نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۹: ۱۹-۱۱

بررسی آلودگی موش‌های آزمایشگاهی یک مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی به ویروس تیلر عامل انسفالومیلیت

روزبه فلاحی[1*]، فاطمه عابدینی[2]، همایون مهروانی[3]

۱-دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲-استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳-استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۱

چکیده

یکی از توصیه‌های مهم انجمن‌های مرتبط با حیوانات آزمایشگاهی، استفاده از حیوانات با فلور میکروبی مشخص است زیرا که نتایج کار بر روی آنها بایستی تکرار پذیر، مطمئن و قابل تعمیم باشد. بنابراین انجام پایش‌های بهداشتی حیوانات جهت صدور گواهی وضعیت سلامت آنها در مراکز تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی الزامی است. از میان ویروس‌های توصیه شده توسط FELASA ، ویروس تیلر عامل انسفالومیلیت از مهمترین آنها بوده که در این تحقیق به بررسی حضور آن در جمعیت موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH یک مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی پرداخته شده است. روش تحقیق در این بررسی، RT-PCR ، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویروس مورد نظر بوده است. طراحی و تهیه نمونه کنترل مثبت، با استفاده از ترانسفورمیشن پلاسمید حاوی مناسب‌ترین قطعه ژن ویروس در *E.coli* جهت تکثیر ژن بود و سپس استخراج آن صورت گرفت. نمونه‌ها از بافت روده (کولون) حاوی مدفوع حیوانات، تهیه و به روش استاندارد آماده‌سازی و سپس روش RT-PCR انجام گرفت. نتایج نشان می‌دهد تعداد ۱۳ نمونه از ۲۹ نمونه و با میزان شیوع ۴۵٪ در بین موش‌های نژاد NIH مبتلا به این ویروس بوده‌اند. محصول PCR انجام شده تخلیص و تعیین توالی گردید. در بررسی همترازی (alignment) جهت تعیین استرین، با توالی‌های هشت گونه دیگر کسب شده از بانک ژن NCBI مقایسه شد. در درخت فیلوژنی، سویه KX774639 0.15874 متعلق به این تحقیق بیشترین قرابت را، با گونه M20562 از کشور اتریش و گونه NC_001366 از کشور انگلیس نشان داد. از آنجاکه این عفونت قابل انتقال به انسان نیست، حذف فوری کلنی ضرورت ندارد.

کلمات کلیدی: ویروس، تیلر، انسفالومیلیت، موش آزمایشگاهی

*نویسنده مسئول: روزبه فلاحی

آدرس: کرج، صندوق پستی ۳۱۹۷۵/۱۴۸ کدپستی: ۳۱۹۷۶۱۹۷۵۱ موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تلفن: ۰۹۱۲۵۴۰۵۹۷۲

