

Las ratas SPF como modelo experimental para la enfermedad meningocócica y evaluación de la efectividad de VA-MENGOC-BC®. II. Estudio microbiológico e inmunológico

Juan Francisco Infante, Gustavo Sierra; Concepción Campa, Armando Acosta, Enrique Azahares; Viviana Pérez, Enrique Muñoz, Reynaldo Oliva y Mercedes Gutiérrez

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

En Cuba, Brasil y otros países se llevó a cabo exitosamente la vacunación masiva contra la enfermedad meningocócica con VA-MENGOC-BC®. Las ratas SPF (Libres de Patógenos Específico) han demostrado su eficacia no solo en el control, sino además en las investigaciones actuales de nuevas variantes de las vacunas. En este trabajo se observó las posibles diferencias existentes entre ratas vacunadas y controles, al ser sometidas a un reto con *Neisserias meningitidis* serogrupo B y C, con el fin de demostrar la protección conferida por VA-MENGOC-BC®. Para este ensayo se utilizaron 48 ratas SPF de ambos sexos de la línea Spreague Dawley; los animales controles fueron inoculados con gel de hidróxido de aluminio por la vía intramuscular (I/M) y subcutánea (S/C) mientras que los vacunados recibieron por estas vías la VA-MENGOC-BC® en dosis de 0,25 mL; se realizaron estudios microbiológicos de bacteriemia y anatomopatológico a los animales muertos o sacrificados al final del ensayo; también se determinó la presencia de anticuerpos en sangre mediante el sistema SUMA. Los datos se procesaron por un análisis estadístico de ANOVA. Los resultados obtenidos evidenciaron que los animales vacunados y posteriormente retados con Nm serogrupo B tuvieron una efímera bacteriemia a diferencia de sus controles que permanecieron durante un tiempo relativamente largo en este estado. La mortalidad fue baja en los controles y ningún animal vacunado murió. En el caso del reto con Nm serogrupo C las bacteriemias fueron similares en vacunados y controles, así como la mortalidad que se comportó en un 54,5% en los dos grupos del experimento. De esta forma queda iniciada una línea de desarrollo en un biomodelo evaluativo de este tipo de producto usando la rata SPF con reconocidas ventajas por su calidad genética y sanitaria.

Palabras claves: Enfermedad meningocócica, Ratas SPF, efectividad, VA-MENGOC-BC

Introducción

En Cuba, Brasil y otros países se llevó a cabo exitosamente la vacunación masiva contra la enfermedad meningocócica. Para demostrar la eficacia de la vacuna antimeningocócica se han utilizado algunos biomodelos, los cuales han demostrado correlación de su respuesta con la del humano en la inducción de inmunidad; estos son: chimpancé, curiel, ratón, rata, conejo, burro (1, 2). Las ratas SPF (Libres de Patógenos Específicos) han demostrado su eficacia no sólo en el control, sino además como base de investigaciones actuales de nuevas variantes de vacunas.

Con este trabajo nos propusimos observar posibles diferencias clínicas, inmunológicas, microbiológicas y patológicas entre ratas vacunadas y controles al ser sometidas a un reto con Nm grupo B y C como demostración del poder protector de la vacuna VA-MENGOC-BC®.

Materiales y Métodos

Para este ensayo se utilizaron 48 ratas SPF de ambos sexos, 24 machos y 24 hembras de la línea Spreague Dawley, con un peso comprendido entre 150-200 g, procedentes del Instituto de Hannover, RFA, mantenidas en aisladores y condiciones controladas.

El diseño experimental aplicado se presenta en la Tabla 1.

Los controles fueron inoculados con gel de $Al(OH)_3$ a concentración de 4 mg/mL, en dosis de 0,25 mL por vía intramuscular (IM) o subcutánea (SC). El punto de inoculación en la vía IM fue la musculatura de la cara interna en la extremidad posterior izquierda, y en la SC de la zona dorsal cerca de la extremidad anterior izquierda.

Los detalles relacionados con la forma en que se irritó el peritoneo, previo al reto se presentan en la Tabla 2. Para la realización de los hemocultivos se tomó 0,2 mL de sangre a través del plexo retroorbital, la cual se depositó en medio de cultivo caldo Mueller Hinton, y se incubó posteriormente a 37 °C. A los animales que murieron después del reto que se llevó a cabo (Tabla 2), y a los sobrevivientes al final del experimento, se les realizaron investigaciones anatomopatológicas y bacteriológicas de rutina. Se llevó a cabo determinaciones de anticuerpos contra Nm mediante el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA) (método por fluorescencia), en tiempo 0 y al día 29 post vacunación primaria.

