

# Utilidad del modelo animal ratón-pulmón para evaluar la virulencia de posibles cepas vacunales de *Shigella* spp

Olga M. Martínez<sup>1</sup>, Luis A. Riverón<sup>2</sup>, Juan F. Infante<sup>2</sup>, Viviana Pérez<sup>2</sup>, Sergio Sifonte<sup>2</sup>, Carmen Soto<sup>2</sup>, Ranset Diez<sup>2</sup>, Isis Montano<sup>2</sup>, Leopoldo Araujo<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Clínicas. Calle 34 Rpto. Coly. Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Instituto Finlay. Centro de Investigación–Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805 e/ 198 y 202. La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Hospital “Hermanos Ameijeiras”. San Lázaro y Belascoaín. Centro Habana, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correo electrónico: lriverson@finlay.edu.cu

*Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*, como cualquier otra especie del género *Shigella*, se sitúan entre los principales agentes etiológicos de las enfermedades diarreicas agudas, sobre todo aquellas que ocurren en los países en vías de desarrollo, aunque por la baja dosis infectante de este enteropatógeno no se excluyen los países desarrollados. Esta situación conlleva a la elaboración de vacunas para prevenir esta enfermedad y la necesidad de un modelo animal que pruebe la eficacia protectora e inmunogénica de posibles candidatos vacunales contra la shigelosis, situación que ha motivado numerosos estudios por la dificultad de demostrar la enteropatía intestinal en los monos y humanos. Lo anteriormente expuesto, más la capacidad de *Shigella* spp para mostrar resistencia a los antimicrobianos, motivó la realización de este trabajo. En el mismo se constató la utilidad del modelo animal ratón-pulmón para evaluar la virulencia de candidatos vacunales a partir de este microorganismo. Se utilizó la técnica de inoculación intranasal con una concentración entre  $10^7$  y  $10^9$  UFC de cepas de *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*. Por todos los resultados obtenidos con el modelo animal ratón-pulmón se concluyó que este modelo puede ser eficiente para los estudios preclínicos de cualquier candidato vacunal a partir de *Shigella* spp.

**Palabras clave:** *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, enteropatía intestinal, modelo ratón-pulmón.

## Introducción

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) constituyen un problema de salud para numerosas regiones del mundo. Su incidencia y elevada morbimortalidad en los niños y ancianos hacen de esta entidad clínica un tópico de especial interés. Entre sus agentes etiológicos se encuentran las bacterias del género *Shigella* y al cuadro clínico que ocasionan se le denomina disentería bacilar o shigelosis. Las EDA por *Shigella* se presentan principalmente en los países en vías de desarrollo, regiones donde afectan fundamentalmente a los niños menores de 10 años. Se calcula que anualmente ocurren alrededor de 200 millones de casos en el mundo y que la cifra de fallecidos asciende hasta los 2,2 millones. El 69% de todos los episodios y 61% de las defunciones ocasionadas por *Shigella* se presentan en los niños menores de cinco años, aunque suele producir también un gran impacto en los adultos, grupo donde afecta entre el 20-30% de los individuos con más de 20 años.

La shigelosis es una infección bacteriana aguda autolimitada del intestino humano que afecta predominantemente al colon y el recto, invadiendo las células epiteliales y el epitelio colónico, sitios donde puede producir una colitis que afecta principalmente al colon rectosigmoideo, produciendo diarreas mucopiosanguinolentas y un cuadro disentérico severo que favorece el desarrollo de complicaciones graves

(perforaciones intestinales, convulsiones y anorexia prolongada) (1, 2, 3, 4).

La elaboración de vacunas para prevenir la shigelosis es de trascendental importancia puesto que las medidas empleadas para controlar y evitar esta afección, en especial las terapéuticas, tienen una eficacia limitada. Las cepas de *Shigella* presentan con frecuencia resistencia antimicrobiana, situación que impide la recuperación rápida de los casos clínicos y en ocasiones, conduce al fallecimiento de los mismos (5).

El desarrollo de un modelo animal para probar la eficacia protectora, así como la inmunogenicidad de una cepa vacunal contra la shigelosis, facilitaría la evaluación de los posibles candidatos vacunales (6). Solo los humanos y primates no humanos son susceptibles a las especies de *Shigella*. La eficacia de los posibles candidatos vacunales contra este microorganismo se evalúa en los monos, animales que proporcionan un modelo adecuado y muestran una completa protección contra algunas especies (7).

