enfermedad se deben a la infección de esos tejidos. Así como sucede en los ratones recién nacidos, también aquellos que se infectan en el útero son susceptibles a la enfermedad, ya que poseen un gran número de células en división para la replicación del virus debido a que MVM traspasa la placenta y establece infecciones del feto. Un número de factores afectan el resultado de infecciones fetales experimentales, tales como la ruta de inoculación, dosis y cepa viral, la especie huésped preñada y los ratones infectados durante la gestación. En algunos casos, la inoculación temprana con una gran dosis de MVM durante la gestación, dará lugar a una infección letal en forma generalizada y devastadora, con una participación de gran parte del tejido mesodérmico del embrión que resulta en una reabsorción o momificación fetal. La infección en tiempos finales de la gestación puede producir descendencia viable pero además del desarrollo de una hipoplasia cerebelar mencionada anteriormente, se puede también desarrollar una encefalopatía hemorrágica o enteritis y hepatitis neonatal. Además, la participación de poblaciones de células con alta actividad mitótica durante o después de la infección es una característica consistente de estas enfermedades. Por lo tanto, en las infecciones experimentales se observa que tanto el genotipo del ratón huésped, la dosis viral y la vía de inoculación, afectan el curso de una infección exitosa como también el desarrollo de una enfermedad en el caso que el virus alcanzara al feto en desarrollo. Los efectos del tiempo

de infección por MVM durante la gestación sugieren que diferentes tipos de células en diferentes tejidos embrionarios pasan por un estado de sensibilidad y están secuencialmente y transitoriamente “en riesgo” durante el desarrollo fetal. Este “periodo de riesgo” se corresponde con el tiempo de proliferación rápida de determinado tipo celular durante el proceso de organogénesis. El requerimiento de la transición Fase-S celular para la infección productiva mencionada anteriormente ha sido propuesto como base para el tropismo del tejido específico observado durante la infección por MVM y para explicar la resistencia de un animal adulto en comparación con el feto o neonato. En los roedores neonatos murinos se demostró que son incapaces de recuperarse de una infección por MVM debido a la inmadurez de su sistema inmune como consecuencia del virus. Una infección prenatal puede causar la pérdida parcial o completa de la camada debido a la necrosis de los tejidos linfáticos, hematopoyéticos y trombocitopenia, mientras que los progenitores permanecen aparentemente normales. Aunque la actividad proliferativa celular parece ser un pre-requisito para órganos diana, está claro que no todos los tejidos que crecen rápidamente, están necesariamente sujetos a una infección por MVM. La mayoría de los tejidos en un adulto están mitóticamente inactivos en comparación con los del feto o neonato, pero varios tejidos como el epitelio intestinal y el sistema hematopoyético que contienen grandes números de células en una activa mitosis es de esperar que estas células, las cuales son esenciales para la supervivencia y el bienestar del organismo huésped, sean el blanco del ataque del parvovirus en el adulto que le permiten mantenerse en la colonia en forma latente o en ausencia de lesiones. En la actualidad no existen estudios suficientes en animales transgénicos y que son utilizados en gran número en investigación que pueden ser susceptibles de infecciones a MVM, sin embargo en ratones SCID adultos con inmunodeficiencia combinada grave, produce un agotamiento de los precursores hematopoyéticos en la médula ósea, que conduce a leucopenia grave y la eritropoyesis acelerada, que afecta la repoblación, de células madre hematopoyéticas a largo plazo. Estudios in vitro proporcionan evidencia para las variaciones de la cepa de MVM en el genotipo animal, tropismo tisular y el potencial de cambios a ocurrir por mutación en el rango de los diferentes tipos de células que una determinada cepa viral puede infectar. Por lo tanto, una simple explicación de la posible aparición de cepas de virus patogénicas para un huésped adulto transgénico o no, es que dichos virus han mutado para incluir, dentro de su repertorio de los tipos de células productivas, a algunas que proliferan rápidamente en el animal maduro, pero también se podría predecir que la presión evolutiva hacia un estilo de vida enzoótico y de

aislamiento en poblaciones de hacinamiento, tales como son los bioterios con colonias de roedores de laboratorio, pueden llevar a la eliminación del repertorio de las cepas comunes estudiadas de los parvovirus de roedores. Estudios in vitro sobre la especificidad de la célula diana han proporcionado significativo apoyo para la hipótesis de que el crecimiento del virus lítico se modula por componentes regulados por el desarrollo realizado en el huésped a un nivel celular han reportado que las células activamente en división de un embrión temprano de ratón son resistentes a la lesión y muerte por MVM. Células de carcinoma embrionario murino y las células madre de teratocarcinoma son también resistentes a MVM al igual que muchos de sus diferentes derivados celulares. Sin embargo, cuando estas células son inducidas a diferenciarse in vitro, dan lugar al menos a un tipo de célula diferenciada, parecida a un fibroblasto, el cual permite la replicación productiva de MVM. Estos estudios demostraron que el ciclo celular, aunque es necesario, no es suficiente para la replicación lítica, productiva de los parvovirus, y que el tipo y estado de diferenciación celular de la célula huésped es de suprema importancia.

35.2.4. Parvovirus de ratón tipo 1-5

El MPV-1, anteriormente conocido como parvovirus huérfano, es un patógeno reconocido y muy prevalente en colonias de ratones de laboratorio. Son virus de la familia Parvoviridae. El MPV-1 requiere de células en activa división mitótica (S1) para su replicación. El virus se elimina por vía urinaria, fecal y, tal vez, por vías espiratorias. La transmisión directa a partir de elementos, tejidos contaminados o cama sucia o también puede ocurrir después de una exposición experimental a líneas seleccionadas de células T infectadas. Las infecciones naturales de los ratones son generalmente asintomáticas y apatogénicas, incluso en ratones neonatos e inmunocomprometidos pero cuando los animales son sometidos a experiencias que impliquen un stress, el MPV-1 afecta los procesos vinculados a proliferación celular, modulación directa y disfunción de los linfocitos T y alteraciones en los patrones de rechazo de tumores y aloinjertos cutáneos. En ratones inmunocompetentes, se produce replicación viral en el páncreas, bazo, intestino delgado, los órganos linfoides y el hígado. El virus puede persistir durante varias semanas y la replicación viral es más extendida en ratones inmunodeficientes. MPV-1 tiene alguna reactividad cruzada antigénica con el virus diminuto del ratón, debido a dos proteínas no estructurales altamente conservadas que no permite la discriminación viral en

técnicas serológicas como IFI y ELISA estándar. El parvovirus de rata, designado RPV-1 puede suprimir el desarrollo de tumores linfoides.

35.2.5. Rotavirus murinos (Virus EDIM y EDIR)

La enfermedad causada por el rotavirus del ratón, es conocida como diarrea epizootica de ratones neonatos y es comúnmente diagnosticada en ratones de laboratorio jóvenes con diarrea. Los rotavirus son virus dsRNA de la familia Reoviridae. El rotavirus del ratón es un miembro del grupo A de los rotavirus, que infectan una variedad de hospedadores vertebrados, incluyendo los humanos. Se han identificado múltiples cepas de rotavirus de ratón y la infección es muy contagiosa y se adquiere a través de la exposición a cama sucia contaminada o en el aire y por contacto con ratones infectados. No es de transmisión transplacentaria. Los ratones son los más susceptibles desde el nacimiento hasta las 2 semanas de edad, posiblemente debido a las características transitorias de los enterocitos intestinales. El virus se elimina a través de las heces por aproximadamente 10 días postinfección. No se conoce un estado portador, con diseminación fecal persistente, de bajo nivel. Los signos clínicos generalmente se ven solo en ratones infectados dentro de las primeras 2 semanas de vida que incluyen una deposición acuosa, color mostaza, letargo y abdomen distendido. La infección y patología progresan desde el intestino proximal al distal. Los enterocitos vellosos apicales se ven afectados principalmente y pueden ser de aspecto vacuolados y contienen núcleos picnóticos. Desarrollan una mala absorción y una diarrea osmótica con un gran desarrollo de *Escherichia coli* que puede contribuir al patrón clínico-patológico. Los ratones atímicos nude no son más susceptibles a la enfermedad del rotavirus que las cepas inmunocompetentes. En cambio, los ratones con inmunodeficiencia (ratones scid / scid) se ven afectados más severamente. El rotavirus se une a las células intestinales del ratón a través de unas glicoproteínas que contienen restos de ácido siálico. Pero se conoce que las mucinas intestinales pueden inhibir la infección del rotavirus siendo una barrera a la infección. La inmunidad a la infección por rotavirus en ratones se produce por anticuerpos, células presentadoras de antígenos y linfocitos T. La protección puede estar relacionada con la replicación intestinal del virus en lugares de características inmunogénicas específicas. Cuando ocurre una infección por rotavirus puede alterar la fisiología del huésped de muchas maneras y por lo tanto interferir en la investigación de estudios que involucran el sistema gastrointestinal produciendo cambios en la fisiología intestinal alterar los resultados de estudios de dieta y nutricionales. El rotavirus de

la rata (RVLA), también es un virus dsRNA en la familia Reoviridae. A diferencia del rotavirus de ratón, RVLA ha sido clasificado provisionalmente como un rotavirus del grupo B que afectan a ratas y humanos. La transmisión es probablemente por contacto directo, con heces contaminadas y fómites. Los signos clínicos se observan en ratas de 1 a 11 días de edad y consisten en crecimiento deficiente, diarrea y dermatitis perianal. Estos signos condujeron a la designación "diarrea infecciosa de ratas lactantes".

Los cambios patológicos incluyen deposiciones acuosas, descoloridas; atrofia vellosa y necrosis epitelial del intestino delgado; mayor profundidad de las criptas; y la formación de células sincitiales.

La infección por RVLA da como resultado un estado de diarrea y absorción deficiente de sodio. Poco se sabe acerca de los mecanismos inmunes en la infección por RVLA, pero es probable haya similitudes con la inmunidad que ocurre en el ratón, entonces además de la inmunidad adquirida, intestinal, están las mucinas que pueden inhibir la replicación del rotavirus.

35.2.6. Norovirus murino (MNV)

Es un Calicivir. Después del descubrimiento del MNV-1, en 2003 se han descrito tres nuevas cepas de MNV: MNV-2; MNV-3 y MNV-4, que son capaces de inducir una infección persistente, mientras que el MNV-1 induce a una infección transitoria. El tropismo celular del norovirus aún no está bien aclarado, aunque hay evidencias de que los enterococos de la porción proximal del intestino delgado representan el sitio de replicación. Los datos recientes reportan que los norovirus son capaces de infectar, específicamente, células inmunes, órganos linfoides, incluyendo placas de Peyer, como se demuestra en ratones, y que también se replican en células presentadoras de antígenos, como células dendríticas, macrófagos y células B. Las partículas virales son altamente resistentes, mantienen la infectividad en pH 2,7 por hasta 3 horas a temperatura ambiente. La viabilidad también se mantiene después del tratamiento con éter 20% a 4 ° C durante 18 horas o aún a la incubación a 60 ° C durante 30 minutos. Las concentraciones de hipoclorito de sodio de 5.000ppm por 1 minuto o 3.000ppm durante 10 minutos se consideraron eficientes en la inactivación de Norovirus, junto con la utilización de glutaraldehído y yodo. Son resistentes a la desinfección por amonio cuaternario, disolventes orgánicos, etanol 75% e hipoclorito de sodio a 300ppm. La irradiación ionizante (ultravioleta) y no ionizante (gamma) mostró inactivar algunos calicivirus, aunque no hay informes específicos de la eficiencia de este método para el norovirus murino (MNV). Los ratones inmunodéficientes

son capaces de hacer la infección persistente con excreción de partículas virales infecciosas por períodos prolongados pero ocurre un clearance viral en ratones inmunocompetentes. La infección por MNV-1 en ratones inmunocompetentes demuestra que el virus es capaz de replicar y diseminar por varios órganos como: bazo, pulmón, hígado y ganglios mesentéricos. En los efectos sobre la investigación se conoce que tiene una alta prevalencia de infección en ratones utilizados en experiencias. En análisis histológicos se observó la presencia de una enteritis ligera, hipertrofia de la pulpa roja y pulpa blanca del bazo e infiltrado inflamatorio en hepatocitos. Es importante destacar que el MNV tiene un tropismo para infectar a los macrófagos y las células dendríticas, y más recientemente se ha informado que infecta las células B. La infección de las células inmunes por lo tanto plantea la posibilidad de que el MNV pueda ser un factor de alteración de resultados en modelos de ratón de enfermedad inflamatoria. La infección de ratones inmunodeficientes con MNV-1 reveló neumonía, hepatitis, encefalitis, meningitis y vasculitis de los vasos cerebrales. En general, las lesiones hepáticas asociadas a MNV son significativas solo en ratones inmunodeficientes.

El virus puede causar infecciones persistentes en ratones de laboratorio y se elimina en las heces por tiempo prolongado. Como se describió anteriormente, la infección por MNV puede alterar algunos modelos de enfermedad en ratones, pero puede tener poco o ningún impacto en otros modelos. Esta respuesta variable puede deberse a una serie de factores que incluyen el modelo de enfermedad particular en estudio o las diferencias en la patogenicidad.

35.2.7. Virus tímico del ratón (MTV)

Se sabe relativamente poco del virus tímico (MTV) debido a la incapacidad de cultivar el virus in vitro.

MTV es considerado un miembro de la familia Herpesviridae y son virus dsDNA. La transmisión es por contacto y vía directa y posiblemente por vía transmamaria. Las infecciones naturales son subclínicas. Los cambios patológicos son limitados a una necrosis linfóide transitoria del timo, ganglios linfáticos y en bazo de ratones neonatales. El timo se ve más gravemente afectado, especialmente los linfocitos T, los linfocitos CD8 son lisados selectivamente por MTV. Los linfocitos T auxiliares y T citotóxicos pueden estar involucrados. El virus también infecta y persiste en las glándulas salivales. Se ha demostrado que la infección por MTV reduce la capacidad de respuesta de las células T. Por lo tanto, las infecciones con este virus podrían interferir temporalmente con el sistema inmunológico.

35.2.8. Reovirus tipo 3 (Reo-3)

Los reovirus de mamíferos están agrupados en los serotipos 1, 2 y 3. El reovirus tipo 3 es el más patógeno de los reovirus de roedores de laboratorio. La importancia primaria del reovirus tipo 3 es como contaminante de trasplante tumoral y de líneas celulares. El Reovirus tipo 3 es un dsRNA de la familia Reoviridae. La transmisión es principalmente a través del contacto directo. Sin embargo, también existe la transmisión del virus por apareamiento aunque no se da por vía transplacentaria. Las infecciones con el Reovirus-3 es casi siempre asintomática. Los efectos de la infección natural con Reovirus tipo 3 se limitan a lisis de tumores ascíticos trasplantables, inhibir la síntesis de ADN celular e inducir apoptosis, causa afluencia de neutrófilos pulmonares y miocarditis aguda. Los ratones atímicos (nu / nu) no son más susceptibles a la enfermedad que los ratones inmunocompetentes. En menor medida, las ratas infectadas con Reovirus tipo 3 desarrollan pancreatitis y efectos similares que en ratones. Los signos clínicos pueden darse en las camadas de crías de ratones infectados con Reovirus tipo 3: retraso del crecimiento, diarrea, pelo hirsuto, alopecia abdominal e ictericia. Los cambios patológicos consistieron en aumento de tamaño de órganos, necrosis hepática; y riñones de color amarillo. La inmunidad a la infección por Reovirus tipo 3 es principalmente humoral pero también involucra a los linfocitos T. Los anticuerpos protectores pueden actuar al menos parcialmente inhibiendo el ingreso y desprendimiento proteolítico intracelular del virión. Una infección natural de Reovirus 3 en roedores de laboratorio podría alterar los estudios intestinales y múltiples funciones de respuesta inmune.