Estadísticamente se aplicó un análisis varianza ANOVA de clasificación triple sin interacción para explicar las variaciones de los niveles de anticuerpos según sexo, vía de inoculación y estado (placebo y vacunado) y prueba t de Students para la comparación de medias entre grupos y pruebas de proporciones para la bacteriemia.

Tabla 1. Diseño experimental

Grupos	Sexo	Cant. animales	Inoculados con	Vía de inoculación	Confrontado con
I	M	3	1	SC	B
	H	3	1	SC	
II	M	3	1	SC	C
	H	3	1	SC	
III	M	3	2	SC	B
	H	3	2	SC	
IV	M	3	2	SC	C
	H	3	2	SC	
V	M	3	1	IM	B
	H	3	1	IM	
VI	M	3	1	IM	C
	H	3	1	IM	
VII	M	3	2	IM	B
	H	3	2	IM	
VIII	M	3	2	IM	C
	H	3	2	IM	

M: Macho

H: Hembra

1: Vacunado con vacuna antimeningocócica

2: Placebo (hidróxido de aluminio)

B: *N. meningitidis* grupo BC: *N. meningitidis* grupo C

El esquema de inmunizaciones, extracciones, irritación y reto está resumido en la Tabla 2.

Tabla 2. Esquema de inmunizaciones, extracciones, irritación y reto

Tiempo en días	Dosis	Extracción	Irritación	Reto
0	1ra.	1ra.*		
28	2da.			
29		2da.*		
67			I**	
74				R***

* Extracción de sangre a través del plexo retroorbital, obtención del suero por centrifugación y conservación en congelación a -30°.

** Irritación con: AMT-1, dosis 7,5 mL vía IP.

*** Reto: se pasaron los animales a presión negativa. Se retaron con *N. meningitidis* serogrupo C y B. Concentración del inóculo: 10⁶ UFC/ mL. Dosis: 1 mL/animal.

Resultados y Discusión

Al analizar los resultados (Tabla 3) de la respuesta humoral (media de los valores de fluorescencia) contra la proteína B de Nm grupo B, se observó diferencias significativas en todos los casos al comparar los datos obtenidos antes de la vacunación con los observados 29 días después. Esto sucedió tanto en los vacunados como en el placebo con Al(OH)₃, lo que indica que hubo una respuesta humoral en ambos grupos y por las diferentes vías, aunque la respuesta de los placebos fue significativamente menor.

Al procesar los datos en el caso de los grupos relacionados con la respuesta contra Nm serogrupo C, se detectó que solamente hay diferencia estadística cuando se emplea la vía IM (c frente a d y j frente a k).

Por otra parte, sólo después de la vacunación tanto SC como IM es que se aprecian niveles ostensibles en la respuesta humoral contra Nm serogrupo B (b y d), lo cual no se observó en los placebos de este grupo ni en los vacunados y placebos contra Nm serogrupo C. Estos resultados demostraron que en la rata SPF se produce una respuesta humoral contra Nm B, sin embargo, contra Nm serogrupo C esto no sucede, lo cual justifica el hecho y bien conocido fenómeno de que los roedores son pobres productores de anticuerpos contra el polisacárido serogrupo C de Nm.

El hecho de observarse un ligero aumento significativo en los grupos placebos en su la respuesta humoral, sobre todo cuando se inyectó el gel de Al(OH)₃ por vía IM (c frente a d y l frente a k), lo cual pudiera obedecer al hecho de que estos animales tuvieron posiblemente expuestos al contacto con (Nm) dada la situación de estar

introducidos dentro de un aislador donde se produce la recirculación de aire, reafirma una vez más que este compuesto tiene efectos positivos en la respuesta humoral al igual que lo que sucede contra Nm serogrupo B, donde también hay un incremento en dicha respuesta por ambas vías. El papel protector de los anticuerpos contra Nm serogrupo B también experimentó un

verdadero incremento en dicha respuesta por ambas vías. Comparable con las obtenidas contra Nm en otras especies (ratones y monos) (3) y por (4 y 5) cuando utilizaron ratas de cinco días de nacidas protegidas previamente con anticuerpos monoclonales contra las proteínas clase 1 y 3 de Nm.

