

Estudio de tolerancia local de la vacuna vax-TyVi® en ratas Sprague Dawley

Eligio Sosa Roble, Sergio Sifontes Rodríguez, Juan Francisco Infante Bourzac, Daiyana Díaz Rivero, Yulieé López Fera, Viviana Pérez Amat, Tamara Hernández Salazar, Luis Riverón Martínez, Yolanda Valdés Abreu, Isabel García Riva, Mildrey Fariñas Medina, Elina Parajón Góngora, Niurka Rodríguez González

Instituto Finlay. Centro de Investigación- Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: esosa@finlay.edu.cu

La vacuna antitifoídica vax-TyVi® consiste en una preparación de polisacárido capsular Vi de *Salmonella typhi*, el cual es diluido en una solución buffer isotónica solución amortiguador, a la que se le añade fenol como preservativo. Cada dosis de 0,5 mL contiene 25 µg de polisacárido como sustancia activa. En nuestro país el esquema de vacunación contra la fiebre tifoidea con vax-TyVi® se aplica a los alumnos de 9-10 años (5^{to} grado), una 2da dosis a la edad de 12-13 años (8^{vo} grado) y una 3ra dosis a la edad de 16-17 años (11^{no} grado). Además, es vacunado el personal de riesgo de Salud Pública y el personal que manipula alimentos. En el presente trabajo se describe el ensayo de tolerancia local llevado a cabo con la vacuna vax-TyVi® durante su fase de estudios preclínicos, actualmente utilizada en la vacunación contra la fiebre tifoidea en Cuba. Se empleó un total de 170 ratas que fueron tratadas con la vacuna, su placebo (todos los componentes, excepto la materia prima activa), o que no recibieron tratamiento alguno (controles). Se realizaron observaciones clínicas diarias durante todo el ensayo, se determinó el consumo de agua y alimentos y se realizaron investigaciones anatomopatológicas a animales sacrificados 3, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días después de la inoculación. No se observaron muertes ni síntomas de toxicidad; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos vivos, el consumo de agua ni el de alimentos entre los grupos del ensayo. Tampoco se observaron lesiones anatomopatológicas que indicaran toxicidad por parte del producto inoculado. Los resultados permitieron concluir que la potencialidad de la vacuna vax-TyVi® para producir efectos adversos locales es baja.

Palabras claves: Toxicología, tolerancia local, vax-TyVi®, ratas

Introducción

La fiebre tifoidea es una enfermedad bacteriana sistémica, de alta incidencia, fundamentalmente en el mundo subdesarrollado. *Salmonella typhi* es su agente causal, un bacilo gramnegativo. A pesar de ser una enfermedad conocida desde hace tiempo continúa siendo un problema de salud mundial. Los grupos poblacionales que presentan mayor riesgo para desarrollar esta enfermedad son los niños y jóvenes de 5-19 años en áreas endémicas o personal que visite estas áreas.

En 1934, Félix y Pit (1) descubrieron un polisacárido capsular que cubría a *S. typhi*, al que llamaron antígeno Vi, debido a su relación con la virulencia en ratones y su capacidad de inducir respuesta inmune en conejos. Las antiguas

vacunas parenterales de células enteras inactivadas de *S. typhi* confieren una protección eficaz frente a la fiebre tifoidea, pero son poco toleradas por niños y adultos debido a las frecuentes reacciones adversas sistémicas y locales que provocan (2, 3). Esto, unido al criterio existente de que los anticuerpos contra el polisacárido capsular Vi de *S. typhi* tenían función protectora, trajo consigo que se llevaran a cabo estudios para desarrollar una vacuna constituida por polisacárido Vi. Desde 1994, se dispone de una vacuna polisacáridica contra *S. typhi*, (Typhim Vi), producida por Pasteur- Merieux, que ha sido licenciada y aprobada en más de 9 países (4).

Hasta el año 2002 en nuestro país el programa de vacunación contra la fiebre tifoidea contemplaba la inmunización con una vacuna de

células enteras, conocida por su reactogenicidad, en las edades de 9-10 años (5^{to} grado) dos dosis, y posteriormente una dosis de reactivación a la edad de 12-13 años (8^{vo} grado), edades incluidas en el grupo etéreo reportado como de mayor incidencia en Cuba (5). Actualmente se utiliza la vacuna polisacáridica vax-TyVi[®], la cual es bien tolerada (15).