35.2.9. Hantavirus

La Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR) y el Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (SCPH) son enfermedades emergentes transmitidas por roedores que son causadas por los miembros del género Hantavirus, familia Bunyaviridae. Los hantavirus son principalmente transmitidos a humanos a través de la inhalación de aerosoles contaminados provenientes de las excretas de roedores; sin embargo, la transmisión persona a persona también ha sido descrita. El genoma de los hantavirus consiste de tres segmentos de ARN monocatenario de polaridad negativa: largo (L), medio (M) y S (pequeño). Estos segmentos codifican una ARN polimerasa viral, un precursor de glicoproteínas que es procesado en dos glicoproteínas de envoltura (G1 y G2), y una proteína de la nucleocápside (N),

respectivamente. Cada hantavirus esta predominantemente asociado a un huésped roedor específico en una región geográfica determinada; sin embargo, la infección de huéspedes roedores relacionados mediante el fenómeno del *spillover* puede ocurrir. La estrecha asociación entre cada uno de los hantavirus y una especie de roedor particular y el análisis filogenético de los hantavirus sugiere que éstos coevolucionaron con sus huéspedes. Las restricciones geográficas y ecológicas de los roedores divide estos virus dentro de dos grupos filogenéticamente distintos, uno en Eurasia (viejo mundo) asociado con FHSR y el otro en las Américas (nuevo mundo) asociado con SCPH. En Norte y Sur América, estos hantavirus asociados a SCPH incluyen algunos genotipos distintos, donde han sido clasificados en grupos denominados “linajes”.

El primer hantavirus asociado con brotes epidémicos respiratorios agudos fue el virus Sin Nombre (SNV) que apareció en el sudoeste de EE.UU. en 1993. Desde entonces, más de 15 variantes de hantavirus se han notificado en todo el Hemisferio Occidental. En Argentina, los casos de SCPH fueron identificados retrospectivamente a principio de los años 80. Desde entonces, han sido reconocidas tres áreas endémicas de SCPH geográfica y ecológicamente distintas: la zona noroeste subtropical de Orán, entre las Provincias de Salta y Jujuy, cerca de la frontera con Bolivia; la región templada central de las pampas, entre las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Entre Ríos, y la región boscosa y fría de El Bolsón, Provincia de Río Negro en el suroeste Argentino, cerca al rango Andino (Patagonia). Durante la primavera de 1996, un brote importante en El Bolsón, Río Negro, afectó a 18 personas, cuatro de ellas eran médicos que vivían en la zona. Antes que este brote sucediera, un caso fatal de SCPH ocurrió en esta misma región en 1995 y un nuevo hantavirus denominado virus Andes, distinto al virus Sin Nombre, fue parcialmente caracterizado. Durante este brote, los datos epidemiológicos, moleculares y ecológicos confirmaron la transmisión persona a persona, particularmente cuando un médico que habitaba una región no endémica se infectó al estar en contacto con pacientes de SCPH. Esta infección no ha sido previamente notificada con otros miembros del género Hantavirus. Sin embargo, nueva evidencia epidemiológica y molecular apoya la transmisión persona a persona del linaje AND Sout. Desde 1997 hasta 2001, las notificaciones de casos compatibles con SCPH se mantuvieron en un rango de 51 a 82 casos, que ocurrieron particularmente en las provincias de Salta y Jujuy en el noroeste, Santa Fe y Buenos Aires en la zona central, y las provincias de Río Negro, Chubut y Neuquén en el sur. Salta continúa siendo la provincia de Argentina con el número más alto de casos de SCPH notificados por

año, excepto para 1995, cuando un evento de transmisión intrahumana de SCPH que involucró 16 casos ocurrió en el sur de este país. Actualmente, Argentina posee el mayor número notificado de casos de SCPH en las Américas, el cual hasta finales del año 2004 se había incrementado a más de 500 casos, con tasas de letalidad que variaron de acuerdo a la región; norte: 19%; sur (21%) y centro (28.1%). Un incremento en el número de casos de SCPH fue hallado entre 1995 y 1999. Sin embargo, los porcentajes de letalidad identificados durante este período disminuyeron notablemente desde que el primer brote de SCPH fue observado en El Bolsón en 1995. Quizás el número de pacientes curados sería la causa principal de la disminución de las tasas globales de letalidad identificadas durante este período. Hasta 1995, no se habían detectado en Argentina casos de SCPH en niños menores de 12 años. Sin embargo, posteriormente una proporción de casos en niños, mayor que la observada en los EE.UU., ha sido notificada en este país. Los estudios ecológicos y de serovigilancia en roedores del centro de Argentina confirmaron la presencia de anticuerpos para hantavirus en dos especies sigmodontinas: *Akodon azarae* (9.3%) y *Oligoryzomys flavescens* (13.5%) (Tabla 1).

El análisis filogenético del genoma de ARN viral hallado en *A. azarae* y *O. flavescens* determinó la circulación de dos hantavirus previamente conocidos: Pergamino y Lechiguanas, respectivamente. En el noroeste de Argentina se ha hallado evidencia serológica de infección por hantavirus en las dos especies más comunes de roedores atrapadas en todos los hábitat rurales analizados: *Calomys callosus* (5.1%) y *Akodon simulator* (2.8%). Otro estudio genético de muestras de casos de SCPH y roedores positivos en esta área, identificó tres hantavirus diferentes: los anteriormente conocidos virus Bermejo y Orán, y una variante del virus Laguna Negra paraguayo, recuperado por primera vez en Argentina en casos de SCPH y *C. callosus*. Una positividad del 31% hallada en roedores capturados en áreas circunvecinas a la ciudad de Buenos Aires evidenció la circulación del virus Seoul y adicionó más evidencia a la presencia de este virus, detectado por primera vez en la Argentina en los años 80. Aun así, ningún caso de fiebre hemorrágica con síndrome renal ha sido diagnosticado en Argentina. Se han hallado variaciones estacionales en la prevalencia de infección por hantavirus en *O. longicaudatus* del sur de Argentina: 13.7% en la primavera de 1996, 59.3% en el verano de 1996, 2.1% en otoño de 1997, 12.4% en invierno de 1997 y 3.1% en la primavera de 1997.

En la Argentina existirían por lo menos siete genotipos de hantavirus vinculados con diferentes roedores reservorios: Bermejo y Orán en la zona norte; Lechiguanas, Hu39694, Maciel y

Pergamino en la zona central; y Andes en la zona sur. Andes, Lechiguanas, Hu39694 y Orán han sido asociados con enfermedad humana, y los reservorios putativos de tres de estos genotipos son *O. longicaudatus* del sur de Argentina para Andes, *O. longicaudatus* del norte Argentino para Orán, y *O. flavescens* en la región central, para Lechiguanas. Recientemente, el reservorio putativo para el virus Bermejo, *O. chacoensis* fue asociado con enfermedad humana. El reservorio para Hu39694 es desconocido, aunque su similitud genética a los virus Andes, Orán y Bermejo sugiere que podría ser otra especie de *Oligoryzomys* de Argentina central. En la zona central, dos genotipos aún no asociados con SCPH fueron hallados en dos especies sigmodontinas: Maciel, a partir de *Necromys benefactus* (previamente *Bolomys obscurus*), y Pergamino, a partir de *Akodon azarae*. En el centro y sur de Argentina, donde los genotipos Lechiguanas, Hu39694, y Andes son los más importantes, se han identificado seroprevalencias que oscilan entre 0.1% a 1.5%. Contrario a esto, en el norte de Argentina, donde el virus Orán es el genotipo hantaviral más importante, se han registrado seroprevalencias de más del 20%. El análisis filogenético del segmento M del genoma de los siete genotipos de hantavirus circulantes en la Argentina, mostró una diferencia de nucleótidos del 11.5% al 21.8% entre los genotipos de este grupo y de al menos 23.8% respecto al segmento M del genoma de los virus Bayou, Black Creek Canal, y Sin Nombre. Lo anterior indica que todos los hantavirus de la Argentina forman un nuevo linaje que diverge del mismo nudo ancestral que los otros grupos de hantavirus del nuevo mundo transmitidos por roedores sigmodontinos: *Peromyscus*, *Oryzomys*, *Sigmodon* y *Reithrodontomys*. Así, en la Argentina actualmente circulan 6 linajes del virus Andes asociados con enfermedad humana (i) AND Sout, caracterizado a partir de casos del Sur de Argentina y Chile, (ii) AND Nort Orán en las provincias de Salta y Jujuy de Argentina y el sur de Bolivia, (iii) AND Nort Bermejo, en el norte argentino y sur de Bolivia, (iv) AND Cent Bs. As, asociado al 80% de los casos de la provincia de Buenos Aires que incluye al genotipo Hu39694, (v) el linaje AND Cent Lec en las zonas ribereñas de la misma provincia, el cual incluye al genotipo Lechiguanas (LEC), (vi) y un nuevo linaje denominado AND Plata, caracterizado a partir de casos de un lado y otro del Río de la Plata (Argentina y Uruguay). La identidad nucleotídica y de aminoácidos de los linajes del virus Andes oscila entre el 76.5% al 86.6% y del 91.9% al 96.6%, respectivamente. Un estudio reciente informó la existencia de sub-linajes entre los virus AND Nort obtenidos de 18 casos de SCPH, 2 *O. chacoensis* y un *O. flavescens*.

35.2.10. *Helicobacter* spp.

Helicobacter spp. son bacterias gramnegativas que varían en su morfología. Afecta a ratas y ratones. También algunas especies a hámster y meriones. Afecta principalmente a lactantes pero al ser crónico genera lesiones aún en adultos.

La transmisión de *Helicobacter* spp. depende en gran medida de las especies involucradas y de los factores ambientales, incluidas las prácticas de manejo.

La propagación fecal-oral es la vía principal de adquisición natural de infección en roedores. Una vez adquiridas, las infecciones por *Helicobacter* son persistentes, con excreción a largo plazo de los organismos en las heces. Por lo tanto, las infecciones endémicas son muy comunes.

En Canadá, Europa, Asia, Australia y los Estados Unidos poseen un 88% de colonias contaminadas. En Argentina más del 90%.

Aunque la infección por *Helicobacter* puede causar una enfermedad clínica que depende del huésped y es posible que no se reconozca clínicamente. Los efectos de las infecciones por *Helicobacter* no se limitan al sistema gastrointestinal y pueden afectar la reproducción, el desarrollo de cáncer en los órganos gastrointestinales y órganos como las mamas, interfiere en las respuestas a las vacunas y otras áreas de investigación.

H. hepaticus causa de la hepatitis crónica y el carcinoma hepatocelular en ratones ya sea solo o en combinación con otras. También prolapso rectal, colitis e inflamación intestinal.

Helicobacter spp. Además, *H. typhlonius* causa inflamación intestinal en ratones con inmunodeficiencia o defectos en la regulación inmunitaria; *H. muridarum* se ha asociado con gastritis y *H. bilis* se ha asociado con hepatitis y colitis. Aunque, *H. rodentium* parece ser relativamente no patógeno en ratones, infección combinada con *H. rodentium* y *H. typhlonius* da como resultado una alta incidencia de neoplasia asociada a inflamación.

Varios *Helicobacter* spp. (*H. pylori*, *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*) son ureasas positivas, es decir, capaces de producir amoníaco para neutralizar el ácido gástrico, mientras que otras (por ejemplo *H. ganmani*, *H. rodentium*, *H. troglodytes*, *H. typhlonius*, y otros) son ureasas negativas. La producción de ureasa permite que los microorganismos sobrevivan en un ambiente gástrico muy ácido. Un estudio reciente ha demostrado que *H. hepaticus* la ureasa no es necesaria para la colonización intestinal pero promueve la inflamación hepática en ratones. La mayoría de las especies de *Helicobacter* en roedores son ureasas negativas y, por

lo tanto, colonizan preferentemente el intestino, aunque en algunos casos pueden translocarse al hígado y al sistema biliar, el estómago, u otros tejidos.

35.2.11. *Citrobacter rodentium*

Citrobacter rodentium, anteriormente *Citrobacter freundii*, es el agente etiológico de la Hiperplasia colónica murina transmisible. *C. rodentium* es un bacilo gramnegativo, facultativamente anaerobia. Las ratas no son susceptibles a la infección. La transmisión es por contacto directo o a través de alimentos o de lecho contaminado. *C. rodentium* es generalmente un patógeno oportunista. Por ejemplo, el uso de antibióticos efectivos principalmente contra gramnegativos pueden permitir un crecimiento excesivo de *C. rodentium* en el intestino del ratón. Los signos clínicos, cuando están presentes, son inespecíficos; pero puede observarse pérdida de peso, depresión, retraso del crecimiento, tinción fecal perianal y prolapso rectal. Los ratones lactantes son los más susceptibles. Existen diferencias en la susceptibilidad. Los ratones C3H / HeJ son más susceptibles que DBA / 2J, NIH3 (Swiss), o los ratones C57BL / 6J. La infección es transitoria, y no hay estado portador. El sello patológico de lesión por infección por *C. rodentium* es hiperplasia colónica. En general, la porción descendente donde el colon es el más afectado. Sin embargo, todo el colon y el ciego pueden estar involucrados, con elongación de las criptas, mucosa variable, inflamación, abscesos de la cripta, erosiones ocasionales y úlceras e hiperplasia de células caliciformes. En forma transitoria puede darse la colonización de la mucosa del intestino delgado del ratón, seguido de la colonización del intestino grueso. Una vez colonizado, *C. rodentium* provoca lesiones. La infección natural de ratones de laboratorio podría severamente, aunque solo sea de forma transitoria, alterar las citocinéticas intestinales.

35.2.12. *Clostridium piliforme*

Clostridium piliforme anteriormente *Bacillus piliformis*, es el agente causal de la enfermedad de Tyzzer. Es una bacteria gramnegativa, filamentosa, con endospora. La prevalencia sigue siendo alta en colonias de roedores de laboratorio. Posibles explicaciones para esto incluyen la naturaleza moderadamente contagiosa del organismo y la amplia gama de especies huéspedes susceptibles y naturalmente infectados. La transmisión se piensa que es por ingestión de endosporas infecciosas en alimentos o lechos contaminados, como también la esterilización inadecuada de los componentes de alimentación o de cama puede facilitar la

entrada de este patógeno en una colonia de roedores. La mayoría de las infecciones son subclínicas pero bajo estrés se puede precipitar la enfermedad clínica. Los signos clínicos ocurren más comúnmente en roedores lactantes y destetados que incluyen muerte súbita, diarrea acuosa, letargo y pelaje hirsuto. Los cambios patológicos implican tres fases principales. Primero el establecimiento de la infección en el íleon y el ciego, luego la ascensión del patógeno al hígado a través de la circulación portal y la propagación hematógena a otros tejidos como el miocardio. Esta tríada de órganos comprometidos es el sello distintivo de la enfermedad de Tyzzer. En ratones, el intestino afectado es de paredes engrosadas, edematosas e hiperémicas. Los focos necróticos se desarrollan en el intestino afectado, el hígado y el miocardio. Las lesiones son similares en las ratas, excepto que la megaloileitis es un hallazgo común.

Los ratones son más susceptibles y la inmunidad humoral es la más eficaz. Los efectos en la investigación pueden incluir una mayor mortalidad, alteración de la farmacocinética de warfarina y trimetoprima. También alteración de la actividad de las transaminasas hepáticas.

35.2.13. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo que normalmente habita en la nasofaringe, orofaringe y tracto digestivo inferior de muchas especies de vertebrados. La importancia primordial de *P. aeruginosa* es como patógeno oportunista. *P. aeruginosa* se encuentra comúnmente en el suelo y residuos orgánicos y como un habitante normal de la piel. También se aísla frecuentemente de los sistemas de agua y en las instalaciones. Una exclusión activa del organismo de las colonias de animales es alcanzable pero requiere mucho esfuerzo. La transmisión es por contacto con agua contaminada, alimentos, lecho de cama, roedores y humanos infectados.

Los signos clínicos generalmente no se observan en hospedadores inmunocompetentes, aunque la respuesta del hospedador a la infección por *P. aeruginosa* varía entre las cepas de ratones consanguíneos. Por ejemplo, ratones de la cepa BALB / c son resistentes a la infección pulmonar por *P. aeruginosa* mientras que los ratones de la cepa DBA / 2 son susceptibles. Algunos ratones y ratas inmunocomprometidos pueden desarrollar posturas encorvadas, apatía, pelo hirsuto, falta de apetito, emaciación, movimientos circulares alrededor de su eje longitudinal y postura de la cabeza oblicua, y es posible que mueran. La enfermedad clínica se

debe a la invasión de tejidos profundos, resultando en la propagación hematógena de las bacterias a múltiples órganos.

