

Las ratas SPF como modelo experimental para la enfermedad meningocócica y evaluación de la efectividad de VA-MENGOC-BC®. I Estudio clínico-anatomopatológico

Infante JF, Sierra G, Campa C, Pérez V, Muñoz P, Muñoz E, Gutiérrez M, Oliva R.

Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. La Habana, Cuba

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento del modelo de meningitis meningocócica en ratas libres de patógenos específicos (SPF) y de evaluar la utilidad de dicho modelo para las pruebas de efectividad de la vacuna cubana antimeningocócica VA-MENGOC-BC® se estudiaron dos grupos de animales inoculados con VA-MENGOC-BC® y gel de hidróxido de aluminio respectivamente. Los animales de ambos grupos fueron retados con *Neisseria meningitidis* del serogrupo B. Después del reto los animales fueron estudiados desde el punto de vista clínico y anatomopatológico. En ambos grupos se observaron signos clínicos e histopatológicos típicos de enfermedad meningocócica. En el grupo inmunizado con VA-MENGOC-BC® no se produjeron muertes después del reto y la intensidad de la sintomatología clínica y de las lesiones histopatológicas fue menor que en el grupo placebo.

Introducción

La enfermedad meningocócica constituye un grave problema para la salud humana, sobre todo en los niños a pesar de existir antibióticos efectivos contra este germen (1).

En Cuba se ha llevado a cabo exitosamente la vacunación masiva contra esta enfermedad, de la misma forma se ha hecho en Brasil usando la vacuna obtenida en Cuba (2).

Diferentes modelos experimentales han sido usados para el estudio de varios aspectos de la enfermedad meningocócica, incluyendo la evaluación de los componentes vacunales y de la vacuna como un todo en diferentes fases de su investigación, evaluación y control (3).

En dichos estudios han sido usados monos, curieles, conejos, ratones y embriones de pollo (4); sin embargo, continúa siendo una necesidad el uso y perfeccionamiento de estos modelos para facilitar la búsqueda de nuevas generaciones de preparados vacunales con novedosas tecnologías.

Algunos modelos en los que se ha demostrado correlación con el humano en la inducción de inmunidad son: Chimpancé, curiel, ratón, conejo y burro (5).

Esto se ha logrado mediante la inmunización sistémica con: células fijadas con formaldehído, complejo proteico de la membrana externa, polisacáridos y antígenos mixtos (6).

Dada la necesidad de profundizar en diferentes aspectos relacionados con la obtención de un modelo animal de meningitis meningocócica adecuado para la evaluación de la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC®, nuestro grupo ha laborado intensamente durante

varios años con las ratas SPF (libres de patógenos específicos), con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los aspectos clínicos y anatomopatológicos del referido biomodelo, por lo que en el presente trabajo nos propusimos evaluar las manifestaciones clínicas y las lesiones histopatológicas en ratas SPF inoculadas con VA-MENGOC-BC® o gel de hidróxido de aluminio y posteriormente retadas con *Neisseria meningitidis* tipo B.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 30 ratas SPF, machos, de la línea Long Evans, con un peso promedio de 450 a 530 g y seis meses de edad, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), mantenidos en aisladores estándar. Los animales se distribuyeron según se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño del experimento

Grupo	No. de animales	Vía de inoculación	No. de animales
Control	10	IP	5
(Placebo)		SC	5
Vacunados	20	IP	10
		SC	10

Los animales del grupo experimental recibieron la vacuna VA-MENGOC-BC®, mientras que el grupo control recibió como placebo gel de hidróxido de aluminio con la misma concentración que en la formulación vacunal. La dosis utilizada para ambos grupos fue de 0,5 mL y su aplicación se realizó por la vía IP (Intraperitoneal) o SC (Subcutánea).

En ambos grupos se practicó una segunda inoculación nueve semanas después de la primera, con idénticas características.

A los 15 días de la segunda dosis, se suministró 1 mL de pristane (SIGMA, Chemical Company) al 75% diluido en medio de Frantz modificado (7) por vía intraperitoneal (IP) como irritante de la cavidad abdominal. A continuación los animales fueron retados con *Neisseria meningitidis* serogrupo B cepa 385, suministrada por el cepario del Instituto Finlay, en dosis de 10^8 UFC/mL suspendidas en medio de Frantz a razón de 1 mL por la vía (IP) para cada animal. Se observaron clínicamente las ratas de ambos grupos valorando la intensidad de los síntomas los cuales fueron expresados de la siguiente forma:

- + Disminución del consumo de alimentos y agua.
- + + Disminución del consumo de alimentos y agua. más trastornos nerviosos leves.(tics).
- + + + Disminución del consumo de alimentos y agua más trastornos nerviosos severos. (postración, posturas anormales y muerte).