El presente estudio se llevó a cabo durante el desarrollo preclínico de esta vacuna y permitió su evaluación al aplicarla por vía intramuscular en dosis única. El diseño experimental contempló la inoculación intramuscular de ratas Sprague Dawley y su sacrificio en diferentes tiempos postinoculación para estudiar el desarrollo de las lesiones. Este diseño se basó fundamentalmente en la información recopilada de la Resolución No. 152/92 MINSAP, Pautas de la OECD para la Evaluación de Fármacos (6), los Estándares de Medicamentos de la Comunidad Europea (7,8) y las Normas de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (9,10).

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

Para este estudio se utilizaron ratas Sprague Dawley de ambos sexos, de 5 a 6 semanas de edad, con un peso corporal de 150-200 g, suministradas por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). La rata es la especie roedora de preferencia para este tipo de estudio y la línea Sprague Dawley está suficientemente caracterizada y ha sido ampliamente usada por su gran sensibilidad en los estudios de toxicidad (5).

Distribución, alojamiento y condiciones de adaptación

Las ratas se distribuyeron al azar en grupos de 5 animales de igual sexo por caja y se mantuvieron en adaptación durante 7 días antes del comienzo del experimento. Concluida la adaptación se seleccionaron las ratas necesarias para conformar los grupos experimentales. En dicha selección se tuvo en cuenta que los animales estuvieran clínicamente sanos, que los pesos fueran los más homogéneos posibles y que fueran estadísticamente similares. Esto último se verificó mediante un análisis de varianza de clasificación doble (tratamiento por sexo) y la prueba de Kruskal Wallis (tratamientos por sexos

separados). En estos análisis se consideró significativo un valor de $P < 0,1$.

Los locales de los animales mantuvieron una temperatura de 20-25 °C y una humedad relativa de 60-65%. Se empleó un ciclo de 10 h luz-14 h oscuridad. La temperatura y humedad de los locales se registraron dos veces al día. La alimentación consistió en pienso especializado para ratas y ratones suministrado y certificado por el CENPALAB. Se suministró agua potable *ad libitum*.

Sustancia de ensayo

La sustancia de ensayo fue la vacuna de polisacárido Vi de *S. typhi* (vax-TyVi[®]), cuya composición por unidad de dosis es la siguiente:

Polisacárido Vi de	25 µg
Fenol	1,00 mg
Cloruro de sodio	4,15 mg
Hidrógeno fosfato de	65 µg
Dihidrógeno fosfato de	23 µg
Agua para inyección	0,5 mL

Procedimiento de tratamiento y rango de dosis

Se realizó una inoculación el día 0 a todos los animales, excepto los del grupo control. La administración del tratamiento se ejecutó entre las 9:00 y las 11:00 a.m. Se aplicaron 0,3 mL por vía intramuscular, en la región media posterior de la cara interna del muslo izquierdo. Se emplearon jeringuillas de 1 mL con agujas 25Gx1", con un tope de goma que permitió penetrar en el músculo solamente 4-5 mm.

La dosis de vacuna propuesta para uso clínico en humanos es de 0,5 mL. El volumen que se administró a las ratas en el ensayo fue el máximo permisible por vía intramuscular en esta especie. Esta dosis de 0,3 mL representa, por alometría, aproximadamente 4,2 veces la dosis humana, lo cual ofrece un margen de seguridad satisfactorio. La vía de administración usada es la misma propuesta para uso clínico.

El estudio de tolerancia local tuvo una duración de 49 días, incluyendo el período de adaptación y el tiempo adicional hasta el sacrificio de los animales centinelas. En la Tabla 1 se resume el número de animales por grupo de tratamiento, con sus subgrupos según sexo y tiempo de sacrificio con respecto al momento de la inoculación (170 ratas en total).

Tabla 1. Diseño de grupos y número de animales a sacrificar por cada tiempo

Grupo	Tratamiento	Sexo	Tiempo de sacrificio (días) y número de animales a sacrificar						
			3	7	14	21	28	35	42
I	Control no inoculado	Hembras	5	5	5	5	5	-	-
		Machos	5	5	5	5	5	-	-
II	Placebo	Hembras	5	5	5	5	5	-	-
		Machos	5	5	5	5	5	-	-
III	Vacuna en ensayo (Poli Vi)	Hembras	5	5	5	5	5	5	5
		Machos	5	5	5	5	5	5	5

OBSERVACIONES

Síntomas Clínicos

Se realizó la exploración clínica de los animales dos veces al día durante las primeras 72 h y luego diariamente, prestando especial atención a la manifestación de los síntomas siguientes: claudicación, inflamación del sitio de inoculación, piloerección, postración, movimientos involuntarios, ataxia, salivación, lagrimeo, excitación, incoordinación. No obstante se concibió el registro de cualquier síntoma manifestado por los animales.

