

Ensayo toxicológico a dosis única del producto vacunal Polisacárido Vi contra *Salmonella typhi* en ratones OF-1

Jorge Mayo Fernández¹, Juan F. Infante¹, Luis Riverón¹, Mildrey Fariñas¹, Julio Oramas¹, Viviana Pérez¹, Sergio Sifontes², Alina Miranda¹, Ainel Alemán¹.

¹ Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

² Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas, Cuba.

La fiebre tifoidea constituye una enfermedad de transmisión alimentaria de alta incidencia en el mundo subdesarrollado. Para su control por vacunación el Instituto Finlay ha desarrollado una vacuna cuyo principio activo es el polisacárido capsular Vi. Este producto vacunal fue sometido a una prueba para evaluar durante 14 días el efecto potencial de toxicidad a dosis única en ambos sexos en ratones de la línea OF-1, utilizando como dosis única 0,05 mL por vía intramuscular y 0,5 mL por vía subcutánea. Se comparó con controles negativos (animales no inoculados), controles positivos (inoculados con vacuna Mérieux Antitifoídica) y un grupo inoculado con solución buffer, en los mismos volúmenes y vías. Se comprobó la respuesta de seroconversión por la técnica ELISA. Fueron determinados los consumos de alimento y agua; los incrementos de pesos corporales, los pesos e índices relativos de bazo y timo; se realizó además un estudio del comportamiento clínico y examen anatomopatológico. Las variables evaluadas fueron comparadas mediante un análisis de varianza de clasificación doble (STATISTICA para Windows) y se utilizó el test de Diferencias Mínimas Significativas (LSD). Los valores de ($P < 0,05$) fueron considerados estadísticamente significativos. La seroconversión no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo polisacárido Vi y control positivo, mientras que ambos grupos difirieron del grupo control negativo para un valor de significación de ($P < 0,001$). No se evidenciaron signos de toxicidad en el estudio clínico y anatomopatológico, no ocurrieron muertes durante el experimento. Los consumos de alimento, agua, los incrementos de peso y los pesos de bazo no mostraron diferencias significativas entre grupos de tratamientos. Los índices relativos de bazo, pesos de timo e índices relativos de timo mostraron diferencias estadísticas entre el grupo polisacárido Vi y el grupo buffer ($P < 0,05$). El grupo polisacárido Vi no difirió del grupo control negativo. Se concluye que el producto vacunal (Polisacárido Vi) no mostró toxicidad por dosis única para ambos sexos en el modelo ratón OF-1, en las vías y dosis utilizadas, por lo que se considera inocuo el preparado vacunal en esta especie.

Palabras claves: Vacuna, antitifoídica, toxicología, ratón, *Salmonella typhi*.

Introducción

La fiebre tifoidea o fiebre entérica constituye una enfermedad infectocontagiosa sistémica de comienzo insidioso caracterizada por fiebre elevada y continua, cefalea intensa, malestar general y trastornos digestivos, caracterizados más frecuentemente por estreñimiento que por diarrea; se presentan eritemas ocasionales en la piel y afectaciones en muchos otros órganos vitales. La incidencia mundial del padecimiento es de 17 millones de casos con un 10% de morbiletalidad (1). Se ha confirmado por las autoridades sanitarias internacionales la existencia de cepas resistentes a los tratamientos tradicionales en Asia, Medio Oriente y América Latina. Según la misma fuente las edades comprendidas entre 5 y 19 años son las más afectadas (1).

En Cuba se han presentado algunos brotes aislados en varias provincias constituyendo las principales zonas endémicas Santiago de Cuba, Villa Clara y el municipio de Jagüey Grande (Matanzas). La dirección de Salud Pública del país ha trazado la estrategia de sustituir la vacuna de células enteras,

debido a su alta reactogenicidad, por una vacuna a partir del antígeno capsular Vi purificado.

La necesidad de prevenir la infección de *Salmonella typhi* por medio de la vacunación, fundamentalmente en las poblaciones jóvenes, ha llevado a numerosos laboratorios en el mundo a desarrollar investigaciones en este sentido, más si se trata de una enfermedad con carácter cosmopolita y caracterizada por una alta capacidad de diseminación del agente etiológico, fundamentalmente en zonas de baja infraestructura sanitaria donde las medidas de coberturas higiénicas son insuficientes para constituir barreras frente a las epidemias (2). La fiebre tifoidea constituye una enfermedad endémica en América Latina y el Caribe, lo cual dificulta su control, más si se tiene en cuenta que las poblaciones de casos subclínicos son de mayor importancia que los casos clínicos desde el punto de vista de la liberación de los agentes etiológicos al medio ambiente, constituyendo la principal fuente de contaminación de los alimentos y el agua. En el caso de los convalecientes de la enfermedad no tratados por los servicios de salud, sufren recaídas entre un

5% y un 10%, y de estos un estimado de un 3% se convierten en portadores permanentes (3).