Tanto a los animales sacrificados como a los que murieron durante el experimento se les practicó la necropsia, siguiendo el método propuesto por Castillo (8), además se tomaron fragmentos de órganos y tejidos, los cuales fueron fijados en formalina neutra al 10%, y procesados por la técnica de inclusión y cortes en parafina, coloreándolos con hematoxilina-eosina.

Resultados y Discusión

Transcurridas dos horas de la confrontación, todas las ratas presentaron síntomas caracterizados por disminución del consumo de alimentos y agua, bajo nivel de respuesta a los estímulos sonoros, siendo estos más evidentes en los animales controles (Tabla 2), donde además se registraron muertes. El resto de los animales se recuperaron luego de transcurridas 12 horas del reto, comportamiento similar al observado en ratas recién nacidas confrontadas con *Neisseria meningitidis* grupo B (9) y con otros gérmenes causantes de meningitis (10, 11 y 12).

Tabla 2. Resultados generales del experimento

Vía de inoculación y producto utilizado	Cantidad de animales al inicio del experimento	Cantidad de animales confrontados al germen	Cantidad de animales muertos antes de la confrontación	Intensidad de las manifestaciones clínicas	Muertes post-confrontación	Sacrificados post-onfrontación
Placebo IP	5	5	-	++++	1	4
Placebo SC	5	4	1	++++	2	2
Vacuna IP	10	9	1	++	-	9
Vacuna SC	10	10	-	+	-	10
TOTALES	30	28	2	-	3	25

Los estudios anatomopatológicos revelaron lesiones granulomatosas diseminadas en la cavidad abdominal (Tabla 3) (Figuras 1, 2, 3) en los animales inoculados por vía IP y circunscritos a la zona de inyección en el tejido celular subcutáneo en los que recibieron la inoculación

por la vía SC. Estas lesiones son atribuibles a la acción del hidróxido de aluminio usado como adyuvante (13, 14). Resultados similares a estos han sido reportados con el uso de otros adyuvantes de depósito en las especies de ratón y curiel. (15, 16, 17).

Tabla 3. Lesiones histopatológicas en cavidad abdominal

Vía de inoc. De prod. Utilizados	Cant. de animales analizados	Cant. De animales no analizados	Engros. de la cápsula por tej. de granulación	Hígado				Bazo			
				Neutróf. en esp. porta y parénquima	Degen. de los hepatocitos	Con-gestión	Const. de los cordones de Billoth	Hiperp. de los corpús. de Malphio	Engros. de la cápsula por tej. de granulomatoso	Abdtes.n en los cordones	Abdtes. megacariocitos
PL. IP	5	-	4	4	4	1	3	3	4	1	4
PL. SC	4	1	-	2	4	2	1	-	-	2	1
Vac. IP	9	1	3	-	7	2	5	8	8	-	7
VAC. SC	7	3	-	1	7	-	4	6	-	-	4
TOTALES	25	5	11	7	22	5	13	17	16	3	16

Tabla 3. Lesiones histopatológicas en cavidad abdominal (continuación)

Cilindros hialinos	Riñón		Hemorragia en corteza y médula	Glomerulitis membranososa	Gloméruloesclerosis	Páncreas	Vesícula seminal	Peritoneo	Ganglio linfático mesentér.
	Engros. de la cáps. de Bowman	Nefritis intersticial focal				Formaciones granul. en la perif. glandular	Formaciones granul. en la perif. gland.	Formaciones granul. diseminadas	Abdtes. cél. plasmáticas en la médula
4	1	1	5	-	-	2	1	5	1
1	-	-	2	1	-	-	-	-	-
7	3	4	6	4	3	8	6	9	3
7	1	3	4	1	3	-	-	-	6
19	5	8	17	6	6	15	10	23	10



Figura 1. Forulación granulomatosa en la superficie del bazo. Rata SPF, vacunada con VA-MENGOC-BC® por la vía intraperitoneal.



Figura 2. Formación granulomatosa a nivel del epiplón. Rata SPF, vacunada con VA-MENGOC-BC® por la vía intraperitoneal.



Figura 3. Forulación granulomatosa macrofásica situada encima de las cápsulas de Glisson. Rata SPF, vacunada con VA-MENGOC-BC® por la vía intraperitoneal. H.E. X 80.