Tabla 3. Valores medios y desviación estándar (DS) de los niveles de anticuerpos determinados mediante SUMA contra Nm serogrupo B y Nm serogrupo C antes y 29 días después de la vacunación

Grupo	Vía	Momento	Anticuerpos contra B		Anticuerpos contra C			Valores de P contra Nm B	Valores de P contra Nm C
			Media	DS	Media	DS			
Vacuna	SC	Antes	6,30a	0,11	7,23a	0,49	Antes	ab: 0,0001	ab: NS
		Después	42,31b	10,50	7,20b	0,75	frente a	cd: 0,0001	cd: 0,001
	IM	Antes	6,42c	0,18	6,16c	0,15	después	hi: 0,001	hi: NS
		Después	51,76d	3,89	6,98d	0,47		jk: 0,001	jk: 0,001
Placebo	SC	Antes	6,34h	0,17	6,74h	0,24	Vacuna frente a placebo	bi: 0,001 dk: 0,0001	
		Después	8,57i	1,40	7,04i	0,67			
	IM	Antes	6,74j	0,87	6,94j	0,48			
		Después	9,06k	1,66	7,77k	0,64			

Al analizar la respuesta humoral relacionada con el sexo, vía, status vacunado y placebo (Tabla 4) mediante análisis de varianza, se observó diferencias significativas, tanto para la variable vía IM frente a SC ($P < 0,01$), como entre los animales vacunados y placebos ($P < 0,0001$); no existe

diferencia entre sexo, lo que significa que este no influye en la respuesta y que la vía intramuscular incrementa más los niveles de anticuerpos, sobre todo frente al Nm serogrupo B.

Tabla 4. Resultados del ANOVA en los niveles de anticuerpos contra la proteína B de Nm serogrupo B

Fuente	Gl	Suma de C.	C. Medios	F	Pr > F
Modelo	3	18258,5	6086,2	169,8	0,0001
Error	44	1577,6	35,9		
Total					
Corregido	47	19836,0			
Sexo (1)	1	126,6	126,6	3,5	0,0669
Vía (2)	2	253,5	253,5	7,1	0,0109
Status (3)	3	17878,5	17878,5	498,7	0,0001

(1) Sexo: Macho y hembra

(2) Vía: Intramuscular y subcutánea

(3) Status: Vacunado y placebo

En los resultados del reto con Nm serogrupo B se apreció que desde el punto de vista bacteriológico (Tabla 5), el ciento por ciento de los animales estudiados presentaron bacteriemia a las 3 horas postconfrontación, situación que se mantuvo durante las primeras 6 horas en los placebos, alcanzando el 81,8% y 54,5% a las 24 y 48 horas respectivamente. No obstante, en los vacunados a las 6 horas ($P < 0,005$) sólo el 36,4% mantenía bacteriemia positiva, y ya a las 24 horas ($P < 0,001$) y 48 horas ($P < 0,005$) estaban libres del germen. Además, en este grupo no se produjeron muertes en contra del 18,1% en los controles. Estos resultados ponen en evidencia la protección que confiere la vacuna en la rata SPF contra

Nm serogrupo B, siendo comparables con los obtenidos por (6) en ratas recién nacidas protegidas con inmunoglobulina antimeningocócica B/C.

Los resultados del reto con Nm C (Tabla 6) mostraron una bacteriemia muy similar, tanto en los vacunados como en los placebos con valores no significativos, y una mortalidad del 54,5% en ambos grupos. Esto sugiere que en la rata SPF la vacuna no tiene efectos protectores contra Nm serogrupo C, reafirmando lo antes expuesto de que estos animales poseen una pobre respuesta contra Nm serogrupo C, lo que está de acuerdo con lo planteado por (7) y difiere de lo observado en el humano por (8, 9).

Tabla 5. Diagnóstico mediante hemocultivo según producto administrado y mortalidad en tiempo post-reto con Nm B

Producto administrado	Tiempo post-reto (No. ratas %)					Total muertes
	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h	
Placebo n = 11	11/100,0 0/0,0	11/100,0 0/0,0	9/81,0 2/18,1*	6/54, 5 0/0,0	3/27,3 0/0,0	2/18,1
Vacunados n = 11	11/100,0 0/0,0	4/36,4 0/0,0	0/0,0 0/0,0	0/0,0 0/0,0	0/0,0 0/0,0	0/0,0

* Fallecen entre 7 y 12 horas.