Un problema a resolver por los vacunólogos actualmente constituye la elaboración de preparados vacunales que al mismo tiempo que conserven o aumenten la capacidad inmunogénica con respecto a las vacunas tradicionales, constituyan productos poco tóxicos para el receptor vacunado.

Para ello existen estrategias de investigación-desarrollo que van desde vacunas conjugadas hasta la utilización de la ingeniería genética empleando como antígeno el polisacárido capsular Vi, con el cual se obtienen altas respuestas de anticuerpos (4,5).

En el presente trabajo se estudió las posibles evidencias de toxicidad a dosis única en el modelo ratón, línea OF-1, del producto vacunal a partir del polisacárido Vi elaborado en el Instituto Finlay, utilizando para ello un ensayo toxicológico de dosis única.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 110 ratones (40 hembras y 70 machos) línea OF-1 suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) con su correspondiente certificado de salud y calidad genética, con un peso entre 18 y 22 gramos y una edad de 6-8 semanas. Estos fueron distribuidos aleatoriamente en 8 grupos con un total de 15 animales por sexos (a razón de 5 animales por caja), excepto los grupos 4 y 7 conformados por 5 animales de cada sexo. Los mismos fueron mantenidos en cajas de macrolón tipo T2 en condiciones convencionales, el suministro de agua y alimento fue controlado en cantidades que permitieran el consumo *ad libitum*.

1. **Comportamiento:** Se determinó por medio de la observación, dos veces al día, la conducta de los animales, ocurrencia de muertes, aparición de síntomas

Diseño experimental

| Grupo | N | Producto | Dosis mL | Vía | Sexo |
|-------|----|---------------|----------|-----|------------|
| 1 | 15 | Vacuna* | 0,05 | IM | 10 M Y 5 H |
| 2 | 15 | Buffer | 0,05 | IM | 10 M Y 5 H |
| 3 | 15 | Control | - | - | 10 M Y 5 H |
| 4 | 10 | Control (+)** | 0,05 | IM | 5 M Y 5 H |
| 5 | 15 | Vacuna | 0,5 | SC | 10 M Y 5 H |
| 6 | 15 | Buffer | 0,5 | SC | 10 M Y 5 H |
| 7 | 10 | Control (+)** | 0,5 | SC | 5 M Y 5 H |
| 8 | 15 | Control | - | - | 10 M Y 5 H |

como piloerección, postración, reacciones inflamatorias en el punto de inoculación, cambios apreciables de frecuencia respiratoria, u otros que pudieran ocurrir.

El comportamiento del incremento en peso se determinó por medio del pesaje individual previa identificación por marcaje de los animales en los diferentes grupos, utilizando una balanza analítica Sartorius en tiempo 0, 72 horas, 7 y 14 días .

2. **Consumo de alimento y agua:** La determinación del consumo de agua se realizó midiendo con una probeta graduada la diferencia entre el volumen de agua suministrado (200 mL) y el remanente del frasco al momento de la lectura. El consumo de alimento se determinó por pesaje calculando la diferencia entre la máxima cantidad suministrada al inicio (250 g) y el remanente en cada medición. Diariamente se restituyeron tanto los 200 mL de agua como los 250 g de alimento una vez realizadas las mediciones
3. **Estudio anatomopatológico:** Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de Pentobarbital sódico: 50 mg/kg por vía intraperitoneal. Se utilizó el método de rutina para la observación de posibles lesiones macroscópicas en el 100% de los ratones. Se realizó pesaje y cálculo del peso relativo de bazo y timo como órganos centrales de la actividad inmunológica. El pesaje se llevó a cabo por medio de una balanza analítica Sartorius.

Se tomaron muestras para histopatología de dos animales por grupo de los siguientes órganos: fragmentos de piel y músculo en el punto de inoculación, sistema nervioso central (SNC), corazón, pulmón, hígado, bazo, timo, estómago, intestino y ganglios mesentéricos. Las mismas fueron fijadas en formalina neutra al 10%, procesadas por la técnica de inclusión y cortes en parafina, coloreados con hematoxilina y eosina.

Leyenda:

* Producto Vacunal en ensayo polisacárido Vi lote 8001.

**Control positivo, vacuna antitifoídica Mérieux lote M1226.

IM Intramuscular.