پست الکترونیک: fallahiroozbeh@gmail.com

مقدمه

یکی از مهم‌ترین توصیه‌های سازمان‌ها و انجمن‌های بین‌المللی در رابطه با حیوانات آزمایشگاهی، استفاده از حیوانات تعریف‌شده (gnotobiotic) است، چراکه نتایج کار بایستی قابل تکرار و قابل‌اطمینان و قابل‌تعمیم باشد. براساس توصیه فدراسیون انجمن‌های علوم حیوانات آزمایشگاهی اروپا (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) پایش‌بهداشتی (Health monitoring) حیوانات، جهت صدور گواهی سلامت آنها که مورد درخواست سیستم‌های کیفیت و کنترل کیفی مؤسسات تولیدی و تحقیقاتی می‌باشد، الزامی است. از آنجاکه بسیاری از آلودگی‌های باکتریایی، مایکوپلاسمایی و ویروسی باعث ایجاد واکنش‌های متقاطع می‌شوند و در تست‌های کنترلی مداخله می‌کنند، انجام پایش های بهداشتی باید بصورت دوره‌ای انجام گیرد (۱ و ۲ و ۱۲). ویروس تیلر عامل انسفالومیلیت (Theiler's Encephalomyelitis Virus) از ویروس‌های مهم توصیه شده FELASA است. این ویروس، یک تیلوویروس (Theilovirus) بدون پوشش و با RNA تک‌رشته‌ای از خانواده پیکورناویریده است و بطور معمول موجب آلودگی موش‌ها و رت‌های مراکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی و وحشی می‌شود. بشدت واگیردار است و علائم بیماری می‌تواند بصورت بسیار خفیف، حاد تا انسفالیت مزمن بروز نماید (۱۱). ویروس‌های تیلر عامل انسفالومیلیت موشی به دو گروه سرمی اصلی بنامهای TO (شامل ویروس‌های TO، DA و BeAn8386) و GDVII (شامل ویروس‌های GDVII و FA) تقسیم می‌شوند (۱۰، ۱۱). ویروس‌های DA و BeAn واگیری کمتری دارند ولی موجب آلودگی مزمن در سیستم عصبی مرکزی (CNS) بعضی از نژادهای موش می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که تلقیح این ویروس‌ها به موش‌ها، موجب دمیلینه شدن سیستم CNS می شود. لذا از آنها جهت ایجاد مدلی برای بیماری MS استفاده می‌گردد که نتیجه آن یک بیماری دمیلینه شونده است (۵، ۶، ۱۱، ۱۵، ۱۶، ۲۰). گروه سرمی GDVII به شدت واگیر هستند و موجب بیماری حاد و کشنده پولیوانسفالومیلیت و مرگ و میر بالا در اکثر موش‌های مستعد می‌شوند ولی در حیوانات تلف نشده، علائم دمیلینه مشاهده نمی‌شود و بدون نشان دادن علائم بیماری باقی می‌مانند (۸، ۱۱). ویروس‌های خانواده پیکورناویریده کروی شکلند و قطری حدود ۳۰ نانومتر دارند و از یک لایه پروتئینی فاقد لیپید تشکیل شده‌اند. این ویروس‌ها در حلالهای ارگانیک، غیر فعال می‌شوند. تیلوویروسها نسبت به محیطهای اسیدی مقاوم هستند و به همین دلیل می‌توانند از معده عبور کرده و وارد روده شوند (۷، ۱۰، ۱۱). جوندگان وحشی به عنوان مخزنی برای این ویروس مطرح هستند و باید از ورود این حیوانات به داخل کلنی‌های پرورشی جلوگیری بعمل آید. تشخیص ویروس TMEV با استفاده از آزمون‌های سرولوژی و PCR صورت می‌گیرد. آلودگی موش‌ها به این ویروس بطور بالقوه می‌تواند در نتایج آزمایشات و تحقیقات در زمینه‌های سیستم عصبی، ایمنی و اسکلتی- استخوانی مداخله نماید. در صورت مشاهده آلودگی در کلنی باید از انتقال ویروس از طریق مواد و حیوانات جلوگیری بعمل آید و کلیه فرآورده‌های تولیدی نظیر سلولها و تومورها باید با PCR آزمایش شوند (۴، ۷، ۱۷). از آنجاکه تاکنون استانداردهای بین‌المللی در مورد تعیین آلودگی حیوانات آزمایشگاهی در ایران بدلیل عدم پیروی از مراجع معتبر صورت نگرفته است، در این تحقیق به بررسی آلودگی به ویروسTMEV در کلنی موش‌های

آزمایشگاهی نژاد NIH یک مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی پرداخته شد. موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH، بیشترین مصرف را در کارهای تحقیقاتی به خود اختصاص داده اند (۱). در این تحقیق از روش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای بررسی آلودگی استفاده شد که بعنوان Golden test از سوی FELASA معرفی گردیده است (۱، ۱۲). با پایش بهداشتی، نوع آلودگی تعیین و شدت و میزان آن مشخص و در صورت مواجهه با عوامل بیماریزای خاص، اقدامات کنترلی بصورت جدی بایستی انجام گیرد (۱ و ۲ و ۱۲). با بررسی‌های دقیق صورت گرفته از آنجائی‌که تاکنون هیچگونه تحقیقی بر روی این ویروس در حیوانات آزمایشگاهی ایران گزارش نشده است، لذا این تحقیق می‌تواند در تشخیص این ویروس برای پایش بهداشتی حیوانات آزمایشگاهی موثر باشد.

مواد و روش کار

انتخاب نمونه:

با توجه به دستورالعمل FELASA، با احتساب ۱۰٪ شیوع آلودگی در سطح کلنی حیوانات و با اطمینان ۹۵٪، از کلنی پرورشی، به تعداد ۲۹ نمونه احتیاج است که این تعداد موش آزمایشگاهی نژاد NIH از هر دو جنس از سالن پرورش بصورت تصادفی انتخاب گردید و مورد پایش ویروس TMEV قرار گرفتند. نمونه‌ها از روده (کولون) حاوی مدفوع حیوانات تهیه و به روش استاندارد، آماده‌سازی و سپس روش RT-PCR انجام گرفت (۱۲).

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها:

با رعایت کامل اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی، پس از مرگ آسان موش‌ها (با ترکیب کتامین به میزان ۲۲۵mg/kg و زایلازین به میزان ۳۰mg/kgو تزریق داخل صفاقی)کالبدگشایی ونمونه‌ها از روده (کولون) حاوی مدفوع حیوانات تهیه و به روش استاندارد آماده‌سازی صورت گرفت (۱و۲و ۸).