Peso corporal

Los animales fueron pesados al comienzo y fin del período de adaptación, en aras de seleccionar los que participarían en el estudio. Asimismo, se realizaron pesajes a todos los animales sobrevivientes los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días después de realizada la inoculación.

Consumo de agua

El volumen de agua se registró tres veces por semana (días alternos). Para ello, se depositaron 750 mL de agua en el frasco; se midió el remanente de agua y calculó, por diferencia, el volumen consumido por el grupo. Para el cálculo del consumo medio diario por animal, esta diferencia se dividió entre el número de animales de la caja y el número de días transcurridos desde la última medición.

Consumo de alimentos

El consumo de alimentos se midió de un modo similar al de agua, con la excepción de que al inicio y cada vez que se hizo una medición se completaron en las tolvas de las cajas de 500 g de pienso. Con ayuda de una balanza técnica se

pesó el alimento remanente y se calculó el consumo medio diario por animal, como se describió para el agua. Además, se calculó el consumo de alimento (g) por kilogramo de masa corporal dividiendo el consumo medio diario entre el peso vivo medio de los animales durante la semana correspondiente.

Estudio Anatomopatológico

A los días 3, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de la aplicación del tratamiento, se sacrificaron animales para estudios anatomopatológicos según se indica en la Tabla 1. El sacrificio se realizó por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg/Kg).

Se examinaron todos los órganos y se tomaron muestras del músculo a nivel del sitio de inoculación, los ganglios linfáticos poplíteo izquierdo e inguinal profundo izquierdo. Asimismo, se tomaron muestras de aquellos órganos que tuvieran alguna alteración al análisis macroscópico. Las muestras de tejidos fueron fijadas durante las primeras 24 h con formaldehído al 10% neutralizado con carbonato de calcio. Luego se redujo la concentración del fijador al 4% hasta su inclusión en parafina. Los cortes se realizaron a un espesor de 4-6 μ m usando un micrótomo modelo Leyca 1400. La dirección y el número de secciones fueron hechas según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para la evaluación de productos tóxicos. Los tejidos fueron coloreados con Hematoxilina – Eosina. Las observaciones se realizaron con microscopios convencionales Leyca y Olympus (modelos DMLB y CH-2 respectivamente). Se hizo una descripción detallada de las observaciones recolectadas en

los modelos de datos primarios destinados a necropsia e histopatología.

Análisis estadístico

Peso corporal

Se realizó un análisis de varianza de mediciones repetidas con tres factores (tratamiento x, sexo x, tiempo), la prueba de Kruskal Wallis y el ANOVA de Friedman.

Consumo de agua y alimentos

Para realizar el análisis estadístico de estas dos variables se hicieron tres grupos de observaciones en el tiempo. Estos grupos de valores se corresponden, aproximadamente, con las semanas postinoculación. El objetivo de este proceder (bloqueo) fue evitar un incremento innecesario del error experimental. Se comparó el consumo mediante análisis de varianza de clasificación triple (tratamiento x, sexo x, tiempo). La prueba de diferencias significativas mínimas se realizó para comparar el consumo entre semanas.

Paquete estadístico y nivel de significación

Para todos los análisis se empleó el paquete estadístico STATISTICA 5.1 D (13). Los valores de $P < 0,05$ se consideran significativos desde el punto de vista estadístico.

Resultados y Discusión

Mortalidad y signos clínicos

No se produjo ninguna muerte durante el ensayo ni se observaron síntomas clínicos.

Peso corporal

El análisis de varianza de mediciones repetidas mostró que el peso corporal (Tabla 2) fue similar en los grupos de tratamientos ($P > 0,1$). Los machos mostraron mayor peso corporal que las hembras ($P < 0,001$) y se produjo un aumento progresivo del peso de los animales, observándose diferencias entre las distintas semanas postratamiento ($P < 0,001$). Solamente se encontró una interacción significativa entre el sexo y el tiempo ($P < 0,001$), reflejo del diferente ritmo de crecimiento de hembras y machos. Se realizaron, además, pruebas no paramétricas con el objetivo de corroborar los resultados del ANOVA, empleando pruebas menos sensibles al tamaño de las muestras e independientes de requisitos como la normalidad y homogeneidad de varianzas. Para ello se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, analizando cada vez un sexo y un tiempo. En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas ($0,19 \leq P \leq 0,96$). Asimismo, se realizó el ANOVA de Friedman para evaluar el incremento de peso en el tiempo, corroborándose un aumento significativo ($P < 0,001$) para todos los grupos, tanto de hembras como machos.