Sin dudas, el efecto producido por la irritación previa del peritoneo contribuyó al logro de los objetivos que se perseguían en este ensayo, facilitando la presentación del proceso patológico donde intervienen diferentes mecanismos relacionados con la respuesta inmune como son los mediadores que controlan los distintos tipos de reacción inflamatoria, las cuales difieren entre sí, pues las de acción rápida como las aminas vasoactivas y los

productos del sistema de cininas son capaces de modular la respuesta (10), tanto en Nm serogrupo B como en el serogrupo C, vacunados y controles, haciéndose manifiesta la mayor intensidad de los síntomas y las muertes en los animales correspondientes al grupo control con relación a los vacunados cuando se retó con Nm grupo B, pues estos últimos tuvieron una pronta recuperación.

Tabla 6. Diagnóstico mediante cultivo de sangre según producto administrado y mortalidad en el tiempo post-reto con Nm C

Producto administrado	Tiempo post-reto (No. ratas %)				Total muertes
	3 h	6 h	24 h	48 h	
Placebos n = 11	11/100 0/0,0	11/100 2/18,1	4/36,3 3/27,2	4/36,3	5/45,4
Vacunados n = 11	11/100 0/0,0	10/90,0 0/0,0	3/27,2 5/45,4	1/9,09 1/9,09	6/54,5

Anatomopatológicamente los animales que murieron presentaron graves procesos congestivos agudos, graves meningitis fibrinopurulentas (Figura 1,2), especialmente los animales confrontados con Nm serogrupo C, similares a las descritas en ratas recién nacidas cuando fueron inoculadas con *H. influenzae* tipo B por (11, 12, 13, 14, 15) lo cual evidencia una eventual mayor virulencia de

esta cepa en la especie rata, toda vez que la concentración bacteriana utilizada en ambos tipos de Nm serogrupos (B y C) fueron iguales.

De esta forma queda iniciada una línea de desarrollo de un biomodelo evaluativo para este tipo de producto en ratas SPF, con reconocidas ventajas por su calidad genética y sanitaria.



Figura 1. Grave meningitis fibrinopurulenta en rata SPF control retada con *N. meningitidis* serogrupo C. H.E. x 180.

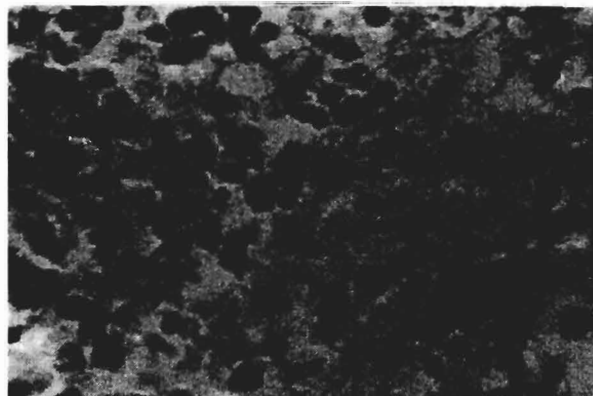


Figura 2. Infiltrado de células linfoides, macrófagos y células plasmáticas en aracnoides de una ratas SPF retada con *N. meningitidis* serogrupo C. H.E. x 280.