Por razones económicas y éticas se requiere la búsqueda de otros modelos animales que permitan valorar resultados con condiciones diferentes a las creadas intencionalmente y que muestren la habilidad de *Shigella* para producir keratoconjuntivitis en los curieles, ratones y conejos (Test de Sereny), prueba que evalúa la capacidad de las cepas

virulentas para invadir las células epiteliales de la conjuntiva (6, 8). Todo hizo pensar que el ratón pudiera simular la extensa y letal enteropatía intestinal que se produce en los monos. No obstante, conociendo que algunos estudios realizados en ratones lo excluyen como modelo de shigellosis intestinal, su práctica no ha sido descartada y, posteriormente, otras investigaciones emplean la técnica de inoculación intranasal para evaluar la reactogenicidad, inmunogenicidad y eficacia de diferentes candidatos vacunales de *Shigella* (9, 10).

Otros estudios en ratón inoculados oralmente permitieron observar que accidentalmente una suspensión de *Shigella* introducida en el Sistema Respiratorio, podía ser aislada en cultivo puro del pulmón, y observarse en cortes histológicos la patogénesis de la infección pulmonar por *Shigella* (11), siendo un buen indicativo de que este microorganismo invade el epitelio pulmonar provocando infiltrados agudos supurativos y necrosis epitelial semejante a la shigellosis intestinal (10). Este método es conocido como el modelo ratón-pulmón.

En este trabajo se demostró que el uso de la técnica de inoculación intranasal en ratones es adecuado para estudiar cepas de *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*. Además, con el empleo de este modelo se pudiera complementar los resultados que proporciona el Test de Sereny, considerado, hasta este momento, la prueba de oro de la shigelosis para los animales.

## **Materiales y Métodos**

### **Ratones**

Se utilizaron ratones Balb/c machos de 18 semanas de edad y con un peso entre 20-25 g, suministrados por el Centro Nacional para Animales de Laboratorio de Cuba (CENPALAB). Durante todo el experimento los animales se alimentaron con pienso concentrado para ratones, procedente de la misma fuente que los animales y agua ad libitum. Para su manutención se utilizaron cajas de polipropileno tipo T2 y como material de encamado se utilizó al bagazo desmeollado de la caña de azúcar, el que se removió dos veces por semana.

Los protocolos de trabajo se analizaron y aprobaron por una comisión de ética institucional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### **Cepa bacteriana**

Las cepas de *Shigella* que se emplearon en este estudio fueron donadas gentilmente por el Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Ciudad de La Habana, Cuba. Previo al ensayo, estas se sembraron en medio Caldo Triptona Soya (TSB) y se identificaron por pruebas bioquímicas de Kligler y LIA, obteniéndose la imagen característica de *Shigella* sp. Posteriormente, se les realizó la identificación serológica mediante la técnica de aglutinación en láminas portaobjetos con antisueros elaborados por la

Empresa de Productos Biológicos "Carlos J. Finlay", Cuba. De esta forma se determinó la identidad de las cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei*.

### **Inoculación intranasal de ratones**

Los ratones se anestesiaron con Pentobarbital Sódico por vía intraperitoneal. Los animales se inocularon con 30  $\mu$ L de una u otra cepa bacteriana, a una concentración de  $5 \times 10^7$ - $10^9$  UFC. Después de 72 h., mediante dislocación cervical, se les practicó la eutanasia diariamente, tanto a ratones inoculados como a los controles, hasta completar los 10 días de duración del ensayo. Posteriormente, se realizó la necropsia y se describieron las lesiones observadas, extrayéndose los pulmones para realizar estudios histopatológicos y cultivos bacterianos.

### **Estudio microbiológico del pulmón**

Los pulmones extraídos fueron lavados tres veces con Solución Salina Estéril (SSE), y macerados en morteros de porcelana estériles para su posterior siembra en placas de Petri con medio Agar Triptona Soya (TSA) más Rojo Congo (RC) al 0,01% y se incubaron posteriormente a 37 °C de 18 a 24 h.

### **Estudio anatomopatológico**

Todos los animales se sometieron a un análisis anatomopatológico macroscópico, con el objetivo de constatar la existencia de cambios en los órganos o tejidos, realizándose las correspondientes descripciones en los casos donde se observó alguna alteración.

Para los análisis histopatológicos se tomaron muestras de los pulmones de cada uno de los ratones que intervinieron en el ensayo, estas fueron procesadas posteriormente por la técnica de inclusión y cortes de parafina, se tiñeron con Hematoxilina-eosina y se les realizó una descripción detallada (12).

## **Resultados y Discusión**

La infección natural por *Shigella* confiere inmunidad y protección contra las infecciones subsiguientes ocasionadas por microorganismos virulentos homólogos (13, 14, 15). Los epítopes antigénicos que confieren protección contra las cepas virulentas no están completamente definidos; por lo tanto, este modelo animal ratón-pulmón para medir la eficacia de una vacuna contra la shigellosis requiere que la infección del animal proporcione una respuesta inmune similar a la que se presenta en los humanos que contraen la enfermedad. En este modelo *Shigella* invade los pulmones de manera similar a lo que ocurre en el epitelio intestinal (10). Otros autores demuestran también que la vía de inoculación intranasal en los ratones puede ser o establecer un balance entre la eficacia y reactogenicidad de una vacuna (16).

