

ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA PRODUCIDA POR *Clostridium piliforme* EN RATONES N:NIH(S)-nu TRANSPLANTADOS CON LA LÍNEA TUMORAL A 549

**M Ayala, S Milocco, G Principi, J Laborde, M Carriquiriborde,
P Cagliada, C Carbone**

Cátedra de Animales de Laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: *Clostridium piliforme*, produce una enfermedad fatal en el ratón, que se manifiesta como hepatitis con compromiso intestinal e interfiere en los resultados de las pruebas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la interferencia que causa *Clostridium piliforme* en ratones N:NIH(S)-nu (nude) transplantados con la línea tumoral A 549. Se utilizaron 100 animales nude divididos en 4 grupos de 25 ratones cada uno: grupo 1, con el tumor e infectados con *Clostridium piliforme*; grupo 3, sin tumor e infectados con *Clostridium piliforme*; grupos control 2 y 4, con y sin tumores respectivamente, no infectados con el microorganismo. En el grupo 1; 19 manifestaron signos clínicos a los 4 días postinoculación (p.i.) observándose lesiones en el hígado e intestino; en el grupo 3; 20 desarrollaron signos clínicos a los 4 días p.i., 5 murieron y el resto se sacrificó hallándose las mismas lesiones que en el grupo 1. Los grupos 2 y 4 no presentaron lesiones. El 78% de los animales inoculados con *Clostridium piliforme* manifestaron signos clínicos a los 4 días p.i. No hubo diferencias entre los animales con o sin tumor. Se concluyó que *Clostridium piliforme* interfiere provocando la muerte de los animales con o sin tumor.

PALABRAS CLAVE: *Clostridium piliforme*, ratones, interferencia, tumores.

STUDY OF THE INTERFERENCE PRODUCED BY *Clostridium piliforme* IN NIH(S)nu IN MICE TRANSPLANTED WITH THE TUMOR LINE A549

ABSTRACT: *Clostridium piliforme* produces a fatal infection in mice, as hepatitis involving the intestine and interferes in experimental results. The aim of this work was to evaluate the interference caused by *Clostridium piliforme* in N:NIH(S)-nu mice (nude) transplanted with the tumor line A 549. One hundred nude mice were divided into four groups of 25 animals each one: group 1, animals with tumor and experimentally infected with *Clostridium piliforme*; group 3 animals with no tumor and inoculated with the microorganism; and control groups 2 and 4 with and without tumor respectively, not infected with the microorganism. In group 1, nineteen mice showed clinical signs 4 days after inoculation, typical lesions in liver and intestine were observed. In group 3; 20 mice showed clinical signs 4 days after inoculation, 5 of them died, necropsy was performed on the rest of the animals, the same kind of lesions as in group 1 were found. In groups 2 and 4 no lesions were observed. 78% of the animals inoculated with *Clostridium piliforme* have shown clinical signs 4 days after inoculation. There were observed no differences in the animals with or without tumor transplantation. It was concluded that *Clostridium piliforme* interferes causing the death of the animals with or without tumor.

KEY WORDS: *Clostridium piliforme*, mice, interference, tumor.

Fecha de recepción: 09/12/05

Fecha de aprobación: 20/03/06

Dirección para correspondencia: Miguel Ayala, Cátedra de Animales de Laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118. C.P. 1900. La Plata. Te/fax: 0221-4211276.

E-mail: mayala@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Clostridium piliforme es el agente etiológico de la enfermedad de Tyzzer. Es un microorganismo gram negativo, con forma de bastón, de 8 a 10 μm de largo por 0,5 μm de ancho, con tendencia al pleomorfismo; forma esporos terminales, es móvil y presenta flagelos peritricos. Es PAS positivo, se tiñe rápidamente con colorantes básicos de anilina y con la técnica de impregnación argéntica, que es la más adecuada para su demostración en cortes histológicos. No crece en medios para cultivos bacterianos, por lo que es un parásito intracelular obligado, se multiplica bien en el saco vitelino de huevos embrionados de pollo o en cultivos primarios de hepatocitos de embrión de pollo o de ratón.