Referencias

1. Arko RJ, Balowa A. Animal models of experimental gonococcal infection. Experimental models. *Acta Microbiol. Chemotherapig.* 1986; 1: 355-369.
2. Arko RJ. Animal models for Pathogenic Neisseria Species. *Clinical Microbiology Reviews.* 1989; 17:56-59.
3. Cuba, Ministerio de Salud Publica. VA-MENGOC-BC Vacuna antimeningocócica contra meningococos de los grupos B y C. Estudio clínico controlados fase I. [Registro Médico Sanitario]. Cuba: Ministerio de Salud Publica; 1987. (N: 1133).
4. Seukkonen K, Abdillahi H, Poolman JT, Linonen M. Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B: 15, P:16 in Infant rat. Infection models: New propust for vaccine development. *Microbiol. Pathol.* 1987; 3:261-267.
5. Seukkonen K, Leinonen M, Kayhty H, Abillahi H, Poolman JT. Monoclonal antibodies to the rough lipopolysaccharide of *Neisseria Meningitidis* protects inf. rats from meningococcal infection. *J.Infect. Dis.* 1988; 158:209-211.
6. Infante JF, Marrero O, Sifontes S, et al. Evaluation of the efficacy of Human antimeningococal. Inmunoglobulin G in Infant Rats. Experimentally infected with *Neisseria meningitidis* Grup B. *Arch. Med Res.* 1994; 25(4):455-461.
7. Jennings HJ, Lugowk L. Immunochemistry of groups A, B and C meningococcal polysaccharide- Tetanies toxoid conjugates. *Journal of Immunology.* 1981; 127(3):1011- 1018.
8. Echeverr ML, Malberty JA, at al. Respuesta inmune humoral al polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C en un ensayo de vacunación antimeningocócica BC en Antioquia, Colombia. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 1995; 118 (4):295- 301.
9. Sierra VG, Campa C, García L, et al. Efficacy evaluation of the Cuban vaccine VA-MENGOC-BC against disease caused by sergruop B *Neisseria meningitidis*. In: Achtman M. *Neisseria 1990: Proceedings of the International Pathogenic Neisseria Conference, Berlin*, 1990. Germany: Walter de Grugter; 1991:129-134.
10. Proud D, Kaplan AP. Kinin formation: Mechanism and role in inflammatory disorders. *Annu. Rev. Immunol.* 1988; 6:49-83.
11. Salit IE. Experimental meningococcal infection in neonatal animals models for mucosal invasiveness. *Can. J. Micobiol.* 1984; 30:1022-1029.
12. Moxon ER, Smith AL, Averill DR, Smith DH. *Haemophilus influenzae*. Meningitis in Infant Rats after. Intranasal inoculation. *J. Infect. Dis.* 1974; 129(2):154 - 162.
13. Smith AL, Roberts MC, Haas JC, Stull TL, Mendelman PM. Mechanisms of *Haemophilus influenzae* type B meningitis. *Infect. Dis.* 1985:11- 21.
14. Smith AL, Greenfield MD, Toothaker RD. Experimental meningitis in the rat. *Haemophilus influenzae. Infection.* 1984; 12:11- 22.
15. Kaplan SL, Hawkins EP, et al. Invasion of the inner ear by *Haemophilus influenzae* type b in experimental meningitis. *Jornal Inf. Dis.* 1989; 159(5):923- 930.

SPF rats in experimental model of meningococcal disease in for the evaluation of VA-MENGOC-BC®.

II. Microbiological and immunologic study

Abstract

Massive vaccinations against the meningococcal disease with VA-MENGOC-BC® have been successfully carried out in Cuba, Brazil and other countries. The SPF rats (Specific Pathogen Free) have demonstrated their usefulness in the control of current variants of vaccines. This paper intends to demonstrate the possible differences between vaccinated and control (non-vaccinated) rats after a challenge with *Neisseria meningitidis* B and C with the aim of showing the protection conferred by VA-MENGOC-BC®. A total of 48 SPF Spreague Dawley rats of both sexes were used. Control animals were inoculated with aluminum hydroxide gel by intramuscular (I/M) or subcutaneous (S/C) route. The vaccinated animals were immunized with 0.25 mL of VA-MENGOC-BC using the same routes of administration. Microbiological studies of blood, anatomopathological studies of dead or sacrificed animals at the end of the experiment were carried out. The serum levels of antibodies were determined by means of the ultra-micro analytic system (SUMA). Data were statistically compared by analysis of variance. Animals that were vaccinated and challenged with Nm group B had an ephemeral bacteremia, while the controls remained bacteremic during a relatively long time. Mortality was low in the controls and none vaccinated rat died. Concerning the challenge with Nm group C, the bacteremic periods and mortality (54,5%) were similar in vaccinated and control rats. The results open a new line for the development of a biomodel for the evaluation of this type of product using the SPF rats that have recognized advantages from the genetic and sanitary point of view.

Key words: Meningococcal disease, SPF rats, usefulness, VA-MENGOC-BC

Recibido 9-1/97

Aprobado: 10-2/97