SC Subcutánea.

| Composicion de la vacuna | Unidades |
|------------------------------------|------------------------------|
| Antígeno capsular polisacáridos Vi | 0,025 mg purificado |
| Solución buffer isotónica fenolada | 0,5 mL con 1,250 mg de Fenol |

Para la selección de las vías se tuvo en cuenta la vía intramuscular que es la que se propone para el programa de vacunación, y la subcutánea porque admite un volumen mayor. En cuanto a las dosis, expresan los volúmenes máximos permisibles para ambas vías utilizadas.

Este protocolo y los métodos de eutanasia se aprobaron por la comisión de ética departamental. Las variables evaluadas se compararon mediante un análisis de varianza de clasificación doble (STATISTICA para Windows) y se utilizó el test de diferencias mínimas significativas (LSD). Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Las muestras de sangre para la evaluación serológica se tomaron por punción del seno venoso retroorbital por medio de tubos capilares heparinizados 75 mm x 1,4-1,6. Se utilizó la técnica ELISA para la demostración de títulos de anticuerpos.

Resultados y Discusión

La respuesta de seroconversión demostrada por la técnica ELISA fue apreciable tanto en el grupo polisacárido Vi como en el Control positivo al mostrar cada uno de ellos diferencias significativas en comparación con el grupo control negativo ($P < 0,001$); no se evidenciaron diferencias estadísticas entre el grupo polisacárido Vi y el control positivo (Gráfico 1). Lo cual evidencia la alta capacidad inmunogénica del producto evaluado, así como la demostración de la similitud de este preparado con una vacuna comercial de comprobada eficacia. Ello avala la utilización de vacunas a partir del polisacárido Vi purificado en dosis única por vía parenteral (6). El hecho de ser vacunas cuyo antígeno está químicamente definido, brinda la posibilidad de conjugarlo con antígenos de otras enfermedades (6).

El comportamiento clínico no mostró evidencia de toxicidad, no se observaron trastornos tales como: aumento de la sensibilidad (hiperestesia), ataxia, postración u otros indicadores de neurotoxicidad. No se presentaron trastornos en la piel, ni aumento de la frecuencia respiratoria. No existió mortalidad en ningún grupo del ensayo y la conducta general fue estable, lo cual corrobora la inocuidad de vacunas a partir del polisacárido Vi (7) en este caso en ratones OF1.

El incremento de peso tuvo un comportamiento normal. No se constataron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto a esta variable ni con relación al consumo de alimento y agua. Solo el consumo de alimento y ganancia de peso mostró diferencias entre los sexos ($P < 0,05$), quizás debido a sus conocidas diferencias fisiológicas (8,9). Estas evidencias clínicas coinciden con la alta tolerancia, la

poca reactividad local y sistémica descritas para vacunas constituidas por polisacárido Vi (10,11).

El estudio anatomopatológico macroscópico realizado no evidenció lesiones de valor diagnóstico. En el estudio histopatológico no se observaron alteraciones atribuibles a reacciones de toxicidad en el punto de inoculación; aspecto este muy importante si se tiene en cuenta la tendencia de los productos vacunales a inducir cambios en los tejidos cuando se utilizan las vías IM y SC para la inoculación de inmunógenos, (12,13). No se demostró la existencia de lesiones sistémicas típicas de un cuadro tóxico por dosis única desencadenadas por el producto en ensayo, más bien las lesiones incidentales encontradas tales como: degeneración vacuolar de los hepatocitos, microhemorragias en la corteza del riñón y hemorragias focales en pulmón; pudieran atribuirse al efecto de una dieta rica en carbohidratos, en el caso de las primeras y al proceso de muerte en las otras.

El estudio de peso de bazo no arrojó diferencias significativas entre los grupos. El índice relativo de bazo mostró diferencias significativas entre el grupo polisacárido Vi y el control positivo (vacuna Mérieux $P < 0,05$), lo cual consideramos de escaso valor toxicológico si tenemos en cuenta que no existieron diferencias entre el grupo polisacárido Vi y grupo control negativo (Gráfico 2).

En cuanto al peso de timo e índice relativo de timo el grupo polisacárido Vi no difiere del grupo control negativo pero sí del grupo buffer ($P < 0,05$) (Gráfico 3). Esta respuesta se puede considerar anormalmente alta, pero desde el punto de vista toxicológico estas diferencias son despreciables, ya que los estudios de peso de timo y los anatomopatológicos no evidencian alteración de este órgano.