La entrada en el sistema vascular puede ser facilitada por proteasas y bradicininas generadas en focos infecciosos. Las lesiones patológicas se encuentran en los tejidos afectados y constan de necrosis multifocales, formación de abscesos y supuración. Las lesiones suelen ser más graves en los pulmones. Se pueden encontrar lesiones en las válvulas cardíacas de animales con catéteres vasculares infectados. Las infecciones provienen de infecciones inducidas experimentalmente. Estudios de las respuestas inmunes a *P. aeruginosa* presentan evidencia de contribuciones tanto humorales como celulares a inmunidad, que se ve reforzada por la vitamina B2 y IL-1. Las células T-helper (Th1) tipo 1 pueden participar en parte por una hipersensibilidad mediada por TNF- α a *P. aeruginosa*. Los macrófagos y los neutrófilos son células efectoras importantes. Además, las cepas de ratones consanguíneos difieren en la susceptibilidad. Se ha demostrado que los ratones susceptibles tienen un defecto en la producción de TNF- α . Adicionalmente, las cepas de *P. aeruginosa* difieren ampliamente en la virulencia. Los flagelos bacterianos, pioverdina (que puede competir directamente con transferrina para hierro, piocianina, elastasa y potentes exotoxinas) juegan un papel importante en la determinación de la virulencia. La más destacada entre las exotoxinas es exotoxina A. La mayoría de los informes son de infecciones experimentales. Efectos que incluyen muerte prematura después de la exposición a la radiación, tratamiento con ciclofosfamida, infección por CMV, o estrés por frío, o después de un traumatismo de las vías respiratorias; sensibilidad de contacto a la oxazolona; estimulación de la proliferación de células T dentro de los esplenocitos de ratones desnudos; inducción del timo, atrofia por apoptosis; inhibición de la cicatrización de heridas; inactivación de citoquinas por proteasas bacterianas; posible dependencia de células T y supresión del sistema inmunitario. A partir de estos informes, es evidente que una infección natural de ratones y ratas inmunocomprometidos podría afectar a una variedad de proyectos de investigación, dependiendo del órgano o sistemas afectados.

35.2.14. *Salmonella enteritidis*

Salmonella enteritidis y los aproximadamente 1,500 serotipos de esa especie son gramnegativos y no forman endosporas. Son bacterias que colonizan el tracto intestinal de una amplia variedad de hospedadores animales. La importancia primordial de *Salmonella spp.* es como agente zoonótico y como patógeno en ratones y ratas inmunocomprometidos. S.

enteritidis serotipo *typhimurium* es el serotipo más común en roedores de laboratorio, aunque la prevalencia de portadores asintomáticos es desconocida pero probablemente baja. La transmisión es a través de la ingestión de ingredientes alimentarios contaminados y agua. También por contacto con lechos contaminados y personal de instalaciones animales. Los brotes naturales de la enfermedad son raros en la literatura, probablemente porque la mayoría de las infecciones son asintomáticas en ratones inmunocompetentes. Cuando se observan los efectos clínicos, la reproducción se ve más prominentemente afectada, mientras que otros signos son inespecíficos. La diarrea es un hallazgo poco frecuente. El patógeno y los factores ambientales determinan la patología, hallazgos y gravedad de la infección, incluida la edad del huésped y el genotipo. También la flora intestinal; estado nutricional; estado inmune, presencia de infecciones concurrentes; serotipo bacteriano y estresores ambientales como alimentos y agua, encierro, temperatura, deficiencia de hierro, y manipulaciones experimentales. Las cepas de ratones consanguíneos tienen una amplia gama de susceptibilidad a *S. enteritidis*. Las cepas susceptibles incluyen DBA / 1, BALB / c, C57BL / 6 y C3H / HeJ. Las relativamente resistentes son las cepas C3H / HeN, A / J y DBA / 2 (475). La susceptibilidad está determinada por tres loci genéticos distintos. Tras la ingestión, la mucosa y las placas de Peyer en el íleon distal son sitios iniciales de invasión. Desde esos sitios el organismo llega a los ganglios linfáticos mesentéricos y accede al sistema vascular, para ser distribuido por todo el cuerpo. El desarrollo de la lesión depende de la distribución del patógeno. Los órganos más comúnmente infectados incluyen el intestino delgado terminal y el intestino grueso, ganglios linfáticos, hígado y bazo. Los distintivos de la infección incluyen hiperemia local, necrosis focal e inflamación pirogranulomatosa, consistente con enfermedad septicémica; También incluyen hiperplasia en el intestino. En ratones inmunodeficientes se ven más gravemente afectados.

35.2.15. Astrovirus

El astrovirus murino (MuAstV) es una infección generalizada recientemente identificada entre ratones de laboratorio. MuAstV se encuentra predominantemente en el tracto gastrointestinal de los ratones. Los astrovirus son pequeños virus de ARN monocatenario de sentido positivo, sin envoltura que se identificaron por primera vez en 1975 en niños con diarrea y luego se describieron en una amplia variedad de animales. Los astrovirus infectan una amplia gama de especies de mamíferos, como vacas, ovejas, cerdos, pavos, gatos, perros y ratas, que causan diarrea y enteritis autolimitadas o no presentan signos clínicos. Los astrovirus causan

muy poca inflamación y daño celular, y se ha demostrado que la diarrea es causada por la interrupción del complejo de unión estrecha celular en el epitelio intestinal por la proteína de la cápside del astrovirus, generando una mayor permeabilidad intestinal. El mecanismo de aumento de la permeabilidad intestinal asociado con MuAstV se debe probablemente a la ruptura de las células epiteliales intestinales, dado que se ha demostrado que el astrovirus interrumpe la ocludina, la proteína de la unión estrecha, y disminuye el número de fibras de estrés de actina de las células epiteliales intestinales, dando como resultado diarrea. Una infección por astrovirus se asoció con un brote de gastroenteritis en ratones consanguíneos. La diseminación del virus se realiza a través de las heces y hasta 56 días post infección de los animales en caso de ser infectados experimentalmente con una única dosis (hasta 98% de positivos a MuAstV). La alta prevalencia en animales asintomáticos podría sugerir que los ratones podrían portar AstV y desarrollar enfermedades cuando están inmunodeprimidos. La patogenicidad y los patrones genéticos de estos virus no se investigaron más y hasta la fecha no se han documentado informes adicionales en ratones de laboratorio. Recientemente, se identificaron astrovirus en las heces de ratas.

35.2.16. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes ha sido reconocida como un patógeno transmitido por los alimentos en humanos desde la década de 1980, pero aún sabemos muy poco sobre la transmisión oral de *L. monocytogenes* o los factores del huésped que determinan la susceptibilidad a la infección gastrointestinal, debido a la falta de un modelo apropiado de pequeños animales de listeriosis oral. Los primeros ensayos de alimentación sugirieron que muchos animales eran muy resistentes a la infección oral, y pronto se favorecieron las vías de inoculación intravenosa o intraperitoneal más reproducibles. Hay un buen número de estudios publicados anteriormente que utilizan una ruta de infección oral, pero el trabajo varía ampliamente en términos de la elección de la cepa bacteriana, los métodos utilizados para la transmisión oral y diversas manipulaciones utilizadas para mejorar la infectividad. Esta mini revisión resume la literatura publicada utilizando las rutas orales de la infección por *L. monocytogenes* y destaca los avances tecnológicos recientes que hacen de la infección oral un sistema modelo más atractivo. La transmisión de *L. monocytogenes* a través de los alimentos ocurre cuando los alimentos listos para el consumo se contaminan durante el procesamiento, las bacterias se multiplican durante la refrigeración los alimentos se consumen sin calentarlos. Se desconoce la

incidencia real de la infección intestinal, pero la tasa de ataque de los alimentos muy contaminados es probablemente alta. La mayoría de los pacientes no buscan tratamiento médico para la gastroenteritis autolimitada y *L. monocytogenes* no se aísla fácilmente de las heces sin el uso de caldo de enriquecimiento específico. Después de una breve incubación, *L. monocytogenes* puede diseminarse sistémicamente y atravesar la barrera hematoencefálica o la placenta. Un análisis reciente de varios brotes encontró que los síntomas gastrointestinales aparecían dentro de las 24 h posteriores a la ingestión y la bacteriemia ocurría dentro de los 2 días. Sin embargo, tomó un promedio de 9 días para que aparecieran los síntomas del SNC y mucho más tiempo (17 a 67 días) para notificar los casos asociados con el embarazo. Incluso con tratamiento con antibióticos, la forma invasiva de listeriosis tiene una alta tasa de mortalidad, particularmente en individuos inmunodeprimidos. Un modelo animal ideal de listeriosis debería imitar todas las fases de la enfermedad humana. Se prefiere la transmisión oral para permitir la investigación de los factores ambientales que promueven la infectividad, los mecanismos de resistencia del huésped en el intestino y las propiedades de virulencia bacteriana que promueven la colonización y la posterior diseminación. Sólo un pequeño subconjunto de seres humanos expuestos a *L. monocytogenes* desarrollan gastroenteritis, bacteriemia o meningoencefalitis graves; por lo tanto, la propagación sistémica debería ser un paso limitante de la velocidad. Idealmente, los animales resistentes deberían poder contener rápidamente el crecimiento bacteriano, y debería haber un período de retraso antes de que *L. monocytogenes* cruce la barrera hematoencefálica o la interfaz materno-fetal en animales susceptibles.

35.2.17. *Leptospira* spp.

El género *Leptospira*, junto con los géneros *Leptonema* y *Turneriella*, pertenece a la familia Leptospiraceae. Por sus determinantes antigénicos, el género *Leptospira* está constituido por dos especies: *L. biflexa* y *L. interrogans*. *L. biflexa* es una espiroqueta saprofita de vida libre sin capacidad patogénica. Leptospiras patógenas: *Leptospira interrogans*; *Leptospira kirschneri*; *Leptospira noguchii*; *Leptospira alexanderi*; *Leptospira weilii*; *Leptospira alstonii*; *Leptospira borgpetersenii*; *Leptospira santarosai*.

Las leptospiras son organismos muy delgados, difíciles de observar en un microscopio de luz corriente. Aunque se han descrito a más de 200 serotipos de leptospiras, todos ellos tienen características similares. Su característica apariencia es en forma de espiral 6-20 µm de largo y

0.1 μm de diámetro, con una distancia promedio entre crestas consecutivas de unos 0.5 μm . Por lo general, uno o ambos extremos del organismo está curvado en forma de gancho. Por ser tan delgadas, son bacterias que se visualizan con mayor facilidad con un microscopio de campo oscuro. Las leptospiiras son organismos aerobios obligatorios, móviles por el uso de filamentos axiales llamados *axostilo* y se dividen por fisión binaria. En virtud de su estructura en espiral alrededor de su eje axial, puede haber hasta 20 enrollamientos en función de su longitud total. La capacidad de invadir tejidos está también facilitada por la producción de la enzima hialuronidasa, la cual altera la permeabilidad del tejido conjuntivo al hidrolizar el ácido hialurónico.

Las leptospiiras, tanto patógenas como saprotróficas, pueden ocupar diversos ambientes, hábitats y ciclos de vida. Generalmente se reconoce que estas bacterias son virtualmente ubicuas en términos de su distribución geográfica, estando presentes en todo el planeta con excepción de la Antártica. La mayoría de las leptospiiras, sin embargo, son hidrofílicas, es decir, una alta humedad y pH neutral (6.9-7.4) son esenciales para su supervivencia en reservorios naturales en aguas estancadas, pantanos, lagunas, estanques, y charcos, preferidos por las leptospiiras. Se ha implicado con frecuencia a los roedores. Es muy frecuente en ratas, y ratones, los únicos roedores que no contienen esta bacteria son los hámster y de su familia los cuyes. Otros mamíferos (cobayos, caninos y vacunos, por ejemplo) participan en la diseminación de leptospiiras por razón del trofismo del microorganismo por el riñón, liberándose al ambiente en la orina del animal.

Típicamente, las leptospiiras se cultivan a 30 °C en el medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), el cual puede ser suplementado con 0,2-1% de suero de conejo para favorecer el crecimiento de cepas muy exigentes. La proliferación de leptospiiras patógenas en un medio nutritivo artificial, como el medio EMJH, se hace notable a los 4-7 días; el crecimiento de las cepas saprofiticas ocurre a los 2 o 3 días. La temperatura mínima de crecimiento de especies patogénicas es de 13-15 °C. Debido a que la temperatura mínima del crecimiento de las especies saprofiticas es de 5-10 °C, la habilidad de las leptospiiras de proliferar a 13 °C puede ser usada para distinguir entre los organismos patogénicos de las que son flora saprofiticas. El pH óptimo para el crecimiento de leptospiiras está entre 7,2 y 7,6.

Por sus características de aerobiosis, las leptospiiras usa como fuente principal de carbono y energía durante el crecimiento *in vitro* los ácidos grasos de cadena larga, los cuales son metabolizadas por medio de β -oxidación. Los ácidos grasos son suministrados en

medios como el EMJH en la forma de polisorbato. Las moléculas de ácido graso están ligadas a albúmina en EMJH y son lentamente liberadas al medio de cultivo para prevenir su acumulación tóxica.

Como la mayoría de las bacterias, las leptospiros requieren hierro para su crecimiento. *L. interrogans* y *L. biflexa* tienen la habilidad de obtener hierro en diferentes formas. Se requiere de un receptor TonB-dependiente para la utilización de la forma *ferrosa* del hierro, el cual se ha encontrado en *L. biflexa* y un homólogo del receptor es codificado en el genoma del *L. interrogans*. *L. interrogans* puede también obtener hierro del grupo hemo, el cual contiene casi todo el hierro en el cuerpo humano. La proteína de unión a la hemina *HbpA*, que puede estar involucrada con la obtención de hemina, ha sido identificada sobre la superficie de *L. interrogans*. Aunque otras cepas patogénicas de *Leptospira* y *L. biflexa* carecen de *HbpA*, otra proteína de unión a la hemina, *LipL41*, puede ser la que les permita la habilidad de usar hemina como su fuente de hierro. Aunque *L. biflexa* y *L. interrogans* no secreten sideróforos, si tienen la capacidad de obtener hierro de sideróforos secretados por otros microorganismos.

La espiroqueta *Leptospira interrogans* produce la enfermedad de Weil, una enfermedad zoonótica de distribución mundial pero que afecta con más ímpetu a las zonas tropicales y subtropicales y transmitida por la orina de animales salvajes y domésticos, en especial ratas y perros. La infección, en el hombre se produce por contacto directo con la orina o los tejidos del animal infectado o por medio del agua y el suelo contaminados. Se observan ictericia, hemorragia cutánea, fiebre, escalofríos y dolor muscular. Las leptospiros son muy invasivas y difunden por vía sanguínea y asociadas a la endotoxina fibrolisina. En el estado agudo se puede aislar la espiroqueta en la orina y en la sangre. Durante la convalecencia se encuentran anticuerpos. Con mucha frecuencia es confundida con otras enfermedades febriles que por lo general también abundan en las regiones en cuestión, como el dengue y otras enfermedades virales e incluso el resfriado común. Es por ello que el diagnóstico por PCR es confirmatorio debido a su especificidad, capacidad de detectar genomo-especies y rápidos resultados -aproximadamente 3 horas.

La misma sintomatología están presentes en animales, como el perro, búfalo, equinos, vacunos y otros 160 mamíferos. La infección por leptospiros genera inmunidad, sin embargo, por razón de las variaciones en la composición de lipopolisacáridos, refleja una diversidad antigénica entre un serotipo y el otro, incluyendo en la misma especie de leptospiros

patogénicas. Por ello, la inmunidad es específica solo contra el organismo infectante y no contra otros serotipos.

35.2.18. *Giardia muris*

Giardia muris es un flagelado protozoo intestinal. Las infecciones se detectan ocasionalmente en el laboratorio de colonias de roedores. Las cepas de ratones infectados con *G. muris* y las ratas pueden ser específicas del hospedador.

El ciclo de vida es directo. Quistes infecciosos y resistentes al medio ambiente pasan a través de las heces. La infección se produce después de la ingestión. El mínimo de dosis infecciosa para un ratón es de aproximadamente 10 quistes.

Poco después de la infección, los trofozoitos se dividen longitudinalmente y colonizan la superficie de la mucosa del intestino delgado proximal, y se adhiere a las células columnares cerca de las bases de las vellosidades intestinales. Se mueven dentro de la capa de mucina sobre la mucosa. Las infecciones son asintomáticas. Cuando son evidentes, los signos clínicos no son específicos pero incluyen pérdida de peso, retraso en el crecimiento, pelo hirsuto y abdomen agrandado.