Los animales controles que murieron o fueron sacrificados, presentaron lesiones características de

meningitis (Tabla 4). (Figura 4). Similares lesiones han sido reportadas en ratas recién nacidas (18)

Tabla 4. Hallazgos histopatológicos en encéfalo y médula espinal

Vía de inoculación y producto utilizado	Cantidad de animales analizados histopatológicamente	SNC			
		Encéfalo		Médula	
		Meningitis focal	Cong. de vasos	Gliosis focal	Con lesiones
Plac. I.P	4/5	3	2	2	-
Plac.S.C	2/5	-	1	-	-
Vac. I.P	9/10	-	7	1	-
Vac. S.C	7/10	-	3	-	-
TOTAL	22/30	3	13	4	-

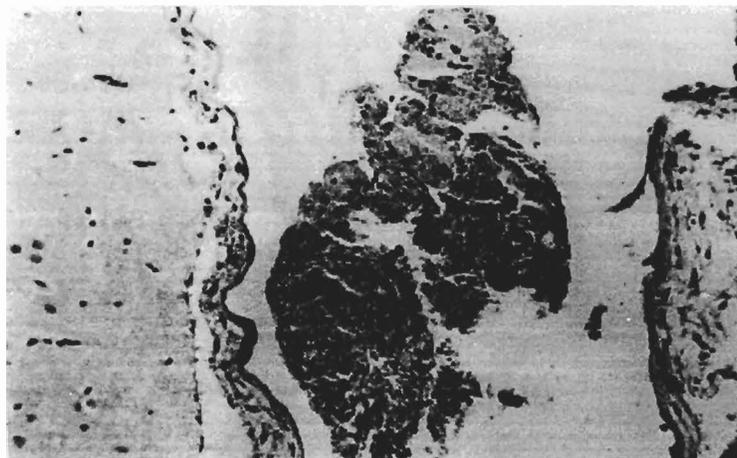


Figura 4. Discreta meningitis fribriropurulenta focal en rata SPF control, retada con *N. meningitidis*. H.E x 80.

Otras lesiones encontradas, como las neumonitis agudas e infartos endocárdicos, bazos sépticos y presencia de neutrófilos abundantes en el hígado de los animales controles (Tablas 3 y 5), han sido señaladas para las septicemias por *Neisseria meningitidis* en seres humanos (19). Por otra parte, debemos señalar que las hiperplasias linfático-ganglionares con presencia de abundantes células plasmáticas en su zona medular (Tabla 5) (Figura 5) pudieran ser la expresión de una fuerte actividad inmunológica estimuladora, la cual es un rasgo significativo del efecto que sobre el sistema inmune ejercen los componentes de la pared celular de diferentes microorganismos (20, 21).

Tabla 5. Lesiones histopatológicas en cavidad torácica

Vía de inoculación y producto utilizado	Cant. de animales analizados	Pulmón				Corazón	
		Congestión y edema	Neumonía aguda	Hemorragia	Infarto subendocárdico	Hemorragia	Miocarditis interst. Focal
Placebo IP	5	5	3	-	2	1	-
Placebo SC	4	4	1	4	-	1	-
Vacuna IP	9	7	-	6	1	1	-
Vacuna SC	7	7	1	4	-	-	1
TOTAL	25	23	5	14	3	3	1

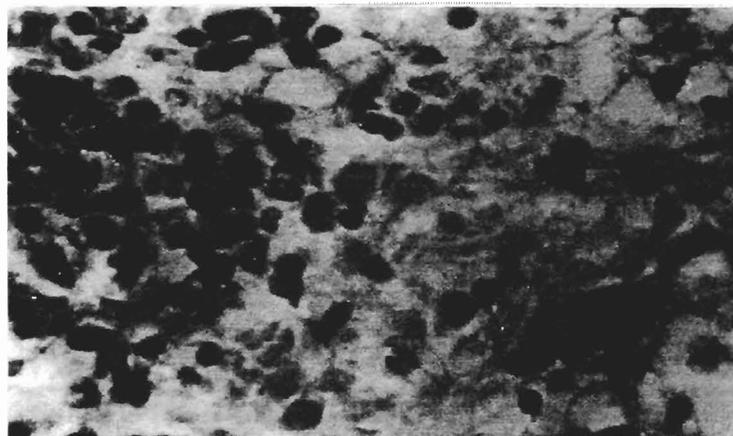


Figura 5. Infiltrado de células linfoides, macrófagos y células plasmáticas en aracnoides de ratas SPF retadas con *N. meningitidis* grupo C. H.E. H.E x 280.

Teniendo en cuenta la aparición de lesiones características de meningitis meningocócica en los animales retados, así como la menor intensidad de los síntomas y las lesiones histopatológicas en los animales vacunados, consideramos que este pudiera ser un biomodelo experimental de la enfermedad meningocócica potencialmente útil para la evaluación de la efectividad de VA-MENGOC-BC®, aunque debe continuarse profundizando en su estudio para convertirlo en una herramienta útil para el trabajo diario.