طراحی و تهیه نمونه جهت کنترل مثبت:

طراحی توالی مناسب و محافظت شده از ویروس Theiler's Encephalomyelitis جهت شناسایی تمامی گونه‌های موجود در بانک ژن صورت گرفت. جهت طراحی پرایمر، از گونه‌های NC_001366.1، JX443418، M20562، HQ652539، EU723238، EU718733، M16020 و NC_001366 موجود در بانک ژن NCBI و نرم افزار Kalign، استفاده گردید. جهت تهیه کنترل مثبت از قسمت 5'-UTR توالی مرجع ویروس Theiler's Encephalomyelitis ثبت شده در بانک ژن (NCBI Reference Sequence: NC_001366.1) به داخل پلاسمید PUC57 و تکثیر آن با ترانسفورمیشن در باکتری *E.coli* استفاده شده است (۱۰، ۱۹). برای این کار از سویه باکتری لیوفیلیزه *E.coli* GM 2163 که در محیط LBB کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۸ ساعت قرار داده شد، استفاده گردید و طبق پروتکل سلول صلاحیت‌دار (Competent cell) از آن تهیه گردید (۳). سنتز ژن و کلون آن در پلاسمید توسط شرکت سیناکلون انجام شد. استخراج پلاسمید توسط کیت GF-1 شرکت Vivantis (cat: GF-PL – 050) خریداری شده از شرکت سینا کلون طبق دستورالعمل ذیل صورت گرفت (۱۹).

استخراج RNA:

استخراج RNA از نمونه‌های تهیه شده از قسمت انتهایی روده (کولون) حاوی مدفوع بر طبق دستورالعمل کیت Dyna Bio(تکاپوزیست) صورت گرفت.

حذف DNA:

حذف DNA طبق دستورالعمل کیت DNaseI خریداری شده از شرکت (Cat Fermentas no:EN0521) صورت گرفت.

تبدیل RNA به cDNA:

تبدیل RNA به cDNA طبق پروتکل کیت (Viva 2 steps RT-PCR kit, cat no RTPL12) خریداری‌شده از شرکت Vivantis صورت گرفت.

انجام PCR :

از پرایمر (Primer F:5-GTCTAAGCCGCTT/CGGAATA-3 و Primer R:5-CAAAAGCCACGTGGATAAGAT-3، PCR Template=259bp) استفاده گردید. انجام PCR در دستگاه Thermocycler gradiant Eppendorf انجام گرفت. واکنش با یک حجم نهایی ۲۵ µl انجام گردید و محلول‌های به کار رفته و غلظت آنها مطابق جدول ۱ بود. بعد از انجام PCR، تخلیص محصول انجام گرفت.

جدول ۱: اجزای مختلف PCR (۱۸).

غلظت مواد به کار رفته	حجم به کار رفته
PCR buffer $_{10\,X}$	۲/۵ میکرولیتر از غلظت نهایی 1X
dNTP mix (۱۰ mM)	۰/۵ میکرولیتر از غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار
F- Primer (۱۰ µM)	۱ میکرولیتر از غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار
R- Primer (۱۰ µM)	۱ میکرولیتر از غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار
Taq (۱ U)	۰/۱۲۵ میکرولیتر
$MgCl_2$ (۲۵mM)	۲ میکرولیتر از غلظت نهایی ۲ میکرومولار
Template DNA	۱ میکرولیتر
آب مقطر دو بار تقطیر	۱۶/۸۷۵ میکرولیتر
مقدار کل	۲۵ میکرولیتر