En animales huéspedes atímicos o inmunocomprometidos, los signos clínicos pueden ser más graves y puede incluir diarrea y muerte. La eliminación de quistes puede ser por tiempo prolongado. Los cambios patológicos incluyen alteraciones de las vellosidades; aumento en el número de linfocitos intraepiteliales, mastocitos; y alteraciones en la disacaridasa intestinal.

Se han observado diferencias en la susceptibilidad. Son resistentes las cepas de ratón DBA / 2, B10.A, C57BL / 6 y SJL / 2; las cepas relativamente más susceptibles incluyen BALB / c, C3H / He, A / J y Crl: ICR.

Además, los ratones machos arrojan quistes en sus heces por más tiempo que las hembras y los trofozoitos están presentes en sus intestinos por un período más largo que en las hembras. La inmunidad puede celular como mecanismos humorales, con IFN- γ de alguna manera desempeñando un papel en la eliminación de trofozoitos.

Los efectos reportados de *G. muris* incluyen alteraciones en los niveles de disacaridasa intestinal y respuestas inmunitarias de la mucosa intestinal. La infección natural de ratones y ratas de laboratorio con *G. muris* podría interferir con los estudios que involucran el aparato digestivo y sistema inmune.

35.2.19. *Spironucleus muris*

Spironucleus muris (anteriormente *Hexamita muris*) es un segundo protozoo flagelado que infecta comúnmente a los ratones y ratas de laboratorio. Las cepas específicas de hospedante de *S. muris*. La biología de *S. muris* parece ser muy parecido al de *G. muris*; sin embargo, debido a la incapacidad de cultivo de *S. muris*, se sabe mucho menos sobre este organismo. Los quistes infecciosos se pasan en las heces. La dosis infecciosa mínima para un ratón es 1 quiste. Después de la ingestión, se produce una excistación o liberación y los trofozoitos colonizan las criptas de Lieberkuhn en el intestino delgado. Las infecciones por *S. muris* son asintomáticas en ratones y ratas inmunocompetentes, adultos. Sin embargo, los ratones destetados e inmunodeficientes pueden desarrollar síntomas clínicos. Varios investigadores han informado que los ratones jóvenes pueden desarrollar diarrea, deshidratación, pérdida de peso, letargo, distensión abdominal, postura encorvada y puede morir aunque no hay casos reportados.

En ratones atímicos (nu / nu) y letalmente irradiados, *S. muris* causa enteritis crónica severa y pérdida de peso. En infecciones severas, el intestino está enrojecido, lleno de líquido y gas. Las criptas son hiperplásicas y pueden distenderse con los trofozoitos, microvilos y vellosidades pueden acortarse, y enterocitarse. Se ha demostrado que *S. muris* interfiere con la investigación en varias formas, incluyendo el aumento de la gravedad de la infección por copatógenos; aumentando la mortalidad asociada al tratamiento con cadmio; y alterando la función de los macrófagos y la capacidad de respuesta de los linfocitos, mitógenos y toxoide tetánico.

35.2.20. Oxyuriasis

Son gusanos que infectan a los roedores de laboratorio incluyen a *Syphacia muris* en rata y, en ratones, *Syphacia obvelata* y *Aspicularis tetraptera*. También se ha informado que *S. obvelata* infecta a humanos. Los ciclos son directos, con gusanos adultos que habitan el ciego y colon. Los huevos se depositan en la región perianal del huésped. (*Syphacia spp.*) O se excreta con las heces (*A. tetraptera*).

Los huevos son muy ligeros y se aerosolizan, resultando en una generalizada contaminación ambiental. Los huevos embrionados son infecciosos para otro roedor y puede sobrevivir por períodos prolongados a temperatura ambiente. La prevalencia de infección permanece, incluso en colonias de animales bien manejadas. La carga en una población de roedores infectados es

en función de la edad, sexo y estado inmune del huésped. En colonias infectadas enzoóticamente, los animales destetados desarrollan las mayores cargas de parásitos. Los machos están más parasitados que las hembras, y el número de oxiuros disminuye a medida que aumenta la edad del huésped. Mientras que las infecciones suelen ser subclínicas, puede haber prolapso rectal, impactación fecal, poco aumento de peso y pelaje áspero. Las cargas parasitarias pueden provocar enteritis catarral, granulomas hepáticos, e irritación perianal. Los ratones atímicos (nu / nu) son reportados como más susceptible a la infección. La inmunidad es probablemente y principalmente humoral, como para muchas otras helmintiasis. A este respecto, los anticuerpos específicos contra *Sphacia* han sido demostrados en ratones infectados con oxiuros. Hay algunos informes que documentan que los efectos de las lombrices intestinales en la investigación resultan en una producción de anticuerpos significativamente mayor, artritis y electrólito intestinal de transporte deteriorado.

35.2.20. *Cryptosporidium* spp.

Son parásitos protozoarios apicomplexos que infectan a una amplia gama de vertebrados, incluidos los humanos. La criptosporidiosis es aguda y autolimitante en huéspedes inmunocompetentes, pero amenaza la vida en individuos inmunodeprimidos. Los seres humanos y los animales pueden contraer la infección por *Cryptosporidium* a través del contacto directo con personas infectadas o fómites contaminados o por el consumo de alimentos o agua contaminados. Los roedores, que son abundantes y diseminados, se han considerado reservorios de criptosporidiosis en humanos y animales de granja. Estudios previos basados en la morfología de los ooquistes mostraron que muchos roedores silvestres podrían servir como hospedadores de especies similares a *Cryptosporidium parvum* y *C. muris* como parásitos. Las tasas de prevalencia notificadas de *Cryptosporidium* en roedores oscilaron entre el 5,0% y el 39,2%. Cerca de 40 especies de roedores pertenecientes a 11 familias (Sciuridae, Muridae, Cricetidae, Castoridae, Geomyidae, Hystriidae, Erethizontidae, Myocastoridae, Caviidae, Hydrochoeridae y Chinchillidae) han sido reportadas como hospedantes de *Cryptosporidium* spp.

Recientemente, se han utilizado herramientas de genotipificación y subtipificación basadas en PCR para evaluar el potencial infeccioso humano de *Cryptosporidium* spp. en animales y el grado de transmisión entre especies de la criptosporidiosis en animales. Cinco de *Cryptosporidium* especies y casi 20 de *Cryptosporidium* genotipos de estado de las especies

incierto se han identificado en roedores a nivel mundial en estudios recientes. Entre ellos, *C. parvum*, *C. meleagridis*, el genotipo de cervine, *C. muris*, *C. andersoni*, el genotipo I de la ardilla y el genotipo de la mofeta se han asociado con la criptosporidiosis en humanos, aunque las últimas cuatro especies y genotipos son cada uno responsable de solo una o algunos casos. La subtipificación basada en el análisis de secuencia del gen de la glicoproteína de 60 kDa (gp60) se ha utilizado para rastrear la transmisión de seis especies y genotipos de *Cryptosporidium*, incluidos *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. fayeri* y los genotipos de conejo y caballo. Hay al menos 10 familias de subtipos de gp60 de *C. parvum*, dos (IIa y IIc) de las cuales están implicadas en la transmisión zoonótica. En roedores, la infección natural por *C. parvum* es rara, y solo se ha informado de un subtipo de *C. parvum* (IIaA15G2R1) en capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en Brasil.

Hasta hace poco no se ha realizado una caracterización genética de *Cryptosporidium* spp. en roedores en China. A nivel mundial, también existen poca información de datos genéticos de *Cryptosporidium* spp. en roedores mascotas. El propósito de este estudio fue determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* en algunos roedores silvestres, de laboratorio y mascotas en China y evaluar el potencial zoonótico de *Cryptosporidium* spp. de roedores.

35.2.21. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un parásito zoonótico coccidiano intracelular y obligado. Los huéspedes definitivos del parásito son miembros de la familia Felidae (principalmente gatos domésticos) y los huéspedes intermedios son vertebrados de sangre caliente que incluyen humanos, roedores, aves, ganado y mamíferos marinos.

Los felinos con excreción de ooquistes resistentes al medio ambiente son los huéspedes más importantes en el ciclo de vida de *T. gondii*. Los gatos se infectan con *T. gondii* al comer tejidos infectados de huéspedes intermediarios. Mientras se alimentan en el suelo, los roedores pueden infectarse con *Toxoplasma gondii*. La toxoplasmosis es una de las infecciones oportunistas que en personas con inmunocompetencia es en gran parte asintomática, pero en personas inmunodeprimidas, el parásito puede diseminarse ampliamente, causando toxoplasmosis severa. Es muy importante la evaluación de la infección por *Toxoplasma* en los roedores como presa principal para los gatos con un papel clave en la cadena alimentaria ecológica y también en la transmisión de parásitos a otros animales. Estudios en Irán revelaron la existencia de diferentes especies de roedores incluyendo la rata marrón (*Rattus*.

Norvegicus), la rata negro (*R. Rattus*), la rata del Himalaya (*R. angina*), y los ratones casa, *Mus musculus*.

Las pruebas serológicas son el método principal para el diagnóstico de rutina de la toxoplasmosis. La mayoría de las pruebas se basan en la detección de anticuerpos IgM, IgA e IgG específicos contra *Toxoplasma gondii* en inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA). Sin embargo, las pruebas serológicas pueden no detectar anticuerpos específicos contra el *Toxoplasma* durante la fase inicial de la infección porque es posible que no se produzcan anticuerpos hasta que hayan transcurrido varias semanas de parasitemia. Las pruebas también pueden no detectar *T. gondii* infección en pacientes inmunocomprometidos porque los títulos de anticuerpos IgG o IgM podrían no aumentar en estos pacientes. La demostración histológica de taquizoítos de *T. gondii* en cortes de tejido o frotis de fluidos corporales se ha utilizado con éxito para detectar la presencia del parásito en el sistema nervioso central de pacientes con SIDA. Sin embargo, este método requiere antisueros de alta calidad, que no están fácilmente disponibles para los laboratorios de los países en desarrollo. La detección del ADN de *T. gondii* y del parásito mediante métodos moleculares es una herramienta de laboratorio útil para la detección de *T. gondii*, especialmente durante las primeras infecciones agudas.

35.3. Patógenos del Sistema Dérmico

35.3.1. Virus de tumor mamario de ratón

El virus tumoral (MMTV) es un retrovirus ssRNA tipo B de la familia Retroviridae con al menos cuatro variantes principales del virus que se han identificado en ratones de laboratorio, incluyendo MMTV-S ("estándar"), MMTV-L ("bajo oncogénico"), MMTV-P ("embarazo"), y MMTV-O ("oculto"). Más recientemente, hay variantes descritas adicionales, incluyendo MMTV-SW y MMTVC4. Los mecanismos de transmisión difieren entre las principales variantes. MMTV-O es endógeno y el genoma del MMTV-S se transmite a través de la leche, y MMTV-L se transmite a través de células germinales, y MMTV-P se transmite a través de la células germinales. Las células T son necesarias para la transmisión de MMTV transmitido por la leche desde el intestino hasta la glándula mamaria. Las variantes también difieren en la oncogenicidad, con MMTV-S y MMTV-P que son altamente oncogénicos mientras que MMTV-L y MMTV-O lo son menos. El virus, se puede expresar MMTV en tejidos mamarios y muchos otros tejidos, incluyendo tejidos linfoides, o pueden existir como provirus en el ADN del

huésped. Los signos clínicos de infección son los tumores mamarios, que pueden surgir varios meses después de la infección, aunque las metástasis a distancia también pueden ocurrir con posterior compromiso del órgano. La mayoría de los virus inducen tumores que son adenocarcinomas. Se desconoce la inducción tumoral, se cree que MMTV induce nódulos hiperplásicos que eventualmente se vuelven neoplásicos. Las cepas de ratón difieren en su susceptibilidad a MMTV.

La selección de cepa se puede utilizar como medida de control. La inmunidad implica componentes tanto celulares como humorales y las células son los principales objetivos de infección para MMTV. Sin embargo para la infección retroviral productiva, la estimulación de células T a través del superantígeno codificado viralmente (SAg) es necesario. SAg es expresado en linfocitos; se une a las moléculas MHC de clase II y estimula las células T a través de la interacción con el dominio Vb del receptor de células T. También activa las células B, conduciendo a la división celular y diferenciación viral. El MMTV es transmitido por la leche infectada con virus en el intestino hasta el tejido de la glándula mamaria diana; y destruir una gran parte de las células T CD4. Además, MMTV afecta las respuestas de las células T y de las células B, activa NK. Reduce la cantidad de prolactina requerida para provocar la producción de a-lactoalbúmina de las células epiteliales mamarias. MMTV se utiliza como modelo para la carcinogénesis viral. La infección de ratones de laboratorio con MMTV interferirá con estudios de carcinogénesis y resultados en una vida más corta.

35.3.2. *Corynebacterium bovis*

Las corynebacterias son bacilos difteroides grampositivos.

En ratones atímicos hay informes de hiperqueratosis en ratones desnudos infectados naturalmente con *Corynebacterium spp.* O mas presisamente y basado en perfiles bioquímicos es *Corynebacterium bovis*.

La transmisión es por contacto directo, lecho de cama y guantes contaminados.

Los signos clínicos incluyen descamación de la piel, principalmente a lo largo del dorso y, en algunos animales, prurito. La patología se caracteriza como hiperqueratosis ortoqueratósica, queratosis folicular y marcada acantosis. Los ratones desnudos naturalmente infectados con este patógeno serían inadecuados para estudios dermatológicos y posiblemente otros proyectos de investigación.

35.3.3. Acariasis

Mientras muchas especies de ácaros infestan roedores silvestres, solo tres especies de ácaros se encuentran comúnmente en ratones y ratas de laboratorio. *Myobia musculi* y *Myocoptes musculinus* infectan ratones, mientras que *Radfordia affinis* infecta a ratas. Los ratones son mucho más comunes de ser infectados que las ratas. Los ciclos de vida de los tres ácaros son directos, con todas las etapas (huevo, ninfa y adulto) presentes en el huésped. En consecuencia, los ratones sin pelo no son susceptibles. Los ciclos requieren aproximadamente 3 semanas para completarse. La transmisión es a través del contacto directo. Una vez contaminada una instalación, la erradicación de los parásitos es alcanzable pero laboriosa. Los signos clínicos varían en gravedad dependiendo de los factores del hospedador y las especies de ácaros. La cepa C57BL y las cepas relacionadas son más susceptibles a enfermedades graves, debido a reacciones de hipersensibilidad tipo 1. *M. musculi* es considerado el más patógeno de las tres especies porque solo se alimenta de secreciones de la piel y líquido intersticial (pero no de la sangre) mientras que *M. musculinus* y *R. affinis* se alimentan más superficialmente. La infestación puede ser asintomática o puede causar pelo hirsuto; desaliñado; prurito; alopecia en parches que pueden ser extensos. También autotraumatismo hasta el punto de excoiación o amputación; y pioderma secundaria. Las lesiones son más comunes en el dorso, principalmente en la parte posterior del cuello y la región interescapular. Las lesiones patológicas incluyen hiperqueratosis, eritema, infiltración de mastocitos, dermatitis ulcerosa, hiperplasia del ganglio esplénico y ganglio linfático, eventualmente amiloidosis secundaria y comportamiento alterado. También aumentos selectivos de las inmunoglobulinas IgG, IgE e IgA y agotamiento de niveles de IgM e IgG3 en suero; linfocitopenia; granulocitosis; aumento de la producción de IL-4; y disminución de la producción de IL-2.

