

Estudio histopatológico entre ratones infectados con *Salmonella typhi* sin vacunar y vacunados por diferentes vías con las vacunas polisacáridica y de células enteras

Juan F. Infante¹, Luis Riverón¹, Jorge Mayo¹, Mildrey Fariñas¹, Julio Oramas¹, Viviana Pérez¹, Sergio Sifontes², Alina Miranda¹.

1. Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: jinfante@finla.edu.cu
2. Centro de Bioactivos Químicos. Santa Clara, Cuba

La fiebre tifoidea constituye una enfermedad propia del hombre. La misma es causada por *Salmonella typhi* y produce una respuesta inflamatoria en el tracto intestinal. Con el fin de establecer su control por vacunación el Instituto Finlay ha desarrollado una vacuna a partir del polisacárido capsular Vi. Para su estudio experimental no existe un modelo animal que reproduzca los síntomas y la patogenia de la enfermedad. El desarrollo de modelos experimentales y los estudios histopatológicos aportan informaciones al conocimiento de la enfermedad y a la interpretación de los procesos inmunológicos. Nos propusimos caracterizar el cuadro histopatológico en los ratones utilizados en las pruebas de potencia de la vacuna antitifoídica basada en polisacárido Vi purificado y su comparación con la vacuna de células enteras. Se utilizaron 240 ratones de ambos sexos pertenecientes a la línea C57BL/6 procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con un peso comprendido entre 18 y 22 g. Se evaluó la protección comparativa entre las vías intraperitoneal y subcutánea utilizando dos inmunógenos, a partir del polisacárido Vi y con la variante de células enteras. Se logró una considerable eficacia en ratón C57BL/6 para reproducir las lesiones compatibles con *Salmonella typhi* en hígado y bazo. La sobrevivencia del grupo no vacunado fue de un 15%. La sobrevivencia de los ratones correspondientes al grupo vacunado con polisacárido Vi osciló entre 90% y 100% para ambas vías, mientras que los vacunados con células enteras variaron entre 50% y 100% para la vía subcutánea y entre 60% y 100% para la vía intraperitoneal todo lo cual evidencia la superioridad de la vacuna a partir del polisacárido capsular Vi sobre la variante de células enteras en la especie ratón C57BL/6.

Palabras claves: Vacuna antitifoídica, histopatología, ratón.

Introducción

La fiebre tifoidea es una enfermedad propia del hombre (1,2). Es causada por un germen gramnegativo productor de una respuesta inflamatoria en el tracto intestinal. La infección se transmite de forma indirecta al consumir agua y alimentos contaminados (3). Para su estudio experimental no existe un modelo animal que reproduzca de manera exacta los síntomas y la patogenia de la enfermedad, pero la especie ratón se considera valiosa en los estudios preclínicos.

El Instituto Finlay se encuentra enfrascado en el desarrollo de una vacuna contra la referida enfermedad que supere las variantes tradicionales, cuya base es el polisacárido capsular Vi del germen *Salmonella typhi*. La vacuna de polisacárido capsular Vi purificado de *Salmonella typhi* presenta entre sus ventajas: la de provocar escasas reacciones adversas y de propiciar alta

capacidad inmunogénica y protectora con una sola dosis (4).

Los estudios histopatológicos aportan importantes resultados en la interpretación de los procesos inmunológicos que se evidencian en los ratones protegidos o no contra la *Salmonella typhi*, la cual tiene la característica de producir lesiones necróticas focales conocidas como paratifomas en diferentes órganos con preferencia de presentación en el hígado y el bazo (5).

Teniendo en cuenta lo antes mencionado nos propusimos caracterizar el cuadro histopatológico en los ratones utilizados en los ensayos de reto, pruebas de potencia de la vacuna antitifoídica a base del antígeno polisacárido Vi purificado y de un estudio de protección comparativa entre vacuna de polisacárido Vi y vacuna de células enteras, además fue objetivo nuestro realizar un análisis

comparativo del comportamiento de las sobrevivencias en ambas vacunas.