Tabla 2. Peso vivo promedio (g) de los animales durante el ensayo.

Sexo	Tratamiento	7 días		14 días		21 días		28 días	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Hembras	Control	197,0	4,6	214,0	3,9	228,4	6,9	256,0	18,2
	Placebo	200,2	6,1	224,4	7,3	236,0	11,1	255,6	17,3
	Vacuna	201,6	12,7	225,9	14,4	243,0	15,4	259,7	20,9
Machos	Control	265,	17,6	307,6	18,3	340,4	18,5	366,4	25,7
	Placebo	286,0	23,8	322,2	27,2	365,4	31,8	389,2	28,9
	Vacuna	274,3	16,8	322,9	20,7	359,2	23,5	388,3	28,1

DE: Desviación estándar.

Consumo de Alimentos

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,1$) entre los tratamientos en cuanto al consumo de alimento (Tabla 3). Los machos mostraron mayor ($P < 0,01$) consumo que las hembras (31,0 vs. 25,7 g/día) y se

produjo un aumento significativo ($P < 0,01$) de la ingestión de alimento durante el transcurso del experimento. No hubo interacción significativa entre ninguno de los factores ($P > 0,05$) con relación al consumo de alimento.

Tabla 3: Consumo de alimento promedio (g) por animal/día según sexo, grupo tratamiento y tiempo post-inoculación (semanas)

Tiempo (semanas)	Hembras				Machos			
	I	II	III	Media	I	II	III	Media
1	20,5	21,5	20,8	21,0	25,4	28,3	33,3	29,0
2	21,0	19,6	21,1	20,6	25,0	29,0	39,6	31,2
3	26,6	25,9	28,8	27,1	29,4	37,6	27,0	31,4
4	32,5	33,3	36,7	34,2	34,1	31,0	31,8	32,3
Media por grupo	25,2	25,1	26,9	25,7*	28,5	31,5	33,0	31,0*

I: Control, II: Placebo, III: Vacunados

*Medias por sexo.

Consumo de Agua

El consumo de agua (Tabla 4) fue similar en los grupos de tratamiento ($P > 0,5$), los machos consumieron más ($P < 0,001$) que las hembras (39,5 vs. 31,8 mL/día) y solo durante la última semana este se incrementó significativamente

($P < 0,001$). Esta variable no mostró interacción significativa ($P > 0,1$) entre ninguno de los factores analizados. Lo mismo el consumo de agua que el de alimento se encontraron entre los rangos normales descritos para esta especie y categoría de animales (14).

Tabla 4: Consumo de agua promedio (mL) por animal / día según sexo, grupo tratamiento y tiempo postinoculación (semanas)

Sexo	Semana	Tratamiento	No.	Medias de consumo		
				Por grupo	Por Semana	Por Sexo
Hembras	1	Control	15	26,7	28,0	31,8
		Placebo	15	28,0		
		Vacuna	15	29,3		
	2	Control	15	24,9	25,8	
		Placebo	15	26,5		
		Vacuna	15	26,0		
	3	Control	15	28,4	28,9	
		Placebo	15	27,7		
		Vacuna	15	30,7		
	4	Control	15	42,4	44,3	
		Placebo	15	43,6		
		Vacuna	15	47,0		
Machos	1	Control	15	31,5	30,9	39,5
		Placebo	15	29,1		
		Vacuna	15	32,1		
	2	Control	15	31,9	32,4	
		Placebo	15	36,1		
		Vacuna	15	29,1		
	3	Control	15	41,9	40,8	
		Placebo	15	37,2		
		Vacuna	15	43,3		
	4	Control	15	50,2	53,9	
		Placebo	15	52,9		
		Vacuna	15	58,5		

Media general: 35,6 mL/día

Estudio Anatomopatológico

Macroscópicamente no se vio ninguna lesión de valor diagnóstico. A la observación microscópica, sin embargo, se encontró una miositis intersticial focal leve en el área correspondiente al punto de inoculación en una hembra y un macho del grupo control (sin tratamiento alguno) sacrificados a los 3 días después de la inoculación. Asimismo, una rata placebo sacrificada a los 7 días mostró una lesión similar a la anteriormente descrita, pero con ligera proliferación de tejido conectivo. Estos hallazgos carecen de valor toxicológico considerando su levedad y su ausencia en los grupos tratados con el producto vacunal ensayado.