Produce una enfermedad fatal en varias especies como rata, ratón, conejo, hámster, merión, caballo y perro, la cual se presenta como hepatitis con compromiso intestinal. La enfermedad clínica se manifiesta generalmente al destete y se caracteriza por diarrea y muerte de los individuos afectados. La forma subclínica es la más importante (1). Cuando se someten los animales a un estrés experimental, como por ejemplo cambios en el macro y microambiente o inmunodepresión con drogas o agentes físicos este agente adquiere patogenicidad interfiriendo con los resultados finales de las pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad. Se transmite por vía fecal-oral, por lo que el primer sitio de infección es el epitelio intestinal y desde allí se disemina por vía sanguínea a otros órganos como el corazón y el hígado, produciendo focos de necrosis en los mismos (2,3,4).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la interferencia que produce el *Clostridium piliforme* en ratones de la cepa N:NIH(S)-*nu* transplantados con la línea tumoral de adenocarcinoma pulmonar humano A549.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: se utilizaron 100 ratones hembras de la cepa N:NIH(S)-*nu*, libres de patógenos específicos (SPF) de 8 a 10 semanas de edad, proveniente de la colonia del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales se mantuvieron bajo estrictas barreras sanitarias, a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ de temperatura y humedad del 50%, con aire filtrado (Filtros HEPA 99,9%) a razón de 15 renovaciones por hora, en cajas de acero inoxidable ($n = 5$), con lecho de viruta estéril. Se les proporcionó agua de bebida suplementada con vitaminas y alimento (Cooperación S.R.L.), autoclavados y *ad-libitum*, de acuerdo con las recomendaciones internacionales (5, 6).

Diseño experimental: los ratones se dividieron en 4 grupos: grupo 1: 25 animales con

desarrollo tumoral inoculados por vía intravenosa (iv) con un homogenato de hígado e intestino provenientes de ratones infectados con *C. piliforme*, grupo 2: 25 animales con desarrollo tumoral e inoculados por vía iv con un homogenato de hígado e intestino de ratones libres de *C. piliforme*; grupo 3: 25 animales inoculados por vía intravenosa (iv) con un homogenato de hígado e intestino provenientes de ratones infectados con *C. piliforme*, y grupo 4: 25 ratones como grupo control.

Inoculación experimental: Las células de la línea tumoral A549 se transplantaron por vía subcutánea a los ratones de los grupos 1 y 2 a las 4 semanas de edad, previamente anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg, IP) (7, 8, 9), realizando una incisión en la piel laxa del dorso con un trócar. Los animales de los grupos 1 y 3 se inocularon a las 6 semanas de edad por vía iv con un homogenato de hígado e intestino proveniente de ratones infectados con *C. piliforme* en una concentración de 10^6 microorganismos en 0,1 ml de solución (6).

Técnica de Inmunofluorescencia (IF): para la identificación del *C. piliforme* se realizaron improntas de hígado e intestino de los animales en los cuales se observaron lesiones. Las improntas se fijaron con acetona, se enfrentaron con un suero control positivo anti-*Clostridium piliforme* (producido y validado en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP) durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, se lavaron con solución buffer fosfato (PBS), se cubrieron con un conjugado anti-ratón marcado con fluoresceína (Merck) y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Posteriormente se lavaron con PBS y se observaron en un microscopio de fluorescencia para confirmar la presencia del microorganismo (6, 10, 11).

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos. El 76 % de los ratones del grupo 1 y el 80% del grupo 3 presentaron signos clínicos de la enfermedad a los 4 días p.i. El 16% y el 25 % de los animales de los grupos 1 y 3 respectivamente murieron durante el periodo agudo de la enfermedad. En la necropsia se observó que presentaban focos de necrosis en el intestino y en el hígado. El 24% y el 25% de los ratones de los grupos 1 y 3 respectivamente no presentaron signos clínicos de la enfermedad. La prueba de IF resultó positiva en el 78% de los ratones inoculados con *C. piliforme*, observándose la morfología típica del agente causal de la enfermedad de Tyzzer.

Los ratones de los grupos control 2 y 4 no presentaron lesiones correspondientes a esta enfermedad.