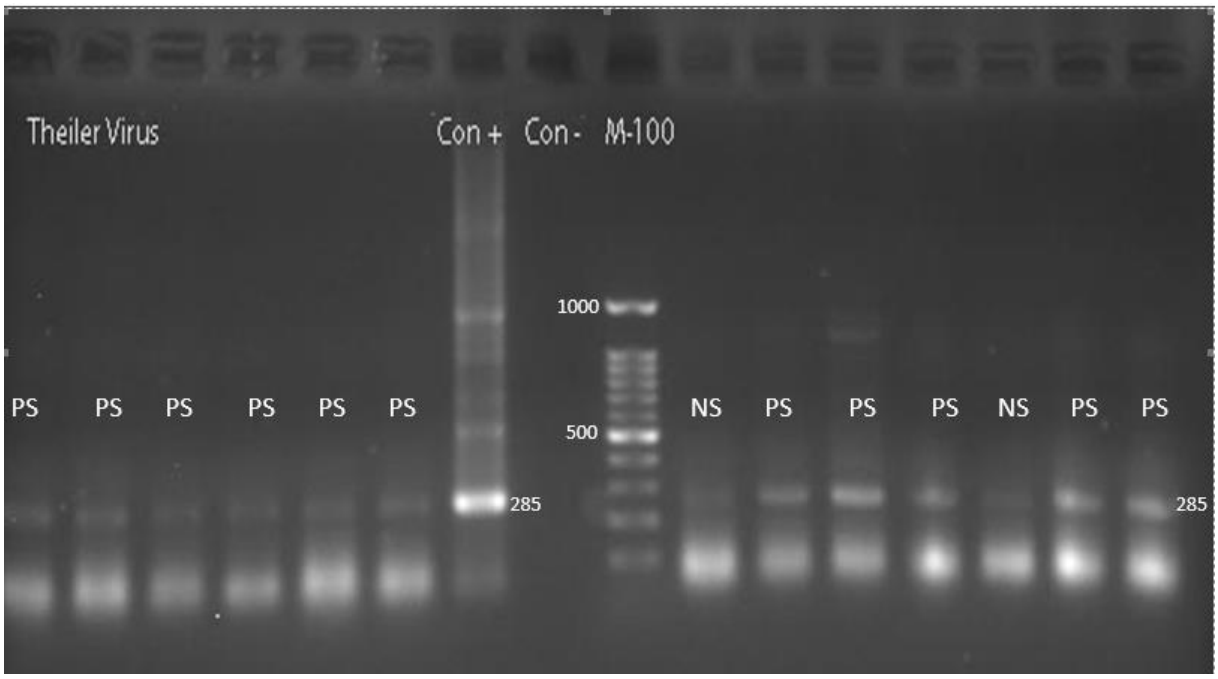
پس از بهینه‌سازی شرایط مطلوب برای PCR، بهترین شرایط به شرح ذیل بدست آمد: Initial Denaturation با دمای ۹۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل بعدی بصورت Denaturation با دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing با دمای ۵۷ درجه به مدت ۱ دقیقه، Extending با دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و Final Extending با دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه (۱۸).

الکتروفورز:

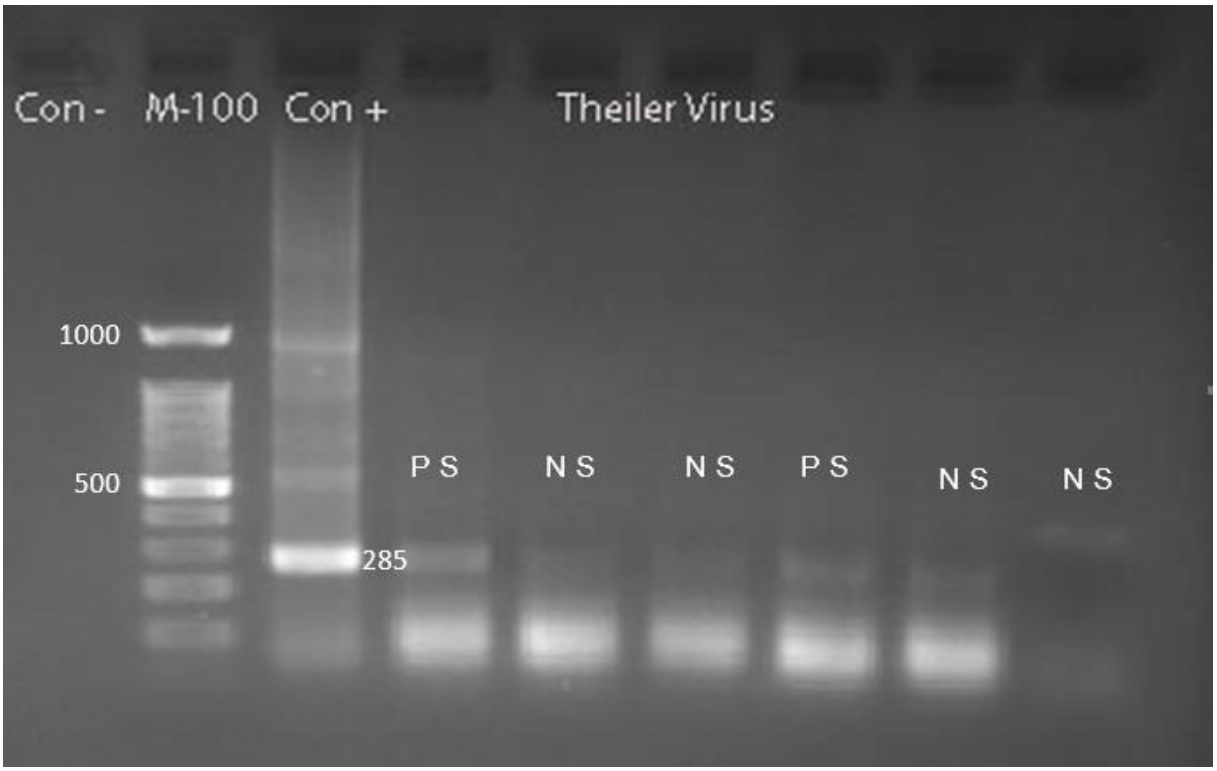
۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر لودینگ بافر به خوبی مخلوط و به داخل چاهک های ژل آگارز ۱/۷ ٪ که به آن اتیدیوم بروماید اضافه شده، افزوده و سپس الکتروفورز گردید. از DNA marker، 100 bp استفاده شد. پس از پایان زمان الکتروفورز ژل بر روی دستگاه UV-Transilluminator قرار داده و مورد بررسی و عکس برداری قرار گرفت (۱۸).