Estos resultados son interesantes si consideramos la alta inocuidad de este preparado vacunal, lográndose de esta manera que se reduzcan al mínimo los efectos indeseables tales como reacciones en el punto de inoculación y reacciones de toxicidad sistémica, cumpliendo de esta manera con las regulaciones nacionales e internacionales establecidas (14,15,16).

Sobre la base de los resultados, a través de las investigaciones realizadas establecemos que el producto vacunal a partir del polisacárido Vi, en dosis única, no desarrolló toxicidad a dosis única por vía IM y SC mientras desencadenó una adecuada seroconversión en la línea de ratones O-F1.

Gráfico 1. Nivel de anticuerpos inducidos en ratones

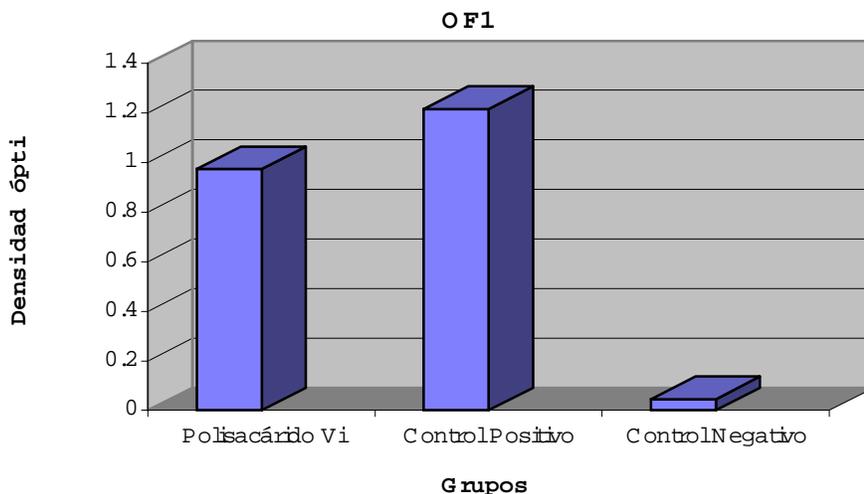


Gráfico 2. Índice Relativo de Bazo

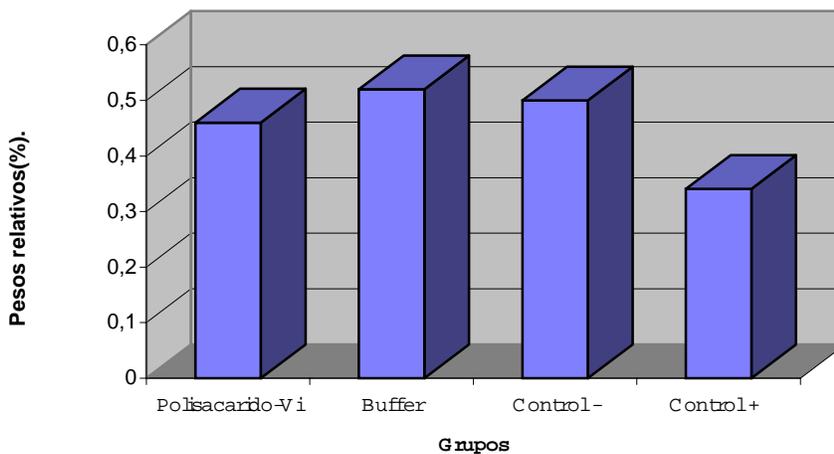
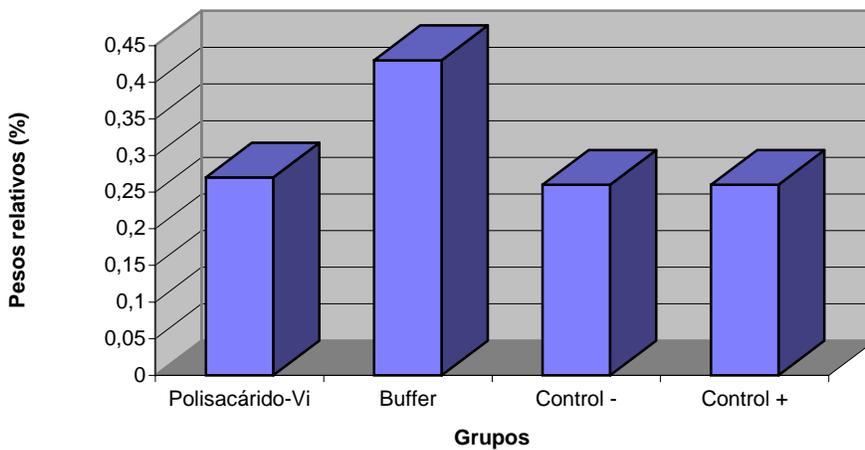