Shim y colaboradores, al retar curieles con cepas virulentas de *S. flexneri* serotipo 2a y 5a por vía rectal, demostró el desarrollo de una colitis rectal aguda y severa que provocó una pérdida aproximada del 20% del peso corporal, tenesmo en las 24 h siguientes a la inoculación y la consecuente invasión y colonización distal del colon, aunque estas manifestaciones desaparecieron a las 48 h posteriores (17).

En este estudio preliminar los animales se infectaron con una concentración de  $10^7$ - $10^9$  UFC y fueron inspeccionados diariamente para observar posibles alteraciones clínicas. La evaluación de las mismas se basó fundamentalmente en la sintomatología presentada y esta se caracterizó por: decaimiento, disminución de la actividad, pérdida del apetito, fiebre y erizamiento de los pelos, hasta shock séptico mortal en el transcurso de los 10 días. Los animales controles se inocularon con SSE y no presentaron esta sintomatología.

A las 24 h de la inoculación, en los ratones inoculados se observaron algunas de las manifestaciones clínicas ya mencionadas (decaimiento y pérdida de su actividad) y a las 72 h en un número elevado de los mismos se constató: erizamiento de los pelos, fiebre, anorexia y algunos fallecieron. Este fue el comportamiento general de todos los ratones durante los 10 días del experimento.

Desde el punto de vista microscópico, se observaron áreas de color rojo oscuro en los pulmones, estos presentaban una superficie algo deprimida; al corte y al presionarlos, rezumaban un líquido blanco amarillento espumoso. El análisis histopatológico de estas lesiones mostraron lesiones que se caracterizaron por infiltrados con abundantes polimorfo nucleares neutrófilos que ocupaban todo el parénquima pulmonar, haciendo desaparecer la arquitectura normal del órgano, así como la presencia de abundante fibrina depositada entre los alvéolos. También se apreció una dilatación de los bronquios y bronquiolos, así como focos de necrosis (Figuras 1 y 2).

La presencia de estas lesiones permitió diagnosticar una neumonía fibrinopurulenta aguda grave de las lesiones descritas. Sin embargo, en los ratones controles no se observaron lesiones de valor diagnóstico, lo que permitió establecer una relación causa-efecto directa entre las lesiones antes descritas y las inoculaciones practicadas en todos los ratones infectados con *Shigella*; lesiones similares se describen por Mallett (10) quien las diagnostica como una neumonía fibrinopurulenta grave en condiciones similares a las empleadas en este trabajo.

En el cultivo microbiológico de todas las muestras se obtuvo un aislamiento puro de *Shigella*. No obstante, Antonella Cersini incluye el conteo de colonias en un trabajo similar a este, aunque lo realiza con diferentes cepas mutantes de *Shigella*, modificación que le permite establecer diferencias de virulencia entre ellas (16).

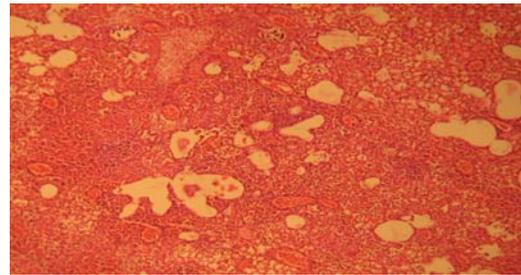


Fig.1

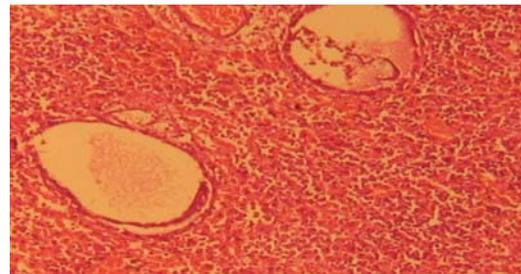


Fig.2

**Figuras 1 y 2:** Se observan infiltrados agudos supurativos, necrosis epitelial, fibrosis purulenta y bronquiectasias producidas por la inoculación de los ratones con *S. sonnei* por vía intranasal.

## Conclusiones

Por los resultados obtenidos en este estudio con el modelo animal ratón-pulmón se puede concluir que este modelo puede ser eficiente para los estudios preclínicos de cualquier candidato vacunal de *Shigella* spp. En el caso que se usara paralelamente el Test de Sereny, el modelo ratón-pulmón serviría para correlacionar ambos resultados.