Considerando que no se observaron muertes durante el ensayo ni se registraron síntomas que indicaran toxicidad local ni sistémica que el peso vivo de los animales, así como el consumo de agua y alimentos no mostraron diferencias entre grupos tratamiento que indicaran toxicidad del producto probado y que no se observaron lesiones anatomopatológicas de interés toxicológico, llegamos a la conclusión de que la Vacuna Antitifoídica vax-TyVi® es potencialmente inocua a nivel local al administrarla por vía intramuscular. Esto se corresponde con la experiencia clínica de la aplicación de vax-TyVi® en humanos que ha demostrado una baja reatogenicidad (15-17).

Referencias

1. Félix A, Pitt RM. A new antigen of *S. typhosus*. Its relation to virulence and to active and passive immunization. *Lancet*. 1934;227:186-91.
2. Klumankp KP, Koornhof HF, Schneersan R, Cadoz M, Gilbertson IT, Robbin JB, Shlz D, Arman J. Protective activity of vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet*. 1987;1166-9.
3. Hornick RB. Selective Primary Health Care. Strategies for control of diseases in the developing world. XX Typhoid Fever. *Rev Infect Dis*. 1985;7:536-46.
4. Dirección Nacional de Estadísticas, MINSAP, 1997.
5. Typhim Vi. Vaccine against Typhoid Fever. Pasteur Mérieux. France, 1994.
6. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Vol 1 and 2. Organization for Economic Cooperation and Development. Prot. 407. Paris 1993.
7. Normas sobre Medicamentos de la Comunidad Europea, Vol. III. "Directrices sobre la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos de uso humano". Directrices Fármaco-Toxicológicas. Página 91 (No. 2, secc. B, Cap. I, Parte 2, Anexo A Directiva 75/318/CEE). Versión español. Enero 1989 y 1998.
8. Regulación 75/318 CEE. Normas y Protocolos Analíticos, Tóxico-Farmacológicos y Clínicos en materia de pruebas de Medicamentos. 1997.
9. Agencia Europea para la Evaluación de Productos de Medicina (EMA). Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines, 1997.
10. Regulaciones de vacunas. Agencia Europea para la Evaluación de Productos de Medicina (EMA) CPMP/SWP/465/95. Junio de 1998.
11. Voisin. Extrapolation of Animal Toxicity to Humans: interspecies comparisons in drug development. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1990;12(2):107-16.
12. Freireich EJ. Cancer Chemother Reports 1966;50(4):219-44.
13. STATISTICA 5.1D (StatSoft, Inc. 1996. STATISTICA for Windows. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104).
14. Canadian Council on Animal Care and Use. Guide to the Care and Use of Laboratory Animals. Volume II, Ontario, 1993.
15. Pérez-Sierra A, Aguiar PP. Ensayo clínico Fase I-II de la vacuna antitifoídica de polisacárido Vi en jóvenes de 18-20 años de edad. Registro Sanitario Vacuna vax-TyVi®, Registro No. 1773, 2002.
16. Pérez Sierra A, Aguiar PP. Ensayo clínico fase I-II de la vacuna antitifoídica de polisacárido Vi en niños y adolescentes.

Registro Sanitario Vacuna vax-TyVi®,
Registro No. 1773, 2002.

17. Pérez Sierra A, Aguiar PP. Ensayo clínico
fase IV para aplicación del perfil de

reactogenicidad de la vacuna antifoídica de
polisacárido Vi en niños y adolescentes.
Registro Sanitario vacuna vax-TyVi®, No.
1773, 2002.

Local tolerance study of vax-TyVi® vaccine in Sprague Dawley rats

Abstract

The anti-typhoid vaccine vax-TyVi® consists in the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*, which is diluted in an isotonic buffer solution with phenol as a preservative. Each dose of 0,5 mL contains 25 µg of polysaccharide as an active component. The vaccination schedule in Cuba against typhoid fever includes the application of vax-TyVi® to 9-10 year-old students (5th grade, primary school), a second dose for 12-15 year-olds (8th grade, secondary school) and the third dose for 16-17 year-olds (11th grade). The high-risk population is additionally immunized. The present work describes the local tolerance assay undertaken for vax-TyVi® as part of its preclinical safety studies. A total of 170 rats were treated with either the vaccine, the placebo (all components, but the active ingredient) or were not treated and served as controls. Clinical observations were made daily during the whole study. Water and food intakes were measured and anatomopathological studies were conducted on animals that were sacrificed 3, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days after the inoculation. No animal died or showed symptoms of toxicity. Body weight and the intakes of food and water were statistically similar in the three experimental groups and there were no tissue changes indicative of local or systemic toxicity. Results suggest that vax-TyVi® is potentially innocuous at the inoculation site.

Key words: Toxicology, Local Tolerance Test, vax-TyVi®, rats