35.4. Patógenos del Sistema Hematopoyético

35.4.1. Virus de la coriomeningitis linfocitaria

El virus de la coriomeningitis (VMCM) es un virus no citopático. Es un virus ARN de la familia Arenaviridae. La importancia primaria del LCMV es que es una zoonosis y un contaminante de tumores trasplantables y líneas celulares cultivadas. Las infecciones naturales en los ratones con LCMV son poco frecuentes, y se sabe que los hámsters transmiten la infección, aunque también las ratas y muchos otros mamíferos (aves como pollos) también son susceptibles. Como también la implantación de tumores infectados. La transmisión es a través de la

exposición de las membranas mucosas, piel, orina, saliva y leche infectada con el virus, y posiblemente también a través de la ingestión. Además, infecta ovarios y úteros. Los patrones de infección varían según el huésped y el patógeno, en relación a factores como el estrés, la edad del ratón, la dosis del inóculo, la ruta de inoculación y cepa de virus. Los signos clínicos incluyen patrones de una infección tolerante persistente, que sigue con una infección en el útero o en neonatos. La viremia y derramamiento viral es de por vida. Los signos clínicos incluyen retraso del crecimiento inicial y eventual glomerulonefritis inmune acompañada de emaciación, piel rizada, postura encorvada, ascitis y, ocasionalmente, muerte. Características patológicas de este patrón, incluyen IgG, que provienen de la actividad de células B sin cesar, incluida la producción de cantidades patológicas de anticuerpos anti-LCMV, hiperplasia linfoide, y acumulación de linfocitos perivasculares. En contraste, la actividad de las células T está disminuida. Con el tiempo, la tolerancia inmune se descompone, dando lugar a una enfermedad crónica con Infiltración linfocítica y vasculitis generalizada. Otro patrón clínico es el de la infección no tolerante. Esta infección aguda ocurre en ratones postneonatales. Viremia que ocurre sin derramamiento viral. Los ratones infectados mueren y eliminan el virus, frecuentemente sin mostrar signos de enfermedad. Las características patológicas de este patrón incluyen hepatitis necrotizante y depleción linfoide generalizada. La coriomeningitis linfocítica se observa generalmente solo después de una inoculación intracerebral experimental y no es una característica de la infección natural. En una eventual eliminación, los linfocitos intraepiteliales intestinales también son activados. También se induce un anticuerpo específico contra virus. Varios investigadores han reportado los efectos de LCMV en la investigación; sin embargo, casi toda esta información proviene de infecciones experimentales. LCMV ha demostrado alterar la plasticidad sináptica y funciones cognitivas. Causa hepatitis y anemia hemolítica; alteración del comportamiento sistema inmunológico; aumenta la susceptibilidad a otros patógenos, endotoxina bacteriana, y radiación; y altera el curso de tiempo de una diabetes natural. En una infección natural en el laboratorio los ratones pondrían en peligro la salud humana e interferirían con una variedad de esfuerzos de investigación, especialmente aquellos que involucran el sistema inmunológico y sistema nervioso central (SNC).

35.4.2. Virus elevador de la lactato deshidrogenasa

El virus de elevación (LDEV) es un virus ssRNA de la familia Togaviridae. Existen múltiples cepas. Los ratones y los cultivos celulares de ratón son los únicos hospedadores. Las ratas no

son susceptibles. La mayor importancia de LDEV es como contaminante de tumores trasplantables y de inóculos de otros agentes infecciosos. La transmisión es a través del trasplante de tumores contaminados, células o suero, pero también puede ocurrir por contacto directo, heridas por mordeduras y pasaje transplacentario o transmamario; sin embargo, dado el período corto cuando se produce la propagación viral, las últimas rutas son menos importantes. Los signos clínicos se limitan a signos o trastornos neurológicos que se observan en cepas de ratón que han sido inmunosuprimidas. Sin embargo, en general, no hay signos. No se han descrito cambios patológicos en infecciones naturales y el virus se encuentra principalmente en órganos linfoides en infecciones experimentales. La replicación del virus ocurre para un ciclo celular de una pequeña población de macrófagos. El virus está por lo tanto concentrado en órganos con altas poblaciones de macrófagos. Una necrosis tímica transitoria, esplenomegalia y linfocitopenia ocurren en el inicio de las infecciones. El LDEV causa viremia persistente, que induce anticuerpos antivirales y eventualmente, complejos antígeno-anticuerpo circulantes que puede resultar en una glomerulonefritis membranosa leve. El sello de diagnóstico de la infección por LDEV es la elevación de los niveles de lactato deshidrogenasa (LD) en suero, que se produce debido a la reducción de la eliminación de una isozima LD. Niveles de otras enzimas en suero también se elevan aunque no a la misma medida. LDEV altera varias funciones corporales, incluyendo las de macrófagos afectados; provoca aumentos transitorios en la citoquina y actividades receptoras celulares; depresión transitoria de la inmunidad; crecimiento tumoral aumentado (o suprimido) (ambos en espontáneos y trasplantados); supervivencia prolongada de aloinjertos; inmunidad alterada a los copatógenos; aumentos en los niveles de varias enzimas y gamma globulinas en suero; inmunidad humoral alterada; suprime la insulina inducida por estreptozotocina, migración de neutrófilos, desarrollo de anticuerpos y glomerulonefritis. Claramente, la infección de ratones de laboratorio con LDEV podría alterar seriamente los resultados de la investigación, especialmente en casos de estudios de inmunidad. La función del sistema está involucrada, sin ninguna evidencia externa de infección.

35.6. Patógenos del Sistema Nervioso Central

35.6.1. Virus de la encefalomiелitis murina de Theiler

El virus de la encefalomiелitis murina (TMEV) es un virus ssRNA de la familia picornaviridae. TMEV se ha encontrado con poca frecuencia en ratones de laboratorio y aún menos

frecuentemente en ratas. La principal importancia es como un modelo de poliomielitis, esclerosis múltiple y enfermedad desmielinizante inducida por virus. Existen múltiples cepas y se clasifican de acuerdo a la virulencia. El virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) es un patógeno entérico natural de los ratones que se ha demostrado experimentalmente que produce una infección persistente en sistema nervioso central (SNC). En forma experimental produce una la patología similar a la poliomielitis donde se producen cambios en las poblaciones neuronales de la materia gris del SNC (enfermedad temprana). Después de este tiempo, los animales supervivientes desarrollan una infección persistente del SNC. Como consecuencia de la infección, los ratones crónicamente desarrollan infiltrados de células mononucleares en sus leptomeninges, materia blanca y desarrollan lesiones de desmielinización. Puede dars un tipo de infección del SNC (aguda frente o crónica). Se encontró que hay siete cepas de TMEV, los virus GDVII y FA más virulentos y los virus DA, TO4, WW, Yale y BeAn8386 menos virulentos. Los virus GDVII y FA causan regularmente una encefalitis fatal mientras que las demás variantes del virus producían en gran parte infecciones asintomáticas durante el primer mes. Sin embargo, todos los virus persisten en el SNC y los ratones desarrollaron una médula espinal prominente, lesiones leptomeníngeas y de materia blanca, consistentes en inflamación de células mononucleares y desmielinización. Estos cambios patológicos fueron similares a las lesiones descritas en detalle del virus DA. Se muestra la virulencia de las siete cepas de TMEV, GDVII y FA, son por lo menos de 100 a 60000 veces más virulentas que las otras. Debido a que el virus infecta naturalmente la mucosa intestinal, la transmisión es principalmente fecal-oral, aunque la infección no es altamente contagiosa. El derramamiento viral se produce durante aproximadamente 2 meses. Además, se ha documentado la transmisión transplacentaria, como también es posible los cultivos celulares de ratón y rata pueden estar infectados.

En general, no se observan signos clínicos de infección. Sin embargo, la viremia puede diseminar en el virus del intestino a muchos tejidos, incluyendo el hígado, el bazo y el SNC, donde se diseminan a través de la extensión directa y en ocasiones resulta en una parálisis flácida unilateral o bilateral de las extremidades posteriores y, raramente, se observan otros signos neurológicos. La replicación del virus en el SNC de ratones se determinó que para el virus GDVII los ratones infectados con el virus GDVII pueden morir a los 5 a 9 pos infección. Los ratones infectados con el virus DA se mantienen bien durante este período.

Tras la diseminación del virus, que es raro, pero ocurre con mayor frecuencia alrededor de las 6 a 10 semanas de edad, se pueden observar cambios patológicos en la médula espinal y el cerebro que consisten en poliomielitis con necrosis, no supurativa. También meningitis, microgliosis, perivascularitis y desmielinización, posiblemente mediada por linfocitos T CD4, TNF- α e IL-1. Las cepas de ratón difieren en su susceptibilidad a la enfermedad de desmielinización, que generalmente se induce a través de experimentos por inoculación. Además, la inoculación intraperitoneal resulta en miositis aguda que progresa a un proceso inflamatorio crónico en los músculos dando una enfermedad que puede estar mediada por el sistema inmunitario. Las respuestas inmunes del huésped normales a este agente permite la eliminación de esta infección del SNC en el día 21. Por lo tanto, los ratones que tienen este virus presente después de este tiempo pueden considerarse como una infección persistente y por lo tanto, son todos capaces de establecer una infección persistente del SNC en ratones.

Hay evidencia de que la infección no letal no se induce tan fácilmente con virus altamente virulentos, debido a la dificultad de inducir infecciones no letales con dosis bajas de GDVII pero parece que no pueden persistir en el SNC de los ratones. Dos cepas, los virus GDVII y FA, son altamente virulentas y producen encefalitis aguda, pero se eliminó de los sistemas nerviosos de los animales que sobreviven. En contraste, cinco pequeñas cepas menos virulentas, DA, WW, TO4, Yale y BeAn8386 generalmente no producen enfermedad durante el primer mes después de una infección, pero la infección del SNC es persistente y que finalmente resulta en una enfermedad desmielinizante y es menos probable que sean letales.

La eliminación del virus depende de la participación del virus, linfocitos T citotóxicos e IL-2. En infecciones naturales en ratones ha interferido en el estudio de otras infecciones virales. Además, TMEV ralentiza la conducción del motor espinal y potenciales evocados somatosensoriales y podría comprometer estudios que involucren al SNC.

35.7. Patógenos en Múltiples Sistemas

35.7.1. Adenovirus (MAd1 / MAd2)

Los adenovirus de ratón son dsADN. Virus de la familia Adenoviridae. Se han reportado dos cepas, las cepas FL-1 (actualmente MAd-1) y K87 (MAd-2), las cuales son probablemente especies distintas. Generan infecciones en el ratón, el principal huésped, y se ha reportado solo en raras ocasiones infecciones de ratas por serología. La transmisión de ambas cepas es por contacto. MAd-1 tiene un patrón de distribución sistémico y puede ser eliminado en la orina

por hasta 2 años. Esta habilidad de persistir del MAD-1. Los signos clínicos nunca han sido observados durante infección natural con cualquiera de las cepas. Sin embargo, los signos clínicos y / o cambios patológicos en ratones se han observado de manera dependiente de la cepa después de una infección experimental con MAD-1. La infección por MAD-1 tiene tropismo para el SNC y causa una enfermedad fatal en adultos de ratones C57BL / 6 pero no en ratones BALB / c adultos. Los ratones muestran síntomas de enfermedad aguda del SNC, incluidos temblores, Convulsiones, ataxia y parálisis. Examen microscópico de luz del tejido del SNC reveló hemorragias petequiales, edema, neovascularización, e inflamación leve en el cerebro y la columna vertebral. En otros estudios, las lesiones patológicas fueron en los riñones, corazón, bazo, glándulas suprarrenales, páncreas, hígado e intestinos. MAD-2 se puede ser eliminado en las heces durante 3 semanas en ratones inmunocompetentes y durante al menos 6 meses en atímicos. En contraste con MAD-1, la infección con MAD-2 es localizada en el intestino, no causa signos clínicos y da como resultado cambios patológicos que se limitan a inclusiones intranucleares en criptas y vellosidades del intestino delgado. La inmunidad a los adenovirus es principalmente humoral. La infección por adenovirus del ratón, aunque poco frecuente, puede interferir con una variedad de estudios, particularmente aquellos que involucran el sistema nervioso central, renal y gastrointestinal.

35.7.2. Ectromelia virus (viruela del ratón)

El virus de la ectromelia es el agente causal de mousepox. Es un virus dsDNA en la familia Poxviridae. Los ratones son los hospedadores naturales. Las ratas pueden estar infectadas en forma transitoria solamente en ensayos experimentales. Según informes de infección natural en laboratorios de ratones son de baja prevalencia y muy poco frecuente (raros) en los Estados Unidos pero no es así en Europa donde se mencionan más infecciones. Sin embargo, la mousepox clínica fue recientemente reportado en ratones en una instalación del gobierno de los Estados Unidos en ratones habían que habían sido inyectados con suero comercial contaminado. Encuestas serológicas realizadas en los Estados Unidos ocasionalmente revelan ratones seropositivos, confirmando además que el agente está presente en las colonias. La importación de animales y / o tejidos de Europa representan oportunidades adicionales para la introducción en las instalaciones de animales de los Estados Unidos. La transmisión viral es principalmente por contacto directo y fomites, con piel. Las abrasiones que sirven como puerta de entrada. La resistencia a las infecciones con mousepox varía entre las cepas de ratón y

depende de múltiples genes. Las cepas C57BL / 6 y C57BL / 10 son altamente resistente y generalmente no muestra signos de infección. En contraste, C3H, BALB / c, y DBA / 2 están entre las cepas con mayor frecuencia mostrando signos de enfermedad. En esas cepas los signos clínicos son evidentes en casi todos los miembros de la colonia y consisten en hinchazón de los pies, picaduras, letargo, depresión y repentina muerte. Tras la entrada a través de la piel rota, el virus se replica localmente en la piel y en los ganglios linfáticos y luego causa una viremia leve, primaria y se propaga al hígado y al bazo donde se produce una replicación masiva en los macrófagos de estos órganos en una mayor viremia posterior o secundaria. El virus entonces se localiza en muchos tejidos pero más prominentemente en la piel, la conjuntiva y ganglios linfáticos. Los cambios patológicos incluyen necrosis esplénica, ganglionar, tímica y hepática; intestino delgado en forma masiva, como también erosiones en mucosas; e inclusiones citoplasmáticas en la piel e hígado. Las porciones distales de la cola y las extremidades pueden necrosarse y eso da lugar al nombre de ectromelia. El virus persiste durante varios meses en los bazos de ratones infectados, y es diseminado en las heces durante solo unas 3 semanas.

Hay varias cepas con nombre del virus de ectromelia que varían en virulencia, incluyendo NIH-79, Wash-U, Moscú, Hampstead, St. Louis-69, Beijing-70 e Ishibashi I-III. Pero la cepa de Moscú es la más virulenta. La virulencia parece depender de la presencia de una proteína poxvirus. La eliminación del virus por el sistema inmune depende absolutamente de las funciones efectoras de las células T CD8, mientras que las células NK, las células T CD4 y los macrófagos son necesarios para la generación de una respuesta óptima. Como muchos otros poxvirus, el virus de la ectromelia expresa un soluble homólogo del receptor de IFN- γ capaz de inhibir la acción de compuestos antivirales. La gravedad de la enfermedad y el resultado están determinados por factores como la cepa del virus, el genotipo, así como la dosis y la ruta de infección del virus. Los animales de todas las edades son sensibles a la enfermedad, sin embargo, todas las sensibilidades de diferentes líneas de ratón son diferentes. Las cepas resistentes existentes de ratones, como C57BL / 6, C57BL / 10 y AKR, pueden no tener signos clínicos de que los virus pueden causar a otros animales. Es importante tener en cuenta que el fondo genético del ratón puede afectar la infección, lo que significa que los factores del huésped están involucrados en la regulación de la susceptibilidad y la resistencia al virus. Por ejemplo, los ratones salvajes exhiben susceptibilidad variable, mientras que las cepas de laboratorio fueron útiles para determinar los factores de resistencia del huésped. Se cree que la

ruta natural de infección ocurre a través de abrasiones en la piel, lo que significa que la transmisión del virus ocurre de animal a animal o a través de fómites, como camas infectadas en el lugar para mantener a los ratones. La infección se transmite por vía alimentaria, aerógena, por contacto. La enfermedad puede ocurrir latente, aguda y subaguda. Los animales con una forma latente del virus no muestran signos de enfermedad. En este caso, la infección puede ser activada por varios factores, por ejemplo, durante la irradiación, el transporte, la infección con otros patógenos y la carga experimental. Con una forma fulminante, los síntomas clínicos no tienen tiempo para manifestarse, y la muerte de los ratones ocurre inesperadamente y rápidamente. La forma subaguda representa la forma clásica de Ectromelia: en tales casos en animales, principalmente en la cabeza, la cola y las piernas desarrollan lesiones cutáneas. La piel es edematosa, hiperémica, con pequeñas hemorragias focales, que están cubiertas de costras secas. Posteriormente, en los dedos, orejas y cola, se forman focos de necrosis, cubiertos con costras de color marrón oscuro, que luego desaparecen. A veces se produce la amputación de extremidades o falanges de los dedos y la cola, de ahí el nombre de *ectromelia* dado a este virus. Para evitar la infección de la colonia con el virus de la electromelia, es necesario evaluar regularmente la colonia y controlar la salud de los ratones. Para erradicar el virus en la colonia, se debe establecer la cuarentena y detener la reproducción. La vacunación también ayuda a eliminar el problema de la infección por virus. La caja del animal debe limpiarse y desinfectarse a fondo, preferiblemente con formalina gaseosa o peróxido de hidrógeno vaporizado. El virus de Ectromelia puede sobrevivir durante 11 días a temperatura ambiente en la sangre. Todos los demás materiales de la casa de animales deben desecharse como residuos peligrosos (incinerados) o esterilizarse en autoclave. La esterilización en autoclave, el tratamiento con formalina y los desinfectantes comunes inactivarán el virus de la ectromelia, al igual que la desecación o los detergentes. Infecciones natural de ratones de laboratorio con el virus de la ectromelia comprometerá severamente la mayoría de las investigaciones.