## Referencias

- Guerrero ML, Calva JJ, Marow AL. Asymptomatic *Shigella* infections in a cohort of Mexican children younger than two years of age. *Pediatric Infection Diseases* 1994; (13):597-602.
- Joille M, Farah KB, Phillippe JS. Secretion of *Shigella flexneri* Ipa invasions on contact with epithelial cells and subsequent entry of the bacterium into cells are growth stage dependent. *Infection and Immunity* 1997:774-782
- LaBrec EH, Schnelder H, Magnani TJ, Formal, SB. Epithelial cell penetration as an essential step in pathogenesis of bacillary dysentery. *Bacteriology* 1964; (88):1503-1518.
- Diarrhoeal disease due to *Shigella* in vaccines. Immunization and biological. Website (<http://www.who.int/vaccines/en/Shigella.shtod>) of World Health Organization updated on May; 2002.
- Ferroccio L. Elaboración de vacunas contra la shigelosis: Memorandum de una reunión de la OMS. *Bulletin of the WHO* 1995; (65): 445-446.
- Hartman AB, Powell C J, Schultz C L, Oaks EV, Eckels, KH. Small-animal model to measure efficacy and

- immunogenicity of *Shigella* vaccine strains. *Infection and Immunity* 1991; (59): 4075-4083.
7. Formal SB, Kent FH, May HC, Palmer A, Falkow S, La-Brec EH. Protection of monkeys against experimental shigellosis with a living attenuated oral polyvalent dysentery vaccine. *Journal Bacteriology* 1996; (92):12-22.
  8. Sereny B. Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. *Acta Microbiology, Academic Sciences Hungary* 1957; (4): 367-376.
  9. Mel DM, Terzin AL, Vuksin L. Studies on vaccination against bacillary dysentery. 1. Immunization of mice against experimental *Shigella* infection. *Bulletin WHO* 1965; (32): 633-636.
  10. Mallet CP, Van De Vorig L, Collins HH, Hale TL. Evaluation of *Shigella* vaccine safety and efficacy in an intranasally challenge mouse model. *Vaccine* 1993; 11(2):190-196.
  11. Voino-Yasenetsky MV, Voino-Yasenetsky MK. Experimental pneumonia caused by bacteria of the *Shigella* group. *Acta Morphologica Academic Sciences Hungary* 1962; (1): 439-454.
  12. Vaca L. *Manual de Histoquímica*. Barcelona: Ediciones Doyma; 1985.
  13. Dinari G, Hale TL, Austin S, Formal SB. Local and systemic antibody response to *shigella* infection in rhesus monkeys. *Journal Infection Diseases* 1987;(155):1065-69.
  14. Dupont HL, Hornick RB, Snyder MJ, Libonati JP, Formal SB, Gangarosa EJ. Immunity in shigellosis. II. Protection induced by oral live vaccine or primary infection. *Journal Infection Diseases* 1972; (125):12-16.
  15. Herrington DA., Van de Verg L, Formal SB, Hale TL, Tall BD., Cryz SJ, Tramont EC, Livine MM. Studies in volunteers to evaluate candidate *Shigella* vaccines: further experience with a bivalent *Salmonella typhi-Shigella sonnei* disease. *Vaccine* 1990; (8): 353-357.
  16. Cersini A. Analysis of virulence and inflammatory potential of *Shigella flexneri* purine biosynthesis mutants. *Infection and Immunity* 2003; 12(71):7002-7013.
  17. Shim DH, Susuki T, Chang SY, Park SM, Sansonetti PJ, Sasakawa CK. New animal model of shigellosis in the Guinea pig: its usefulness for protective efficacy studies. *Journal Immunology* 2007; 178 (4): 2476-82.

## Usefulness of lung-mouse animal model to evaluate the virulence of *Shigella* spp candidate vaccine strains

### Abstract

*Shigella flexneri* and *Shigella sonnei*, as other species of *Shigella*, are among the main etiological agents of acute diarrhoeal diseases worldwide, specially in developing countries, although we do not exclude developed ones, because of their low infective dose, between 10 and 100 colonies. This leads to the preparation of vaccines to prevent this illness and the need for an animal model to demonstrate the protective and immunogenic effectiveness of the shigellosis candidate vaccines. Many studies have been carried out since the intestinal enteropathy is difficult to demonstrate in monkeys and humans. The aforementioned and the capacity of *Shigella* sp to become resistant to antibiotic treatments motivated our study. In it we demonstrated the usefulness of the mouse-lung animal model to evaluate the virulence of vaccine candidates. Intranasal inoculation with *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* in concentration on between  $10^7$  and  $10^9$  CFU was used. The conclusion was that the lung-mouse animal model can result efficient for preclinical studies of any *Shigella* spp vaccine candidate.

Keywords: *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, intestinal enteropathy, lung-mouse model.

Recibido: Diciembre de 2007

Aceptado: Marzo de 2008