Referencias

- Dias RT, Outschoorn IM. Current Status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or noncapsular? *Clin. Microbiol. Rev* 1994;7:559-75.
- Sierra G, Campa C, Valcárcel N, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: Protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Anm* 1991;14:195-210.
- Lissolo L, Wilmotte M, Dumas P, et al. Evaluation of transferrin-binding protein 2 within the transferrin binding complex as a potential antigen for future meningococcal vaccines. *Infect. Immun* 1995;63:884-890.
- Arko RJ, Balowa A. Animal models of experimental gonococcal infection. Experimental models. *Acta Microbiol. Chemotherapig*. 1986;1:355-369.
- Arko RJ. Animal models for Pathogenic *Neisseria* Species. *Clinical Microbiology Reviews* 1989:56-59.
- Tai JY, Michon F, Fusco P and Blake MS. Preclinical evaluation of a combination vaccine against A, B, and C meningococci in both mice and nonhuman primates. *Abstract of the tenth International Pathogenic Neisseria Conference*, Baltimore, Maryland U.S.A; 1996:214-215.
- Sotolongo F. *Neisseria meningitidis*, aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico clasificación y valoración de la respuesta inmune. *Serie monográfica SM1*. eds. Finlay; 1995:15-23.
- Castillo F. El ratón como animal de laboratorio. *Monografía INOR*, Ministerio de Salud Pública de Cuba;1985:102-103.
- Infante JF, Marrero O, Sifontes S, et al. Evaluation of the efficacy on human antimeningococcal Immunoglobulin G in infant rats experimentally infected with *Neisseria meningitidis* grupo B. *Arch. Med. Res.* 1994;25(4):455-461.
- Moxon ER, Smith A.L, Averill D.R, Smith DH. *Haemophilus influenzae meningitis* in infant rats after intranasal inoculation. *J. Infect. Dis.* 1974;129:154.
- Smith AL, Smith DH, Averill DR. Production of *Haemophilus influenzae meningitis* in infant rats by intraperitoneal inoculation. *Infect Ammun.*1973;8:278.
- Moxon ER, Ostrow PT. *Haemophilus influenzae meningitis* in infant rats: role of bacteremia in pathogenesis of age-dependent inflammatory responses in cerebrospinal. *J. Infect. Dis.* 1977; 135:303.
- Stewart Tull, D.E.S; Recommendations for the assessment of adjuvants (Immunopotentiators). En: G. Gregoriadis. G, Allinson AC, G. Poste, eds. Immunological adjuvantes and vaccines, Life Sciences Vol.179. Plenum Press, New York, 1989:213-226.
- Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad BE, Bezzni B, Ben-Efraim S, Gupta C.K. Adyuvants a balance between toxicity and adyuvantcity vaccine II, 1993:293.
- Benach JL, Habitch GS, Holbrock TW y Cook. A Glucan and adyuvant for a murine babesia microti immunization trial. *Infect.Immun.* 1959;35:947-957.
- Thein P. Coadyuvantes, Inmunomodulación e Inmunoestimulación. *Not.Med.Vet.*1988:59.
- Infante JF, Muñoz E, Medina M, Oliva R. Inocuidad inespecífica al Beta (1-3) Glucano (EVIMOK) de fabricación cubana. *Rev. Salud Anim.* 1995;17:45-54.
- Infante JF. *Neisseria meningitidis*. Resultados experimentales sobre biomodelos de ratón y rata. *Serie monográfica*. ed. Finlay. La Habana. 1996:130-134.
- Buson PB, Dermott M. Meningitis meningocócica. ed. Importécnica, S.A. Madrid, 1978:383-404.
- Robbins SL, Cotran RS, Kurnor V. Tratado de Patología. Souder Co. Philadelphia; 1984:1003-1020.
- Diluzio NR. Update on the immunomodulating activities of glucans. Springer Semin. Immunopathopl-8; 1985:387.
- Danse LH, Speijers GJ, Beuvery EC, Vos JG. Report of the environmental hygiene. RIVM, Bithoven; 1983:189-195.

Abstract

SPF Rats as an Experimental Model of Meningococcal Disease and for the Evaluation of the Effectiveness of VA-MENGOC-BC®. I. Clinical and Anatomopathological Study

Two groups of animals were inoculated with VA-MENGOC-BC® or aluminum hydroxide gel respectively in order to further study the model of meningococcal meningitis in specific pathogen free (SPF) rats and to evaluate the usefulness of this experimental model for the assessment of the effectiveness of the Cuban meningococcal vaccine (VA-MENGOC-BC®). The animals of both groups were challenged with serogroup B *Neisseria meningitidis*. All animals were studied after challenge by clinical observation and histopathological evaluation. Typical clinical and histopathological signs of meningococcal disease were observed in both groups. No deaths were recorded after challenge in the group immunized with VA-MENGOC-BC® and less intense clinical and histopatological manifestations were observed compared with the placebo group.