35.7.3. Virus Toolan (H1)

El virus H-1 (el virus H-1 de Toolan) es un ssDNA Virus de la familia Parvoviridae. Se sabe relativamente poco de la biología natural del virus H-1. Su prevalencia es baja en ratas que es el hospedador natural, y la infección natural no causa síntomas clínicos. La enfermedad y los efectos en la investigación son pocos. Puede producir malformaciones en el sistema nervioso

central y esquelético de ratas. La transmisión es a través de la exposición a la orina infectada, heces, secreciones nasales, y leche. Durante una infección natural con H-1, el virus no causa enfermedad. Sin embargo, los cambios patológicos observados por inoculación experimental del virus H-1 son evidentes. La infección se deriva de una necesidad de los parvovirus para infectar células en división, en donde genera lisis celular. Los informes de virus H-1 que afectan la investigación son limitados a la necrosis hepatocelular en ratas expuestas a patógenos o productos químicos que causan daño hepático y posiblemente a una reducción de la incidencia de artritis asociada a *Yersinia* aunque en los últimos estudios otros copatógenos también pueden tener estado presente a pesar de la escasez de datos incriminatorios de H-1. En las ratas podría alterar los estudios de desarrollo fetal.

35.7.4. Virus Kilham (KRV)

El virus de la rata Kilham (KRV) es otro Virus ssDNA de la familia Parvoviridae. Más se sabe de la biología natural del KRV que del virus H-1. Al igual que con el virus H-1, las ratas son el huésped natural de KRV. La transmisión es vía directa, contacto con orina infecciosa, heces, secreciones nasales y leche. También por contacto con fomites contaminados. Este último es probablemente más importante que para muchos otros virus de roedores, ya que los parvovirus son altamente resistentes a las condiciones ambientales extremas y son altamente contagiosos. Además, tumores trasplantables y los cultivos celulares pueden infectarse. En las ratas puede permanecer en forma persistente infectando por tiempos variables dependiendo de la edad del animal. Raramente se observan signos clínicos de infección pero se han reportado en ratas con día 13 de gestación en donde las ratas en ese brote tuvieron anomalías reproductivas, incluyendo aumento de las reabsorciones fetales, ataxia, hipoplasia cerebelosa e ictericia de muchos descendientes. En otro informe, se observó cianosis escrotal, hinchazón abdominal, deshidratación y muerte que ocurrió en ratas jóvenes expuestas a adultos serológicamente positivos al virus. Al igual que otros parvovirus, KRV infecta activamente replicando las células y los resultados en la lisis celular y la destrucción del tejido. Por lo tanto, el KRV causa lesiones principalmente durante el desarrollo fetal y vida neonatal. La infección puede persistir por tiempos variables dependiendo en la edad de la rata en el momento de la infección, pero generalmente no dura más de 3 a 4 meses. Las lesiones pueden ocurrir en múltiples órganos, incluyendo el SNC y gastrointestinal y sistema reproductivo; y que consisten en focos necróticos, frecuentemente en el hígado; hemorragia; e hipoplasia. La infección en

ratas de laboratorio se ha reportado que resulta en una teratogénesis y supresión del desarrollo, leucemia murina, alteración de las respuestas de los linfocitos, inducción de la producción de IFN, inducción de diabetes tipo agudo I en ratas BB / Wor resistentes a la diabetes, y alteración del metabolismo lipídico tras la infección in vitro. Por último, el KRV puede alterar la adhesión de los leucocitos al endotelio aórtico de rata y puede reducir la incidencia de artritis asociada a Yersinia, aunque en esos tres estudios otros copatógenos también pueden haber estado presentes. KRV podría profundamente interferir con la investigación que involucra una variedad de sistemas corporales, especialmente si la infección ocurrió durante el desarrollo fetal.

35.7.5. Virus diminuto del ratón (MVM) (ya descripto)

35.7.6. Virus de la hepatitis del ratón (MHV)

El virus de la hepatitis del ratón (MHV) es probablemente el patógeno más importante de los ratones de laboratorio. Las ratas también pueden infectarse pero solo en condiciones experimentales. MHV es un virus ssRNA de la familia Coronaviridae. Es extremadamente contagioso y se transmite principalmente a través de aerosoles, contacto directo, fomites y experimentalmente, a través de tumores transplantables y pasajes transplacentarios. En relación a la susceptibilidad, tropismo tisular, signos clínicos y patológicos; las lesiones dependen de varios factores como hospedadores, ambientales, y patógenos. Aproximadamente 25 cepas fueron aisladas de MHV han sido descritas y han sido clasificadas como respiratorias o enterotrópicas. Recientemente, se reportó un brote de una cepa de MHV altamente hepatotrópica de una colonia de cría de ratones desnudos en Taiwán. La presencia o ausencia del receptor del MHV, una glicoproteína de la familia de antígenos carcinoembrionarios de la superfamilia de Ig determina el tropismo tisular. En las variantes respiratorias (politrópico) las cepas se establecen en la mucosa nasal, descienden a los pulmones, y pueden difundir hematógicamente por todo el cuerpo o ascender a lo largo de las neuronas del SNC. Las lesiones intestinales suelen estar ausente. Las cepas politrópicas incluyen MHV-1, MHV-2, MHV-3, A59, S y JHM. Las cepas enterotrópicas también pueden establecerse en la mucosa nasal o en el tracto intestinal y diseminarse solo localmente al hígado, región abdominal, ganglios linfáticos y, en algunos casos, el SNC.

La infección pulmonar es poco frecuente. Las cepas enterotrópicas incluyen LIVIM, MHV-D y MHV-Y. Mientras que las cepas politrópicas han sido históricamente consideradas más comunes, en otras opiniones se cree que la situación se ha invertido. Las lesiones están presentes por solo 7 a 10 días después de la infección, y son dependientes de la cepa de virus, y se caracterizan por necrosis multifocal. Adicionalmente, la formación de células gigantes sincitiales multinucleadas ocurre y puede estar asociado con la fragmentación y reorganización del aparato de Golgi. Lesiones en la mucosa olfatoria, cerebro, pulmones e hígado se pueden observar en cepas politrópicas, mientras que por lo general, las lesiones del tracto intestinal se deben a cepas enterotrópicas. Las lesiones causadas por cualquiera de las cepas tienden a ser más severas y generalizadas en ratones inmunocomprometidos.

La mayoría de las infecciones siguen uno de tres patrones clínicos y que son: Infección enzoótica (subclínica), comúnmente observada en la reproducción de colonias que ocurre cuando la infección es endémica en la colonia y es mantenida solo por la llegada continua de animales susceptibles que son los recién nacidos. No existe un estado portador, aunque en un estudio reciente se detectó ARN viral en el hígado hasta 60 días después de la infección. Los adultos son asintomáticos, y sus crías se vuelven asintomáticamente infectadas por el tiempo de inmunidad paterna pasivamente transferido que disminuye al destete. Infección epizootica (clínica) que ocurre con menos frecuencia cuando se introduce el patógeno a una colonia limpia y donde las infecciones en adultos suelen ser asintomáticas.

Los signos clínicos dependen del virus y de la cepa de ratón y son más evidentes en ratones lactantes; y es común que presenten diarrea, crecimiento deficiente y muerte. Como la infección se establece en la colonia, el patrón epizootico es sustituido por el patrón enzoótico. Y por último en los ratones inmunodeficientes, como los ratones atímicos (nu / nu), desarrollan un síndrome de desgaste caracterizado por una enfermedad generalizada severa y eventual muerte. La inmunidad al MHV es principalmente mediada pero no completamente por células. Esta inmunidad es parcialmente protectora entre virus que son estrechamente relacionados; y se sabe que involucra a linfocitos T, macrófagos, IFN y células NK. Numerosos informes documentan efectos de infecciones naturales o experimentales por MHV en fisiología e investigación. En ratones inmunocomprometidos, estos efectos incluyen cambios necróticos en varios órganos, incluyendo el hígado, los pulmones, el bazo, intestino, cerebro, ganglios linfáticos y médula ósea; diferenciación de células portadoras de marcadores de linfocitos T; enzima actividad alterada, concentración de bilirrubina, rechazo de tumores de xenoinjerto; y

mielopoyesis hepatoesplénica. En ratones inmunocompetentes, los efectos informados incluyen inmunoestimulación transitoria seguido de inmunodepresión; involución tímica; agotamiento de macrófagos permisivos de LDEV; microcítico anemia y alteraciones en ferroquinética. Disminuye la respuestas proliferativas de linfocitos, secreción de anticuerpos, fagocíticos, actividad, regeneración hepática, producción de células sanguíneas, incidencia de diabetes mellitus en ratones diabéticos no obesos y producción de IFN durante la infección de la SV; cambios apoptóticos en el timo; incremento de la actividad tumoricida de los macrófagos peritoneales, hepáticos, captación de hierro inyectado, susceptibilidad o resistencia a copatógenos, y producción de IFN e IL-12; hepática alterada, ctividad enzimática, comportamiento de los mielomas ascíticos y expresión de marcadores de superficie celular en linfocitos T esplénico, desmielinización nerviosa; deterioro de la médula ósea pre-B y células B. Claramente, la infección por MHV natural de ratones de laboratorio con MHV puede afectar una gran cantidad de estudios científicos y seriamente comprometer el valor de estos animales como sujetos de investigación.

35.7.7. Virus de la sialodacrioadenitis

Virus de la sialodacrioadenitis (SDAV) es un patógeno común, importante y altamente contagioso de ratas de laboratorio. SDAV es un virus ssRNA de la familia Coronaviridae. La transmisión es vía contacto directo y fomites. Los ratones neonatos, pero no adultos inmunocompetentes o scid son susceptibles a la infección experimental y no se ha reportado infección natural de ratones. En el SDAV las infecciones siguen patrones similares a los del MHV, que es otro coronavirus.

La infección enzoótica ocurre en colonias reproductoras y se sostiene solo por la continua introducción de huéspedes susceptibles (recién nacidos). Las ratas lactantes desarrollan conjuntivitis transitoria mientras que las destetadas y los adultos son asintomáticos.

La infección epizoótica ocurre cuando el agente se introduce en una población totalmente susceptible. Los signos clínicos son de nuevo transitorios y pueden variar en gravedad, e incluir edema cervical, estornudos, fotofobia, conjuntivitis, secreción nasal y ocular de porfirina y ulceración corneal y queratocono.

Existen múltiples cepas de SDAV y los tropismos tisulares difieren algo entre las cepas. SDAV tiene un tropismo tisular para las glándulas tubuloalveolares de la serosa. por lo tanto, los cambios inflamatorios consisten principalmente de necrosis difusa que se ven en el lagrimal,

(incluyendo las glándulas de Harder), submandibular, orbital y glándulas salivales. Daños secundarios pueden ocurrir a las estructuras del ojo. Los ganglios linfáticos cervicales y el timo también pueden presentar signos levemente necróticos. Algunas cepas de SDAV afectan el sistema respiratorio, donde los cambios patológicos pueden incluir parches necrotizantes, rinitis, traqueítis, bronquitis y bronquiolitis, con neumonitis multifocal. SDAV causa lesiones respiratorias más graves en el tracto de las ratas LEW que en ratas F344. El virus está presente en los tejidos durante solo 1 semana. No hay estado portador, por lo que los signos clínicos y los cambios patológicos son transitorios. En ratas atímicas, la infección es más grave, es persistente y puede ser fatal. SDAV ha demostrado alterar los ciclos estrales, incrementa la mortalidad embrionaria y postnatal, causa agotamiento del factor de crecimiento epidérmico en glándulas salivales submaxilares. También causa anorexia y pérdida de peso, y reduce la producción de IL-1 por macrófagos alveolares. Adicionalmente, SDAV potencia las lesiones causadas por *M. pulmonis*, de tracto pulmonar o intrapulmonar con enfermedad fatal. En infecciones naturales de ratas de laboratorio con SDAV se esperaría que interfiriera con los estudios que involucran el lagrimal, saliva, sistema respiratorio, ocular, olfativa, reproductiva y los sistemas inmunológicos y también puede interferir en el crecimiento de los recién nacidos infectados.

35.7.8. *Corynebacterium kutscheri*

Corynebacterium kutscheri es un bacilo grampositivo que infecta ratones y ratas. La transmisión es fecal-oral. La cavidad bucal y el intestino grueso, más comúnmente, sirven como sitios de depósito para una etapa de portador latente. Las infecciones naturales suelen ser subclínicas y son reveladas solo por los efectos inmunosupresores de ciertas drogas, manipulaciones experimentales u otros agentes infecciosos. Produce una pseudotuberculosis. Los signos clínicos en ratas, cuando están presentes, suelen incluir disnea con sonidos anormales en los pulmones, pérdida de peso, postura jorobada y anorexia. La propagación hematógena ocurre en ambas especies y explica la formación de abscesos en diversos órganos. En las ratas, los abscesos se desarrollan comúnmente en los pulmones y se extienden a la pleura, mientras que en ratones, los abscesos ocurren con más frecuencia en los riñones y el hígado. Diferencias de susceptibilidad de infección se han reportado en las cepas de ratones C57BL / 6 y B10.BR/SgSn que están entre las cepas más resistentes, mientras que Swiss, BALB / cCr y A / J se encuentran entre las cepas más susceptibles. La

susceptibilidad de la cepa puede reflejar diferencias en la eficiencia de los fagocitos mononucleares o respuestas de citoquinas. Los procedimientos experimentales que causan inmunosupresión en las ratas o ratones puede resultar en el desarrollo no deseado de una infección activa por *C. kutscheri*, que podría comprometer una variedad de estudios, incluidos los de las vías respiratorias.

35.7.9. *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi es un parásito protozoario microsporidio que infecta una amplia gama de hospedadores, incluidos ratones y ratas de laboratorio. Al menos se han identificado tres cepas basadas en la especificidad del huésped y otros criterios. La prevalencia sigue siendo alta en muchos conejos y pueden servir como una fuente de infección para ratones y ratas. En contraste, la prevalencia es baja en los modernas Instalaciones para roedores. El significado principal de *E. cuniculi* en los roedores de laboratorio es como contaminante de tumores trasplantables. Además de los tumores infectados, la transmisión es a través de la exposición a la orina infectada. Tras ingestión, del esporoplasma de las esporas infecciosas ganan entrada al epitelio intestinal del huésped, donde ocurre la multiplicación continua que resulta en la eventual ruptura de la célula huésped, con diseminación a otros órganos, como el cerebro, los riñones, el hígado y los pulmones. La infección suele ser asintomática en roedores inmunocompetentes. Las lesiones se encuentran más comúnmente en los riñones y cerebro. En los riñones, las lesiones consisten en parásitos intracelulares localizados en el epitelio tubular renal y producen inflamación, con eventual destrucción focal de los túbulos y reemplazo por tejido conectivo fibroso que provoca manchas en la superficie renal. En el cerebro, las lesiones consisten en meningoencefalitis. En las ratas, pero no en ratones, también hay inflamación granulomatosa multifocal. Las cepas de ratón difieren en su susceptibilidad a la infección, donde C57BL / 6, DBA / 1 y 129J son muy susceptibles, mientras que C57BL / 10, DBA / 2 y AKR son de susceptibilidad de nivel intermedio y BALB / c, A / J y SJL son relativamente resistentes. En contraste con los ratones inmunocompetentes, atímicos (nu / nu) los ratones experimentan una alta mortalidad con infección con este agente. La infección con *E. cuniculi* aumenta transitoriamente la actividad de las células NK, y la actividad microbicida de los macrófagos puede involucrar nitrito (NO₂). La infección con *E. cuniculi* causa hepatoesplenomegalia con ascitis, altera la arquitectura del cerebro y el riñón. También altera las respuestas del huésped al trasplante de tumores, y reduce las respuestas celulares y

humorales a una variedad de inmunógenos. La infección por *E. cuniculi* de ratones es utilizado como modelo de microsporidiosis humana. La infección de ratones y ratas de laboratorio comprometería los estudios que involucran al sistema gastrointestinal, renal y nervioso central y posiblemente otros.