Materiales y Métodos

Para este ensayo se utilizaron 240 ratones pertenecientes a la línea C57BL/6 procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) con un peso comprendido entre 18 y 22 g, de ambos sexos, mantenidos en condiciones de tenencia y alimentación convencional. Las muestras seleccionadas para el estudio histopatológico fueron: Sistema Nervioso Central (SNC), corazón, hígado, bazo, riñones, intestinos, ganglios mesentéricos, páncreas, timo y otros que resultaron de interés en el momento de la necropsia, la misma se realizó según método convencional. De estos órganos se tomaron fragmentos que fueron fijados en formol neutro al 10%, procesados por la técnica de inclusión y cortes en parafina y coloreados con hematoxilina-eosina.

Los ratones utilizados en el estudio histopatológico provinieron de tres ensayos:

Ensayo I. Cálculo de la Dosis Letal Media (DL₅₀)

Se utilizaron 40 ratones C57BL/6 inoculados con *Salmonella typhi* cepa FI-09-SI del cepario del Instituto Finlay. Las concentraciones estaban comprendidas entre $6,6 \times 10^6$ y $5,3 \times 10^4$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL). Se utilizó extracto de levadura 0,7% como Factor Estimulante de la Virulencia (FEV) (OXOID). Se aplicaron dosis infectivas en volúmenes de 0,5 mL por vía intraperitoneal (I/P). El cálculo de la mortalidad se

desarrolló según Reed-Murch: Principles and methods of toxicology.

Ensayo II. Protección, por un preparado vacunal a base del antígeno capsular polisacárido Vi purificado

Se utilizaron 40 ratones C57BL/6 vacunados con la variante de polisacárido Vi retados con *Salmonella typhi* en concentración de $6,6 \times 10^6$ UFC/mL, se utilizó Factor Estimulante de la virulencia, igual al ensayo. Los ratones fueron vacunados con polisacárido Vi por la vía subcutánea (S/C) en la zona cervical posterior con dosis de las siguientes diluciones de la vacuna 1/25, 1/50, 1/100, 1/125, en volúmenes de 0,1 mL, para la vía subcutánea y de 0,5 mL para la vía intraperitoneal (I/P).

Ensayo III. Protección comparativa entre dos vías y dos inmunógenos

Se utilizaron 160 ratones C57BL/6 en cuatro grupos de 10 animales cada uno: Grupo Poli, vía S/C, Grupo Poli, vía I/P, Grupo células enteras, vía S/C, Grupo células enteras, vía I/P y un Grupo control representado por ratones no vacunados e inoculados con la dosis máxima de $6,6 \times 10^6$ UFC/ mL pertenecientes al ensayo I de cálculo de Dosis Letal Media.

La vacuna de células enteras, inactivadas por calor y fenol. (Empresa de Productos Biológicos "Carlos J. Finlay", Ciudad de La Habana, Cuba), se utilizó pura y en las diluciones siguientes 1/5, 1/25, 1/125. Un grupo de 40 ratones fueron vacunados con 0,1 mL por vía S/C y un grupo de 40 ratones por vía I/P para un volumen de 0,5 mL.

Resultados y Discusión

Tabla 1. Lesiones propias de *Salmonellosis* en ratones C₅₇BL₆ inoculados con diferentes concentraciones (cálculo de la DL₅₀)

Solución	Concentración del germen	Lesiones histopatológicas en bazo, hígado intestino	Intensidad
A	$6,6 \times 10^6$ UFC/ mL	Paratifomas diseminados	XXXX
B	$1,32 \times 10^6$ UFC/mL	Múltiples paratifomas y cariorexis de los folículos linfoides en Placas de Peyer.	XXX
C	$0,26 \times 10^6$ UFC/mL	Escasos paratifomas bien definidos	XX
D	$0,0528 \times 10^6$ UFC/mL	Formaciones incipientes de paratifomas	X