Tabla 1: SMC: Animales que no presentaron manifestaciones clínicas de la enfermedad de Tyzzer, CMC: animales que presentaron signos clínicos y MFA: animales que murieron en la fase aguda de la enfermedad.

Table 1: SMC: Animals without clinical signs of Tyzzer's disease, CMC: Animals with clinical signs of Tyzzer's disease, and MFA: Animals which died during the acute period of the disease.

| Grupos | SMC | CMC | MFA |
|---|-----------|----------|-----|
| 1 Con tumor e inoculado con Cl. piliforme | 6 (24%) | 19 (76%) | 4 |
| 2 Con tumor y sin inocular con Cl. piliforme | 25 (100%) | 0 (0%) | 0 |
| 3 Sin tumor e inoculados con Cl. piliforme . | 5 (20%) | 20 (80%) | 5 |
| 4 Sin tumor y sin inocular con Cl. piliforme. | 25(100%) | 0 (0%) | 0 |

DISCUSIÓN

El 78% de los animales inoculados con *Cl. piliforme* manifestaron signos clínicos a los 3 ó 4 días p.i. por lo tanto las infecciones con este microorganismo se pueden considerar fatales en las colonias, no habiéndose observado diferencias en las respuestas entre los animales con o sin tumor. Se concluyó que *Clostridium piliforme* es un microorganismo que interfiere en las pruebas, produciendo una enfermedad aguda que desemboca en la mayoría de los casos en la muerte de los individuos, por lo cual en las investigaciones en las que se utiliza el ratón como reactivo biológico este agente debe estar ausente de la colonia durante toda la experiencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ayala MA, Suzuki E, Noguchi A, Nakayama K, Naiki H. Experimental sublethal infection with *Bacillus piliformis* (Tyzzer's disease) in mice. Proceeding Second Meeting on The Cooperative Research Project in The Area of Veterinary Sciences Between National University of La Plata and Japan International Cooperation Agency 1993; 223-226.
2. Fujiwara K. Tyzzer's disease. Japan Exp. Med. 1978; 48:467-480.
3. Tyzzer E. A fatal disease Japanese waltzing mouse caused by a spore bearing bacillus (*Bacillus piliformis* N. sp) J. Med Res. 1917; 37: 307-338.
4. Cagliada P, Ayala M, Carbone C, Nosetto E. Studies on the diagnosis of Tyzzer's disease in laboratory mice colonies. Laboratory Animals Ltd, United Kingdom. Proceedings of the International Joint Meeting. XXII ICLAS General Assembly & Conference VII FELASA Symposium. 2000; 38-40.
5. Derrell C. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council (USA), 1996; p.21-55.
6. Ayala M, Carbone C, Cagliada M, Nosetto E. Aislamiento de *Clostridium piliforme* en colonias de ratones en Argentina. Analecta Veterinaria 1996; (2) 27-28.
7. Flecknell P. Anestesia de animales de laboratorio. Ed. Acribia. Zaragoza (España), 1998; p. 168-171.

8. Cagliada P, Ayala M, Milocco S, Principi G, Colussi A, Galosi C, Carbone C. Evaluación del Stock Nude NHI: nu/nu como modelo animal para el mantenimiento de la línea tumoral humana A549. Reunión Científica Internacional / Regional "Avances en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio"; 2004 p. 132.

9. Kraus-Berthier L, Jan M, Guilbaud N, Naze M, Pierré A, Atassi G. Histology and Sensitivity to Anticancer Drugs of Two Human Non-Small Cell Lung Carcinomas Implanted in the Pleural Cavity of Nude Mice Experimental Therapeutics, Preclinical Pharmacology. Clinical Cancer Research. 2000; (6), 297-304.

10. Fujiwara K, Ganaway JR. *Bacillus piliformis*. Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals; National Institute of Health (USA); 1994 p. 117-120.

11. Ayala M, Milocco S, Cagliada P, Maschi F, Laborde J, Carriquiriborde M, Galosi CM, Carbone C. Estudio de la enfermedad de Tyzzer (*Clostridium piliforme*) en ratones de la cepa BALB/c NACKT infectados experimentalmente. Revista de Medicina Veterinaria. 2005; 86 (6): 238-239.