36. Bibliografía

1. Armitage P, Berry G. Estadística para la investigación biomédica. Doyma, Barcelona, 1992.
2. Ayala M., Laborde JM., Milocco S., Carbone C., Cid de la Paz V., Galosi C. Virus Kilham por la técnica de la inhibición de la hemoaglutinación. Revista Argentina de Microbiología ISSN: 0325-7541, Año 2004. 36: 16-19.
3. Ayala M, Cagliada P, Milocco S, Carriquiriborde M, Gentil F, Laborde JM, Maschi F, Principi G, Carbone C. Estudio de la interferencia causada por *Pseudomonas aeruginosa* en ratones de la cepa BALB/c-CAN. Cg-Foxn1nu trasplantada con la línea tumoral humana A549. Revista Medicina. Buenos Aires Volumen 71 Suplemento III pag: 76, año 2011.
4. Baker, D.G. Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbits and their effects on research. Clin. Microb. Rev., 1998; v.11, n.2, p.231-266.
5. Baker, D.G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. Clin. Microbiol. Rev. 1998, 11, 231–266. [CrossRef].
6. Balls M. The origins and early days of the Three Rs concept. Altern Lab Anim. 2009; 37(3):255-65.
7. Balls M, Parascandola J. The emergence and early fate of the three Rs concept. Altern Lab Anim. 2019;47(5–6):214–20.
8. Bauer BA, Besch-Williford CL, Livingston RS, Crim MJ, Riley LK, Myles MH. 2016. Influence of rack design and disease prevalence on detection of rodent pathogens in exhaust air debris samples from individually ventilated caging systems. J Am Assoc Lab Anim Sci 55:782–788.

9. Bauer BA, Besch-Williford CL, Riley LK. 2004. Comparison of the mouse antibody production (MAP) assay and polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of viral contaminants. *Biologicals* 32:177–182. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2004.08.004>.
10. Bauer BA, Besch-Williford CL, Riley LK. 2004. Comparison of the mouse antibody production (MAP) assay and polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of viral contaminants. *Biologicals* 32:177–182. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2004.08.004>.
11. Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 2012; 483:531–3.
12. Besselsen DG. Detection of rodent parvoviruses by PCR. *Methods Mol Biol.* 1998; 92:31-7.
13. Besselsen DG, Franklin CL, Livingston RS, Riley LK. Lurking in the shadows: emerging rodent infectious diseases. *ILAR J.* 2008; 49(3):277-90.
14. Besselsen DG, Wagner AM, Loganbill JK. 2003. Detection of lymphocytic choriomeningitis virus by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Comp Med* 53:65–69.
15. Bidot WA, Ericsson AC, Franklin CL. 2018. Effects of water decontamination methods and bedding material on the gut microbiota. *PLoS One* 13:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198305>.
16. Blank WA, Henderson KS, White LA. 2004. Virus PCR assay panels: An alternative to the mouse antibody production test. *Lab Anim (NY)* 33:26–32. <https://doi.org/10.1038/labani0204-26>.
17. Bleich, A.; Fox, J.G. The mammalian microbiome and its importance in laboratory animal research. *ILAR J.* 2015, 56, 153–158. [CrossRef] [PubMed]
18. Bleich, A.; Hansen, A.K. Time to include the gut microbiota in the hygienic standardisation of laboratory rodents. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, 35, 81–92. [CrossRef]
19. Bootz F, Kirschnek S, Nicklas W, Wyss SK, Homberger FR. 1998. Detection of Pasteurellaceae in rodents by polymerase chain reaction analysis. *Lab Anim Sci* 48:542–546.

20. Bootz F, Sieber I, Popovic D, Tischhauser M, Homberger FR. 2003. Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious Downloaded from <https://aalas.kglmeridian.com> at 2025-06-30 via free access contamination of biological materials. *Lab Anim* 37:341–351.
<https://doi.org/10.1258/002367703103051895>.
21. Bruggeman CA, Debie WM, Grauls G, Majoor G, van Boven CP. 1983. Infection of laboratory rats with a new cytomegalo-like virus. *Arch Virol* 76:189–199.
<https://doi.org/10.1007/BF01311103>.
22. Buchheister S, Roegener F, Zschemisch N, Talbot SR, Christensen H, Bleich A. 2019. One for two: A novel and highly sensitive virulence factor-based quantitative polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of *Rodentibacter pneumotropicus* and *Rodentibacter heylii* in environmental sample material. *Lab Anim* 54239–250.
<https://doi.org/10.1177/0023677219853600>.
23. Buchheister S, Roegener F, Zschemisch N, Talbot SR, Christensen H, Bleich A. 2019. One for two: A novel and highly sensitive virulence factor-based quantitative polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of *Rodentibacter pneumotropicus* and *Rodentibacter heylii* in environmental sample material. *Lab Anim* 54239–250.
<https://doi.org/10.1177/0023677219853600>.
24. Buer J, Balling R. Mice, microbes and models of infection. *Nature Reviews Genetics*, 2003; 4, 195-205.
25. Cagliada p, Maschi F, Laborde J, Milocco S, Carriquiriborde M, Ayala M, Carbone C. Sentinel program for health monitoring of animals housed in IVC. Congreso SAIC-SAI-SAFE 2016.
26. Carbone, C; Ayala M y Cagliada P (Coordinadores). “Ciencia y Bienestar de los Animales de Laboratorio” Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. EDULP, Editorial de la UNLP. 287 páginas. Edición año 2021. DOI:10.35537/10915/130045
27. Carriquiriborde, JM Laborde, F Gentil, A Resasco, F Maschi, G Principi, C Carbone. Influencia de contaminaciones causadas por microorganismos oportunista en ratones de la

cepa BALB/cFOX1ntrasplantadas con la línea tumoral humana A549. M Ayala, P Cagliada, S Milocco, M Analecta Veterinaria. Vol 33 (2): 5-8. ISSN 1514-2590 electronica, año 2013.

28. Carty AJ. Opportunistic infections of mice and rats: Jacoby and Lindsey revisited. ILAR J 2008;49:272–6.

29. Casebold D, Qian B, Stephensen C. Detection of enterotropic mouse hepatitis virus fecal excretion by polymerase chain reaction. Lab. Anim. Sci. 1997; v.47, n.1, p.6-10.

30. Charles River. 2020. PCR infectious agent testing. [Cited 13 January 2020]. Available at: <https://www.criver.com/productsservices/research-models-services/animal-health-surveillance>

31. Clough G, Gamble MR. Laboratory Animal House: A guide to design and planning of animal facilities. Carshalton, Surrey, Medical Research Center. Laboratory Animal Centre, 1988; p.44 (LACC manual series; m.4).

32. Compton SR, Booth CJ, Macy JD. 2017. Murine astrovirus infection and transmission in neonatal CD1 mice. J Am Assoc Lab Anim Sci 56:402–411.

33. Compton SR, Booth CJ, Macy JD. 2017. Murine astrovirus infection and transmission in neonatal CD1 mice. J Am Assoc Lab Anim Sci 56:402–411.

34. Compton SR, Homberger FR, Paturzo FX, Clark JM. 2004. Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack. Comp Med 54:382–392.

35. Compton SR, Homberger FR, Paturzo FX, MacArthur-Clark J. 2004a. Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack. Comp Med 54:382-92.

36. Compton SR, Macy JD. 2015. Effect of cage-wash temperature on the removal of infectious agents from caging and the detection of infectious agents on the filters of animal bedding-disposal cabinets by PCR analysis. J Am Assoc Lab Anim Sci 54:745–755.

37. Compton SR, Riley LK. 2001. Detection of infectious agents in laboratory rodents: Traditional and molecular techniques. Comp Med 51:113–119.

38. Compton SR, Riley LK. Detection of infectious agents in laboratory rodents: traditional and molecular techniques. Comp Med. 2001; Apr. 51(2):113-9. Comment in: Comp Med. 2001; Apr. 51(2):109.

39. Costa M, Weese JS. 2019. Methods and basic concepts for microbiota assessment. *Vet J* 249:10–15. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.05.005>.
40. Costa M, Weese JS. 2019. Methods and basic concepts for microbiota assessment. *Vet J* 249:10–15. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.05.005>.
41. Curzer HJ, Perry G, Wallace MC, Perry D. The three Rs of animal research: what they mean for the institutional animal care and use committee and why. *Sci Eng Ethics*. 2016;22:549–65.
42. Davidson EW, Jancovich JK, Borland S, Newberry M, Gresens J. 2003. Whats your diagnosis?: Dermal lesions, hemorrhage, and limb swelling in laboratory axolotls. *Lab Anim* 32:23–25. <https://doi.org/10.1038/labani0303-23>.
43. de Bruin WCC, van de Ven EME, Hooijmans CR. 2016. Efficacy of soiled bedding transfer for transmission of mouse and rat infections to sentinels: A systematic review. *PLoS One* 11:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158410>.
44. D el Valle JM, Eisthen HL. 2019. Treatment of chytridiomycosis in laboratory axolotls (*Ambystoma mexicanum*) and rough-skinned newts (*Taricha granulosa*). *Comp Med* 69:204–211. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000090>.
45. Dillehay DL, Lehner ND, Huerkamp MJ. 1990. The effectiveness of a microisolator cage system and sentinel mice for controlling and detecting MHV and Sendai virus infections. *Lab Anim Sci* 40:367–370.
46. Dole VS, Henderson KS, Fister RD, Pietrowski MT, Maldonado G, Clifford CB. 2013. Pathogenicity and genetic variation of 3 strains of *Corynebacterium bovis* in immunodeficient mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52:458–466.
47. Dole VS, Zaias J, Kyricopoulos-Cleasby DM, Banu LA, Waterman LL, Sanders K, Henderson KS. 2011. Comparison of traditional and PCR methods during screening for and confirmation of *Aspiculuris tetraptera* in a mouse facility. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50:904–909.
48. Dubelko AR, Zuwannin M, McIntee SC, Livingston RS, Foley PL. 2018. PCR testing of filter material from IVC lids for microbial monitoring of mouse colonies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 57:477–482. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000008>.

49. D ubelko AR, Zuwannin M, McIntee SC, Livingston RS, Foley PL. 2018. PCR testing of filter material from IVC lids for microbial monitoring of mouse colonies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 57:477–482. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000008>.
50. Effler JC, Hickman-Davis JM, Erwin JG, Cartner SC, Schoeb TR. 2008. Comparison of methods for detection of pinworms in mice and rats. *Lab Anim (NY)*37:210–215. <https://doi.org/10.1038/labani0508-210>.
51. Effler JC, Hickman-Davis JM, Erwin JG, Cartner SC, Schoeb TR. 2008. Comparison of methods for detection of pinworms in mice and rats. *Lab Anim (NY)*37:210–215. <https://doi.org/10.1038/labani0508-210>.
52. Ericsson, A.C.; Davis, J.W.; Spollen,W.; Bivens, N.; Givan, S.; Hagan, C.E.; McIntosh, M.; Franklin, C.L. Effects of vendor and genetic background on the composition of the fecal microbiota of inbred mice. *PLoS ONE* 2015, 10, e0116704. [CrossRef]
53. Ericsson, A.C.; Gagliardi, J.; Bouhan, D.; Spollen, W.G.; Givan, S.A.; Franklin, C.L. The influence of caging, bedding, and diet on the composition of the microbiota in different regions of the mouse gut. *Sci. Rep.* 2018, 8, 4065. [CrossRef] [PubMed]
54. Fahey, J.R.; Olekszak, H. An overview of typical infections of research mice: Health monitoring and prevention of infection. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2015, 5, 235–245. [CrossRef]
55. Fain MA, Karjala Z, Perdue KA, Copeland MK, Cheng LI, Elkins WR. 2008. Detection of *Spironucleus muris* in unpreserved mouse tissue and fecal samples by using a PCR assay. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 47:39–43.
56. FELASA working group on revision of guidelines for health monitoring of rodents and rabbits, Mahler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M. 2014. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 48:178–192.
57. Feldman SH, Ramirez MP. 2014. Molecular phylogeny of *Pseudocapillarioides xenopi* (Moravec et Cosgrove 1982) and development of a quantitative PCR assay for its detection in aquarium sediment. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 53:668–674.

58. Feldman SH, Weisbroth SP, Weisbroth SH. 1996. Detection of pneumocystis carinii in rats by polymerase chain reaction: Comparison of lung tissue and bronchoalveolar lavage specimens. *Lab Anim Sci* 46:628–634.
59. Feng S, Ku K, Hodzic E, Lorenzana E, Freet K, Barthold SW. 2005. Differential detection of five mouse-infecting *Helicobacter* species by multiplex PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:531–536. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.4.531-536.2005>.
60. Fentener Van Vlissingen JM, Borrens M, Girod A, Lelovas P, Morrison F, Torres YS. The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. *Lab. Anim.* 2015 Oct; 49(4):267-83.
61. Fermér C, Lindberg AV, Feinstein RE. 2002. Development and use of a simple polymerase chain reaction assay to screen for *Helicobacter* spp. and *H. hepaticus* in intestinal and fecal samples from laboratory mice. *Comp Med* 52:518–522.
62. Fermér C, Lindberg AV, Feinstein RE. 2002. Development and use of a simple polymerase chain reaction assay to screen for *Helicobacter* spp. and *H. hepaticus* in intestinal and fecal samples from laboratory mice. *Comp Med* 52:518–522.
63. Fontaine CA, Skorupski AM, Vowles CJ, Anderson NE, Poe SA, Eaton KA. 2015. How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ-free mouse unit. *Gut Microbes* 6:225–233. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1054596>.
64. Fornefett J, Krause J, Klose K, Fingas F, Hassert R, Eisenberg T, Schrödl W, Grunwald T, Müller U, Baums CG. 2018. Comparative analysis of clinics, pathologies and immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Streptobacillus moniliformis*. *Microbes Infect* 20:101–110. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.10.001>.
65. Fornefett J, Krause J, Klose K, Fingas F, Hassert R, Eisenberg T, Schrödl W, Grunwald T, Müller U, Baums CG. 2018. Comparative analysis of clinics, pathologies and immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Streptobacillus moniliformis*. *Microbes Infect* 20:101–110. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.10.001>.
66. Fox E, Moen P and Bodnar J. Replication of Minute Virus of Mice DNA in Adenovirus-infected or Adenovirus transformed cells. *Virology*, 2006; 176:403-412.

67. Fredricks DN, Relman DA. 1999. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 29:475–488. <https://doi.org/10.1086/598618>.
68. Fredricks DN, Relman DA. 1999. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 29:475–488. <https://doi.org/10.1086/598618>.
69. Gaertner DJ, Otto G, Batchelder M. 2007. Health delivery and quality assurance programs for mice, p 385–407. In: Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, editors. *The mouse in biomedical research*. Burlington (MA): Academic Press
70. Gerwin PM, Ricart Arbona RJ, Riedel ER, Lepherd ML, Henderson KS, Lipman NS. 2017. Evaluation of traditional and contemporary methods for detecting *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 56:32–41.
71. Goto K, Hayashimoto N, Ishida T, Takakura A, Kagiya N. First trial in the developmental phase of the "performance evaluation program" based on the ICLAS animal quality network program: self-assessment of microbiological monitoring methods using test samples supplied by ICLAS. *Exp Anim*. 2009; 58(1):47-52.
72. Graham ML, Prescott MJ. The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *Eur J Pharmacol*. 2015; 759:19-29. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.040.
73. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eight edition, NRC, The National Academies, USA, 2010 <https://www.aalac.org>
74. Guide for the care and use of laboratory animals eighth edition. 2011
75. Hansen AK, Hansen CHF, Krych L, Nielsen DS. 2014. Impact of the gut microbiota on rodent models of human disease. *World J Gastroenterol* 20:17727–17736. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17727>.
76. Hansen, A.K.; Franklin, C. Microbiota, laboratory animals, and research. *Lab. Anim*. 2019, 53, 229–231. [CrossRef] [PubMed]

77. Hansen, A.K.; Hansen, C.H.; Krych, L.; Nielsen, D.S. Impact of the gut microbiota on rodent models of human disease. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, 17727–17736. [CrossRef] [PubMed]
78. Hansen, A.K.; Krych, L.; Nielsen, D.S.; Hansen, C.H. A review of applied aspects of dealing with gut microbiota impact on rodent models. *ILAR J.* 2015, 56, 250–264. [CrossRef] [PubMed]
79. Henderson KS, Perkins CL, Havens RB, Kelly ME, Francis BC, Dole VS, Shek WR. 2013. Efficacy of direct detection of pathogens in naturally infected mice by using a high-density PCR array. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52:763–772.
80. Henderson KS, Perkins CL, Havens RB, Kelly ME, Francis BC, Dole VS, Shek WR. 2013. Efficacy of direct detection of pathogens in naturally infected mice by using a high-density PCR array. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52:763–772.
81. Hendriksen CF. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Review Vaccines*. 2009; 8(3):313-22.
DOI:10.1586/14760584.8.3.313.
82. Hoggatt J, Hoggatt AF, Tate TA, Fortman J, Pelus LM. 2016. Bleeding the laboratory mouse: Not all methods are equal. *Exp Hematol* 44:132–137.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.10.008>.
83. Hoggatt J, Hoggatt AF, Tate TA, Fortman J, Pelus LM. 2016. Bleeding the laboratory mouse: Not all methods are equal. *Exp Hematol* 44:132–137.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.10.008>.
84. Holman C, Piper SK, Grittner U, et al. Where Have All the Rodents Gone? The Effects of Attrition in Experimental Research on Cancer and Stroke. *PLoS Biol* 2016; 14:e1002331.
85. Hsu CC, Riley LK, Wills HM, Livingston RS. 2006. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. *Comp Med* 56:247–251.
86. Hsu CC, Riley LK, Wills HM, Livingston RS. 2006. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. *Comp Med* 56:247–251.