Gráfico 3. Índice Relativo de Timo



Referencias

1. Benenson Abram S. *Manual para el control de enfermedades transmisibles*. Ed. OPS XVI; 1997.
2. OPS. IX Reunión Interamericana de Salud. Nivel ministerial [Informe final]. Washington; 1995.
3. Jawetz; Melnier; Adelberg; Brookes y Ornston. *Microbiología médica*. Ed. El Manual Moderno; 1996.
4. Szu S.C; Taylor D.N; Trofa *et al*. Laboratory and preliminar clinical characterization of Vi capsular polysaccharide conjugate vaccines. *Infect. Immune*. 1994; 62(10):4440-4444.
5. Morona, R. Mona, JK *et al*. Construction of K88 and expressing clones of *Salmonella typhimurium* g30: Immunogenicity following oral administration to pigs. *Vaccine*. 1994;12(6): 513-517.
6. Stanley A., Plotkin M.D. Nancy Boyuveret, L C. A new typhoid vaccine composed of the Vi capsular Polysaccharide. *Arch. Intern. med*. 1995; 155.
7. Shepard D.S., Walssh J.A. Kleinan, E. Stansfield S. and Bhalotra S. Stting priorities for the Children's vaccine initiate. A cost-effectiveness approach. *Vaccine*. 1995; 13(8):707-714.
8. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa;1980.
9. Iffa Credo Laboratory. *Animals technical manual*. Ed. Imprimeric A. Fayolle Villeurbanne; 1984.
10. Shousun,C. Szs, Xiu, Ruli, Andrey L, Stone and John B. Robbins. Relation between structure and immunology properties of the Vi capsular polysaccharide *Infect. Immun*. 1991; 59(12): 4555-4561.
11. Myron M. Levine. MD Vaccines typhoid, In Stanley H. Plotkin MD and Edward A. Mortimer. *Vaccines*. Second Edition; 1994:597-604.
12. Infante Juan F., Sierra G. Concepción C. H., Capó Virginia, Muñoz E. y Pérez Viviana. Evaluación anatomopatológica y serológica en ratones vacunados con VA-MENGOC-BC® por vía intramuscular. *VacciMonitor*. 1997;(9):10-14.
13. Infante Juan F., Sifontes RS, Pérez RP., González RP., Marrero ChO. y Fariñas Mildrey. Toxicología de VA-DIFTET por aplicación a dosis única en ratones. *Revista Española de Toxicología*. 1998;15:61-65.
14. Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines. London; 1997.
15. Regulaciones metodológicas para la evaluación toxicológica preclínica de medicamentos. No. 151,1993.
16. Regulaciones metodológicas para la evaluación toxicológica preclínica de medicamentos. No. 152,1993.

Single dose toxicity assay in OF-1 mice of the experimental Vi Polysaccharide Vaccine

Abstract

Typhoid fever is a food-born disease of high incidence in developing countries. Finlay Institute has developed an anti-typhoid vaccine based on the capsular polysaccharide Vi. Several tests have been performed to evaluate the safety of such vaccine; among them a single dose (14 days of observation) toxicity test in both sexes of OF1 mice. A unique dose of either 0,05 or 0,5 mL by intramuscular or subcutaneous routes was applied. Negative control animals (non-inoculated mice), positive control (mice inoculated with Merieux Anti-Typhoid Vaccine) and mice inoculated with phosphate-buffered saline (buffer group) were compared to those treated with the experimental Polysaccharide Vi vaccine. Antibody titers was determined by ELISA. Water and food intakes, body weight, thymus and spleen absolute and relative weights were compared by two-way analysis of variance and the Least Significant Difference test (LSD). Values of P under 0,05 were considered statistically significant. Mean antibody titers in the vaccine and positive control groups were statistically similar; but, highly different ($P < 0,001$) from the negative control group. Clinical and anatomopathological studies did no detect any overt sign of toxicity. Water and food intakes, body weight increases and the weight of the spleens did not show significant differences ($P < 0,05$) among the four experimental groups. However, the spleen relative weight and the thymus relative and absolute weights evidenced statistically significant differences ($P < 0,05$) between the vaccine and control groups (Nevertheless, the vaccine group was similar to the negative control). Results demonstrated that the experimental Polysaccharide Vi vaccine is safe for this species because no sign of toxicity was found in any of the sex after the administration of the vaccine by intramuscular or subcutaneous routes.

Keywords: Vaccine, anti-typhoid, toxicology, mice, Vi polysaccharide, *Salmonella typhi*.