نتایج

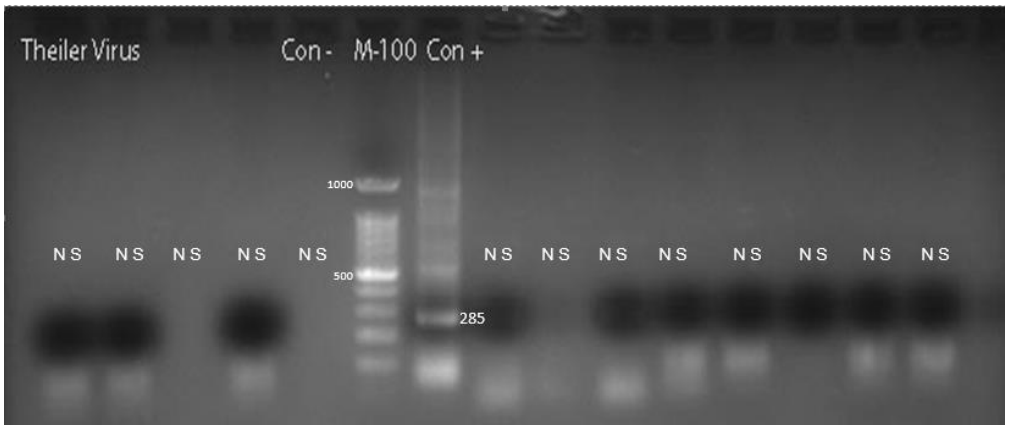
در ۱۳ نمونه از ۲۹ نمونه، آلودگی به ویروس تیلر عامل انسفالومیلیت موشی مشخص گردید. بنابراین میزان شیوع در بین موش‌های NIH آن مرکز ۴۵٪ است (شکل های ۳-۱).



شکل۱: تصویر الکتروفورز ژل آگارز محصول RT-PCR ژن ThVgs1 gene ویروس Theiler's Encephalomyelitis (مارکر ۱۰۰ جفت بازی= M-100 PCRBIO Ladder IV DNA Marker- 100 bp (Arian Gene Gostar)، کنترل منفی= -Con، کنترل مثبت= +Con، نمونه های منفی= NS ، نمونه های مثبت= PS)



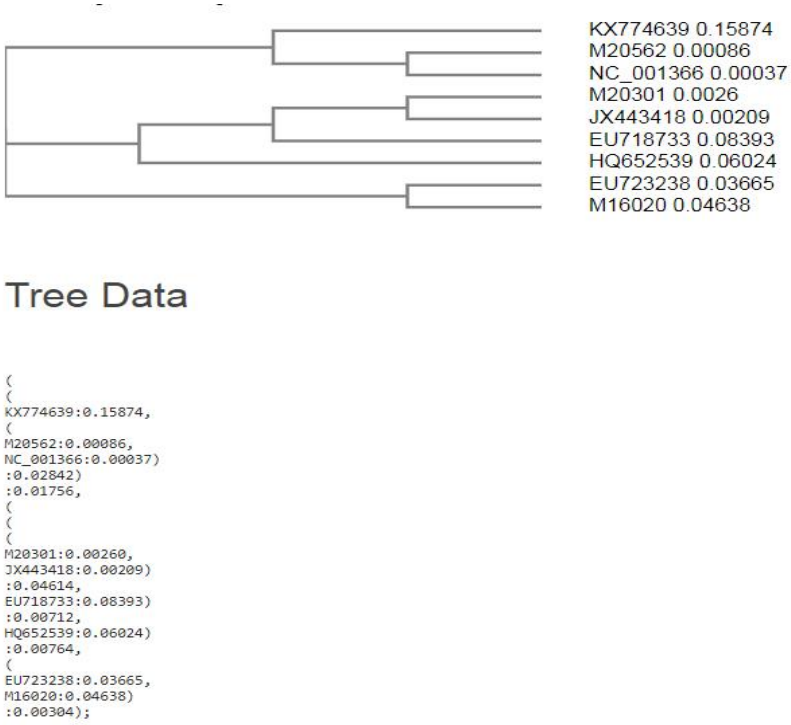
شکل۲: تصویر الکتروفورز ژل آگارز محصول RT-PCR ژن ThVgs1 gene ویروس Theiler's Encephalomyelitis (مارکر ۱۰۰ جفت بازی= M-100 PCRBIO Ladder IV DNA Marker- 100 bp (Arian Gene Gostar)، کنترل منفی= -Con، کنترل مثبت= +Con، نمونه های منفی= NS ، نمونه های مثبت= PS)