87. Icenhour CR, Rebholz SL, Collins MS, Cushion MT. 2001. Widespread occurrence of *Pneumocystis carinii* in commercial rat colonies detected using targeted PCR and oral swabs. *J Clin Microbiol* 39:3437–3441. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3437-3441.2001>.
88. Ike F, Bourgade F, Ohsawa K, Sato H, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Takimoto K, Yamada YK, Jaubert J, Berard M, Nakata H, Hiraiwa N, Mekada K, Takakura A, Itoh T, Obata Y, Yoshiki A, Montagutelli X. 2007. Lymphocytic choriomeningitis infection undetected by dirty-bedding sentinel monitoring and revealed after embryo transfer of an inbred strain derived from wild mice. *Comp Med* 57:272–281.
89. Jensen ES, Allen KP, Henderson KS, Szabo A, Thulin JD. 2013. PCR testing of a ventilated caging system to detect murine fur mites. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52:28–33.
90. Jensen ES, Allen KP, Henderson KS, Szabo A, Thulin JD. 2013. PCR testing of a ventilated caging system to detect murine fur mites. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52:28–33.
91. Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O'Keefe S, Mitchel T, Perry T, Kao D, Mason AL, Madsen KL, Wong GK. 2016. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Front Microbiol* 7:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00459>.
92. Karaman, M. "Microbiological Standardization in Small Laboratory Animals and Recommendations for the Monitoring". *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, Volume 6, Number 101, 2014, pp. 673-677(5). 2014 DOI: <https://doi.org/10.4328/JCAM.2195>
93. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010; 8:e1000412.
94. Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS One* 2009; 4:e7824.
95. Körner C, Miller M, Brielmeier M. 2019. Detection of murine astrovirus and *Myocoptes musculus* in individually ventilated caging systems: Investigations to expose suitable detection methods for routine hygienic monitoring. *PLoS One* 14:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221118>.
96. Körner C, Miller M, Brielmeier M. 2019. Detection of murine astrovirus and *Myocoptes musculus* in individually ventilated caging systems: Investigations to expose suitable detection

methods for routine hygienic monitoring. PLoS One 14:1–

12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221118>.

97. Laborde JM, Ayala M, S Milocco, M Carriquiriborde, P Cagliada, F Gentil, C Carbone. Diagnóstico de agentes virales en pellets de materia fecal en ratones de experimentación. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM 2016, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos – CLAMME y la Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y Otras Micobacteriosis (SLAMTB). Rosario, Pcia Sta. Fé, 26 al 30 de septiembre de 2016.

98. Laborde JM, Carriquiriborde M, P Cagliada, S Milocco, M Ayala, V Cid de la Paz, C Galosi, C Carbone. Estudio de la prevalencia de anticuerpos contra el virus diminuto del ratón en colonias de ratones de la República Argentina Revista Medicina. Buenos Aires. Volumen 71 Suplemento III pag: 77, año 2011.

99. Laborde JM, Maschi F, Sguazza H, Cid de La Paz V, Galosi C, Carbone C. Investigación sobre virus diminuto del ratón utilizando las técnicas de nested-PCR e inmunofluorescencia indirecta, a partir de heces y órganos de ratones BALB/c inoculados experimentalmente. Cátedras de Animales de Laboratorio y Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Calle 60 y 118, 1900 La Plata, Bs. As, Argentina. Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. Bs. As. 22 al 24 de septiembre de 2014, ciudad Autónoma de Buenos Aires. First International FESSACAL/SBCAL Meeting. Facultad de Ciencias Farmaceuticas, Universidad de Sao Paulo, Brasil, 4 - 6 de diciembre de 2012.

100. Laborde JM, Sguazza H, Fuentealba N; Carbone C, Galosi C. ELISA simple para la detección de rutina de anticuerpos contra el virus diminuto del ratón (MVM) en colonias de ratones. Revista Argentina de Microbiología. Aceptado para su publicación, año 2017.

101. Laborde JM, Sguazza H, Ayala M, Milocco S, Carriquiriborde M, Cagliada P, Galosi C, Carbone C. Detection of mouse minute virus by Nested Polymerase Chain Reaction. XII Congreso Sociedade Brasileira de Ciencia em Animais de Laboratório. Foz do Iguazú, Brasil, 14 al 16 de marzo de 2012.

102. Laborde JM, Sguazza H, Corva S, Carbone C, Galosi C. ELISA Indirecto para la detección de anticuerpos contra el virus diminuto del ratón en ratones de experimentación. II Congreso

Internacional de la Federación de Sociedades Sudamericanas de Ciencias en Animales de Laboratorio (FESSACAL). IV Congreso Nacional, IV Reunión Científica Regional de la Asociación Argentina de Ciencia y tecnología de los Animales de Laboratorio (AACyTAL). I Simposio de Métodos Alternativos, año 2013.

103. Liang CT, Shih A, Chang YH, Liu CW, Lee YT, Hsieh WC, et al. Microbial contaminations of laboratory mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2009; 48:381–6.

104. Macleod MR, Lawson McLean A, Kyriakopoulou A, et al. Risk of Bias in Reports of In Vivo Research: A Focus for Improvement. *PLoS Biol* 2015; 13:e1002273.

105. Macy JD, Paturzo FX, Ball-Goodrich LJ, Compton SR. 2009. A PCR-based strategy for detection of mouse parvovirus. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48:263–267.

106. Mahabir E, Durand S, Henderson KS, Hardy P. 2018. Comparison of two prevalent individually ventilated caging systems for detection of murine infectious agents via exhaust air particles. *Lab Anim* 53:84–88. <https://doi.org/10.1177/0023677218785929>.

107. Mahler M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning B and Raspa B. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals* 2014, Vol. 48 (3) 178–192.

108. Mahler M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning B and Raspa B. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals* 2014, Vol. 48 (3) 178–192.

109. Mailhoit D, Ost diek AM, Luchins KR, Bowers CJ, Theriault B, Langan GP. 2020. Comparing mouse health monitoring between soiled-bedding sentinel and exhaust air dust surveillance programs. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 59:58–66. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000061>.

110. Mailhoit D, Ost diek AM, Luchins KR, Bowers CJ, Theriault B, Langan GP. 2020. Comparing mouse health monitoring between soiled-bedding sentinel and exhaust air dust

surveillance programs. J Am Assoc Lab Anim Sci 59:58–66. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000061>.

111. Manuel CA, Pugazhenth U, Leszczynski JK. 2016. Surveillance of a ventilated rack system for *Corynebacterium bovis* by sampling exhaust-air manifolds. J Am Assoc Lab Anim Sci 55:58–65.

112. Martinez VP, Bellomo CM, Cacace ML, Suarez P, Bogni L, Padula PJ. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina, 1995-2008. Emerg Infect Dis. 2010 Dec;16(12):1853-60. doi: 10.3201/eid1612.091170. PMID: 21122213; PMCID: PMC3294556.

113. Masopust, D.; Sivula, C.P.; Jameson, S.C. Of mice, dirty mice, and men: Using mice to understand human immunology. J. Immunol. 2017, 199, 383–388. [CrossRef]

114. Metcalf Pate KA, Rice KA, Wrihten R, Watson J. 2011. Effect of sampling strategy on the detection of fur mites within a naturally infested colony of mice (*Mus musculus*). J Am Assoc Lab Anim Sci 50:337–343.

115. Mocho JP. 2016. Three-dimensional screen: A comprehensive approach to the health monitoring of zebrafish. Zebrafish 13 S1:S132–S137. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1200>.

116. Montonye DR, Ericsson AC, Busi SB, Lutz C, Wardwell K, Franklin CL. 2018. Acclimation and institutionalization of the mouse microbiota following transportation. Front Microbiol 9:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01085>.

117. Mueller KF, Briel M, Strech D, et al. Dissemination bias in systematic reviews of animal research: a systematic review. PLoS One 2014; 9:e116016.

118. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washinton, D.C.: National Academy Press, 2011.

119. Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, et al.; FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. Lab Anim. 2002; 36(1):20-42.

120. Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, et al.; FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*. 2002; 36(1):20-42.
121. Nicklas W, Bleich A, Malher M. *The Laboratory Mouse* 2012. Elsevier Ltd. ISBN 9780123820082 DOI: 10.1016/B9780123820082.000192
122. Nicklas W; Bleich A; Mähler M. *Viral Infections of Laboratory Mice. The Laboratory Mouse*. 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved. ISBN 978-0-12-382008-2 DOI: 10.1016/B978-0-12-382008-2.00019-2
123. Ooi JH, Waddell A, Lin Y, Albert I, Rust LT, Holden V, Cantorna MT. 2014. Dominant effects of the diet on the microbiome and the local and systemic immune response in mice. *PLoS One* 9:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086366>.
124. Ouellet M, Cowan M, Laporte A, Faubert S, Heon H. 2011. Implementation of a PCR assay of *Pasteurella pneumotropica* to accurately screen for contaminated laboratory mice. *Lab Anim (NY)* 40:305–312. <https://doi.org/10.1038/labani.1011-305>.
125. Parel JDC, Galula JU, Ooi H. 2008. Characterization of rDNA sequences from *Syphacia obvelata*, *Syphacia muris*, and *Aspiculuris tetraptera* and development of a PCR-based method for identification. *Vet Parasitol* 153:379–383. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.001>.
126. Parker KD, Albeke SE, Gigley JP, Goldstein AM, Ward NL. 2018. Microbiome composition in both wild-type and disease model mice is heavily influenced by mouse facility. *Front Microbiol* 9:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01598>.
127. Parkinson CM, O'Brien A, Albers TM, Simon MA, Clifford CB, Pritchett-Corning KR. 2011. Diagnosis of ecto- and endoparasites in laboratory rats and mice. *J Vis Exp* 5. <https://doi.org/10.3791/2767>.
128. Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim*. 2009; 43(2):165-73. Epub 2008. Nov 17.

129. Rahman MT, Sobur MA, Islam MS, levy S, Hossain MJ, El Zowalaty ME, Rahman AT, Ashour HM. Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*. 2020 Sep 12;8(9):1405.
130. Rausch, P.; Basic, M.; Batra, A.; Bischoff, S.C.; Blaut, M.; Clavel, T.; Glasner, J.; Gopalakrishnan, S.; Grassl, G.A.; Gunther, C.; et al. Analysis of factors contributing to variation in the c57bl/6j fecal microbiota across german animal facilities. *Int. J. Med. Microbiol.* 2016, 306, 343–355. [CrossRef]
131. Regan RD, Fenyk-Melody JE, Tran SM, Chen G, Stocking KL. 2016. Comparison of submental blood collection with the retroorbital and submandibular methods in mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55:570–576.
132. Roble GS, Gillespie V, Lipman NS. 2012. Infectious disease survey of *Mus musculus* from pet stores in New York City. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 51:37– 41.
133. RSPCS, LASA. Guiding principles on good practice for Animal Welfare and Ethical Review Bodies. A report by the RSPCA Research Animals Department and LASA Education, Training and Ethics Section. 2015 http://www.lasa.co.uk/PDF/AWERB_Guiding_Principles_2015_final.pdf.
134. RSPCS, LASA. Guiding principles on good practice for Animal Welfare and Ethical Review Bodies. A report by the RSPCA Research Animals Department and LASA Education, Training and Ethics Section. 2015 http://www.lasa.co.uk/PDF/AWERB_Guiding_Principles_2015_final.pdf.
135. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen, 1959.
136. Sena ES, van der Worp HB, Bath PM, et al. Publication bias in reports of animal stroke studies leads to major overstatement of efficacy. *PLoS Biol* 2010; 8:e1000344.
137. Smith A, Van Den Broek FA, Martorell JC, Hackbarth H, Ruksenas O, Zeller W, et al. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of a FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Lab Anim*. 2007; 41(2):143-60.

138. Strech D, Dirnagl U. 3Rs missing: animal research without scientific value is unethical. *BMJ Open Science* 2019;3:e000035. doi:10.1136/bmjos-2018-000048
139. Strech, D.; Dirnagl, U. 3rs missing: Animal research without scientific value is unethical. *BMJ Open Sci.* 2019, 3, e000048. [CrossRef]
140. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54:120–32.
141. Thoene-Reineke C, Fischer A, Friese C, Briesemeister D, Gobel UB, Kammertoens T, Bereswill S, Heimesaat MM. 2014. Composition of intestinal microbiota in immune-deficient mice kept in three different housing conditions. *PLoS One* 9:1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113406>.
142. Verwer, C.M. "Standardization and the 3Rconcept in Animal Testing Effects and Benefits of Refinement in Two Test Protocols". 2011 Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine ISBN 978-90-393-5640-1
143. Vogt L, Reichlin TS, Nathues C, et al. Authorization of Animal Experiments Is Based on Confidence Rather Than Evidence of Scientific Rigor. *PLoS Biol* 2016; 14:e2000598.
144. Weisbroth, S.H. Post-indigenous disease: Changing concepts of disease in laboratory rodents. *Lab. Anim.* 1996, 25, 25–33.
145. Williams R, Murphy RG, Hughes JM, Hide G. 2005. The urban mouse, *Mus domesticus*, and its role in the transmission of *Toxoplasma gondii* infection, p 357–361. In Lee C-Y, Robinson WH (ed), *Proceedings of the Fifth International Conference on Urban Pests*. International Conference on Urban Pests, UK.
146. Zorn J, Ritter B, Miller M, Kraus M, Northrup E, Brielmeier M. 2016. Murine norovirus detection in the exhaust air of IVCs is more sensitive than serological analysis of soiled bedding sentinels. *Lab Anim* 51:301–310. <https://doi.org/10.1177/0023677216661586>.

Publisher: Eliva Press Global Ltd

Email: info@elivapress.com

e-version

All rights reserved.

Eliva Press is an independent international publishing house established for the publication and dissemination of academic works all over the world. Company provides high quality and professional service for all of our authors.

Our Services:

Free of charge, open-minded, eco-friendly, innovational.

- Free standard publishing services (manuscript review, step-by-step book preparation, publication, distribution, and marketing).
- No financial risk. The author is not obliged to pay any hidden fees for publication.
- Editors. Dedicated editors will assist step by step through the projects.
- Money paid to the author for every book sold. Up to 50% royalties guaranteed.
- ISBN (International Standard Book Number). We assign a unique ISBN to every Eliva Press book.
- Digital archive storage. Books will be available online for a long time. We don't need to have a stock of our titles. No unsold copies. Eliva Press uses environment friendly print on demand technology that limits the needs of publishing business. We care about environment and share these principles with our customers.
- Cover design. Cover art is designed by a professional designer.
- Worldwide distribution. We continue expanding our distribution channels to make sure that all readers have access to our books.
- Marketing tools. We provide marketing tools such as banners, paid advertising, social media promotion and more.