شکل۳: تصویر الکتروفورز ژل آگارز محصول RT-PCR ژن ThVgs1 gene ویروس Theiler's Encephalomyelitis (مارکر ۱۰۰ جفت بازی= M-100 PCRBIO Ladder IV DNA Marker- 100 bp (Arian Gene Gostar)، کنترل منفی= -Con، کنترل مثبت= +Con، نمونه های منفی= NS ، نمونه های مثبت= PS)

درخت فیلوژنی:

جهت انجام مطالعات فیلوژنتیک هر نمونه مثبت ۳ بار تست شد که جواب هر ۳ بار برای تمام نمونه‌ها مشابه بود. بنابراین یک محصول PCR انجام شده جهت انجام تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال و توسط شرکت BIONEER تخلیص و تعیین توالی گردید. بررسی همترازی (alignment) جهت تعیین استرین، از طریق سایت EMBL-EBI و برنامه Klign انجام گرفت و با توالی‌های هشت گونه دیگر کسب شده از بانک ژن NCBI مقایسه شد. در درخت فیلوژنی زیر، سویه KX774639 0.15874 متعلق به این تحقیق و سایر گونه‌ها بترتیب M20301، JX443418، M20562، HQ652539، EU723238، EU718733، M16020 و NC_001366. می‌باشند. بیشترین قرابت سویه بدست آمده در این تحقیق، با گونه M20562 از کشور اتریش و گونه NC_001366 از کشور انگلیس نشان داده است. میزان قرابت در درخت فیلوژنی آمده است (شکل ۴).



شکل٤: درخت فیلوژنی سویه تشخیص داده شده در این تحقیق (KX774639 0.15874) همانطور که در تصویر آمده است، بیشترین قرابت با گونه M20562 از کشور اتریش و گونه NC_001366 از کشور انگلیس دیده می شود.

بحث و نتیجه‌گیری

براساس توصیه فدراسیون انجمن‌های علوم حیوانات آزمایشگاهی اروپا، پایش بهداشتی حیوانات جهت صدور گواهی سلامت آنها الزامی است. برطبق توصیه‌های این فدراسیون عوامل محیطی، فاکتورهای ژنتیکی و عوامل عفونت‌زا به‌طور مستقیم در سلامت حیوانات آزمایشگاهی و در نهایت در کارهای تحقیقاتی صورت گرفته بر روی آن حیوانات تأثیر می‌گذارند. بسیاری از عوامل عفونت‌زا در حیوانات آزمایشگاهی باعث ایجاد عفونت در انسان می‌شوند و زئونوز هستند. بنابراین با دلایل ذکر شده انجام برنامه‌های پایش بهداشتی ضروری است. هزینه اقدامات پیشگیرانه و نیز اجرای برنامه‌های پایش بهداشتی ممکن است زیاد به‌نظر برسد، ولی نسبت به هزینه کلی تحقیقات بسیار ناچیز است. اینکه حیوانات آزمایشگاهی باید عاری از عواملی باشند که ممکن است در نتیجه پژوهش تأثیر منفی بگذارند مهم است ولی پاک بودن آنها از تمام میکروارگانیسم‌ها ضرورتی ندارد. سیستم‌های مبتنی بر قفس‌های روباز نسبت به سیستم‌های بسته نظیر قفس‌های با تهویه مجزا (IVC) بسیار بیشتر در معرض مواجهه با عوامل عفونی و آلرژی‌زا هستند. لذا انجام پایش‌های بهداشتی در آنها ضرورت بیشتری دارد (۲، ۹، ۱۳). بررسی وجود آنتی‌بادی‌های عوامل بیماریزا در سرم خون حیوانات آزمایشگاهی نشان‌دهنده وقوع عفونت قبلی در آنها می‌باشد (۱۳). موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH بیشترین استفاده را در تحقیقات بیولوژیکی دارند. لذا استاندارد کردن

روش‌های تشخیصی جهت انجام آزمایشات مستمر و دوره‌ای در مراکز پرورش این نژاد ضرورت دارد. در مراکز اصلی پرورش حیوانات آزمایشگاهی ایران با وجود پیشرفت‌هایی که در طراحی و روش‌های پرورش حاصل شده است ولی هنوز شیوع بعضی از عفونت‌ها به ویژه عفونت‌های باکتریایی و ویروسی دیده می‌شود. اگرچه در بسیاری از موارد این عفونت ها تحت بالینی هستند ولی می‌توانند در نتایج تحقیقات و تست‌هایی که بر روی این حیوانات انجام می‌شود تأثیر منفی بگذارند (۲ و ۱۲). امروزه در مراکز بزرگ تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، انجام آزمایش تشخیص ویروس Theiler's Encephalomyelitis به روش PCR هر شش هفته انجام می‌شود (۲ و ۱۳). در ایران تاکنون هیچگونه تحقیقی در مراکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی بر روی ویروس تیلر انجام نشده بود. در این تحقیق مشخص گردید که آلودگی به این ویروس در کلنی موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH در سیستم متعارفی به میزان ۴۵٪ وجود دارد. با وجود پیشرفت‌هایی که در طراحی و روش‌های پرورش مراکز خصوصاً در آن مرکز صورت گرفته ولی شیوع این عفونت ویروسی بالا است. از آنجاکه این عفونت قابل انتقال به انسان نیست، حذف فوری کلنی ضرورت ندارد. بر طبق دستورالعمل FELASA براساس نیازهای انفرادی و محلی، ملاحظات کارهای پژوهشی، عواملی که شیوع آنها بصورت ناحیه‌ایی است و نیز اهداف ملی هر کشور و نیز دیگر ملاحظاتی که در تهیه فرآورده‌های بیولوژیک وجود دارد، تصمیم‌گیری در مورد حذف کلنی صورت می‌گیرد. گرچه مسلماً جایگزینی با کلنی‌های پاک به شرط حفظ و تداوم سلامت آنها در سیستم‌های پرورشی ارجحیت دارد (۹،۲، ۱۳). در زمینه پایش بهداشتی عوامل عفونی ویروسی در سایر کشورها گزارشات زیادی وجود دارد. Lipton و همکاران (۲۰۰۱) در گزارشی اعلام نمودند که موش، بعنوان میزبانی طبیعی برای ویروس Theiler عمل می‌نماید. در گزارش آنها در بیش از ۵۰٪ نمونه‌های بدست آمده از موش‌های مناطق شمال آمریکا و روسیه، آلودگی به این ویروس گزارش شده است (۱۲).

Myata و Sato (۱۹۹۰) با استفاده از روش HI(Hemagglutinating-inhibition)، وجود آنتی‌بادی بر علیه ویروس Theiler در کلنی موش های آزمایشگاهی غیر SPF در ژاپن را به میزان ۳۸/۷ ٪ اعلام نمودند (۱۴). Zenner و Regnault در پایش بهداشتی موش‌ها و رت‌های آزمایشگاهی در مراکز پرورش فرانسه، طی دوره ۱۰ ساله، اعلام نمودند آلودگی به بعضی از ویروس‌های عفونت‌زا نظیر Theiler، گرچه کاهش پیدا کرده است ولی هنوز در بعضی از مراکز وجود دارد (۲۱).

منابع

۱- فلاحی، ر.، منصوری، م.ع، (۱۳۹۵). پایش بهداشتی موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH موسسه رازی نسبت به باکتری *کلستریدیوم پیلی فورم* در سال ۱۳۹۵. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک، ۱۱۷، صفحات ۸۴-۷۸.

۲- فلاحی، ر.، منصوری، م. ع، (۱۳۹۴). بیولوژی، پرورش، بیماریها و اصول کار کردن با حیوانات آزمایشگاهی. انتشارات موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی.

3- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A.

Experimental Units. *Laboratory animals* **48:**178-92.
13- Miyata, H., Sato, H. (1990). Theiler's murine encephalomyelitis virus--characterization of newly isolated viruses from Japanese mouse colonies. *Jikken Dobutsu* **39:** 539-48.
14- Modica, C.M., Sudyn1, M.L., Zivadinov, R., Pawlowski, D.R. (2016). Shedding Risk with Intracerebral Inoculation of Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus: Informing a Risk Assessment, Applied Biosafet. *Journal of ABSA Internationa*l **21:** 142-150.
15- Oleszak, E.L., Chang, J.R., Friedman, H., Katsetos, C.D., Platsoucas, C.D. (2014). Theiler's Virus Infection: a Model for Multiple Sclerosis. *Clinical Microbiology Reviews* 174–207.
16- Percy, D.H., Barthold, S.W. (2007). Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits. Ames: Iowa State University Press.
17- Prajeeth, C.K., Beineke, A., Iskandar, C.D., Gudi, V., Herder, V., Gerhauser, I., Haist, V., Teich, R., Huehn, J., Baumgartner, W., Stangel, M. (2014). Limited role of regulatory T cells during acute Theiler virus-induced encephalitis in resistant C57BL/6 mice. *Journal of Neuroinflammation* **11:**180.
18- Sambrook, J., Fritschi, E.F., Maniatis, T. (19890. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
19- Seidman, C.E., Stuhl, K., Sheen, J., Jessen, T. (1997). Introduction of plasmid DNA into Cells, Plasma DNA into cells. *Current protocols in Molecular Biology* **37:** 1.8.1-1.8.10.
20- Zenner, L., Regnault, J.P. (2000). Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study. *Laboratory Animals* **34:** 76-83.
21- Zhang, J., Lipton, H.L., Perelson, A.S., Daharia, H. (2013). Modeling the Acute and Chronic Phases of Theiler Murine Encephalomyelitis Virus Infection. *Journal of Virology* **87:** 4052–4059.
(2003). Current Protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, Inc.
4- Dal Canto, M.C., Melvold, R.W., Kim, B.S. (1995). A hybrid between a resistant and a susceptible strain of mouse alters the pattern of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced white matter disease and favors oligodendrocyte-mediated remyelination. *Multiple Sclerosis Journal* **1:**95-103.
5- DePaula-Silva, A.B., Hanak, T.J., Libbey, J.E., Fujinami, R.S. (2017). Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Infection of SJL/J and C57BL/6J Mice: Models for Multiple Sclerosis and Epilepsy. *Journal of Neuroimmunology* **15:** 30–42.
6- Fiette, L., Brahic, M., Pena-Rossi, C. (1996). Infection of Class II-Deficient Mice by the DA Strain of Theiler's Virus. *Journal of Virology* 4811–4815.
7- Gicovate, D.G., Berria, M.I. 2001. Theiler virus-GDVII strain (TMEV-GDVII) infection of cultured astrocytes. An image analysis of its effects on cell activation. *Revista Argentina de Microbiologia* **33:**155-159.
8- Hubrecht, R., Kirkwood, J. (2010). The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals. 8th Edition; The laboratory mouse, pp: 304-309.
9- Kanga, B.S., Palmaa, J.P., Lymana, M.A., Cantob, M.D., Kim, B.S. (2005). Antibody response is required for protection from Theiler's virus-induced encephalitis in C57BL/6 mice in the absence of CD8+ T cells. *Virology* **340:** 84 – 94.
10- Law, K.M., Brown, T.D.K. (1990). The complete nucleotide sequence of the GDVII strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). *Nucleic Acids Research* 18: 6707, Oxford University Press.
11- Maclachan, N., Dubovi, E.J. (2017). Fenner's Veterinary Virology. Academic Press.
12- 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

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 2, 2019

Contamination survey of laboratory mice in a laboratory animal breeding center to Theiler's Encephalomyelitis Virus

Roozbeh Fallahi[1*], Fatemeh Abedini[2], Homayoon Mahravani[3]

1- Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2- Asisstant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3- Asisstant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 24 February 2019 Accepted: 11 June 2019

Abstract

One of the important recommendations of laboratory animals related associations is the use of animals with defined microbial flora because the results of the work on them should be repeatable, reliable and generalizable. Therefore, animal health monitoring is mandatory for certification of their health status at animal breeding and production centers. Mouse hepatitis virus and theiler's encephalomyelitis virus are the most important recommended by FELASA that to examine them in the NIH Laboratory mice colony in this project. The research methods in this study was RT-PCR, using specific primers of the virus. Designing and preparing a positive control sample was carried out using plasmid transformation containing the most appropriate viral gene fragment in E.coli for amplification and extraction. The samples are collected from intestine (colon) containing feces and prepared by standard methods and RT-PCR was performed. The virus theiler's encephalomyelitis, number 13 out of 29 samples with prevalence of 45% among NIH mice were infected with the virus. PCR product was purified and sequenced. In a strain alignment study, it was compared with the eight other species obtained from the NCBI gene. In the phylogenic tree, the KX774639 0.15874 strain belonged to this research most closely related to M20562 from Austria and NC_001366 from England. Because the infection can not be transmitted to humans, immediate removal of the colony is unnecessary.

Key words: Virus, Theiler, Encephalomyelitis, Laboratory mice

**Corresponding author: Razi Vaccine and Serum Research Institute, P.O.Box 31975/148 , Postal Code: 3197619751, Karaj, Iran*

Tel: 02634570038

E-mail :fallahiroozbeh@gmail.com