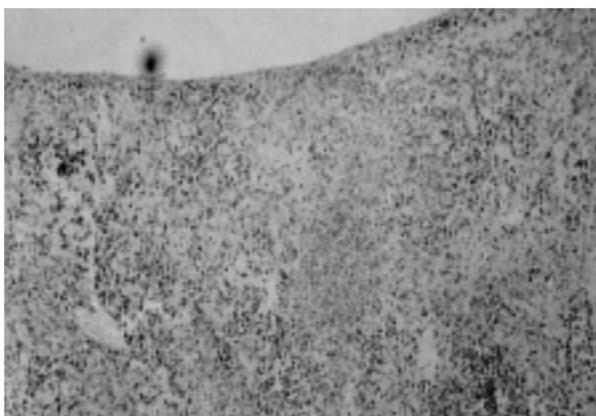
Los estudios anatomopatológicos se realizaron previa eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (IMEFA. Ciudad de La Habana, Cuba). El protocolo del

experimento fue aprobado por una comisión departamental de bioética y realizado bajo el

cumplimiento del reglamento de bioseguridad del departamento.

Como puede apreciarse en la Tabla 1 las formaciones compatibles con Salmonelosis conocidas como paratifomas (Figura 1) (6) se hicieron más intensas y definidas en dependencia de las concentraciones de los gérmenes inoculados; correspondiéndose la de mayor intensidad con la de mayor concentración de gérmenes;

Figura 1. Bazo de ratón C57Bl/6 inoculado con $6,6 \times 10^6$ UFC/mL de *Salmonella typhi*. Múltiples paratifomas diseminados en el parénquima H. Ex 80.



los órganos más afectados fueron bazo y riñón. Se lograron desarrollar lesiones compatibles con la enfermedad en el modelo escogido. Otras lesiones observadas, como cariorrexis de los linfocitos a nivel de las Placas de Peyer (Figura 2), pudieran responder; bien a los efectos necrotizantes del germen (7,8) o a la acción deletérea del extracto de levadura utilizado como Factor Estimulante de la Virulencia sobre el sistema inmune (9).

Figura 2. Placa de Peyer de ratón C57Bl/6 inoculado con $6,6 \times 10^6$ UFC/mL de *Salmonella typhi*. Linfocitos en diferentes estados degenerativos, incluyendo cariorrexis. H. Ex 180.

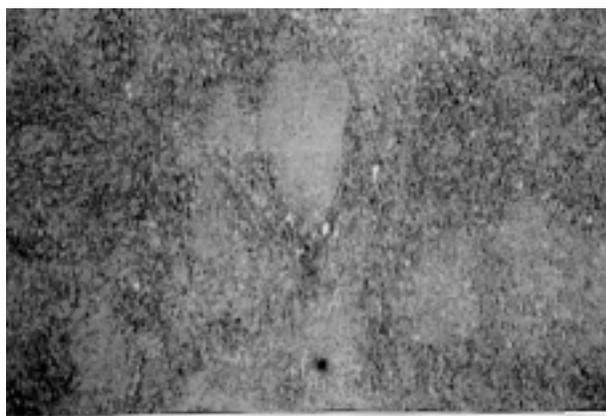


Tabla. 2. Protección utilizando el polisacárido Vi en diferentes diluciones y reto con *Salmonella typhi* en concentraciones de 6.6×10^6 UFC/mL. Solución A del ensayo de DL_{50}

Grupo	Cantidad de polisacárido Vi en $\mu\text{g/ mL}$	Picnosis y deplesión de los centros germinales en ganglios	Paratifomas
1 Vac	1/25	-	100%
2 Vac	1/50	50%	50%
3 Vac	1/100	-	50%
4 Vac	1/125	33,3 %	33,3%

En la Tabla 2 se puede apreciar el desarrollo de formaciones compatibles con Salmonelosis y la tendencia a disminuir en la medida en que se aumentan las diluciones, se observa que con las diluciones menores, se obtuvieron menos lesiones del tipo degenerativo necrótico en los ganglios linfáticos mesentéricos y a la vez se correspondió con el grupo donde mayormente se

presentaron los paratifomas. Estos paratifomas son considerados como expresión del desarrollo de una respuesta inflamatoria, por lo tanto, el desarrollo de estas formaciones evidencia las posibilidades de este modelo experimental para reproducir las lesiones compatibles con Salmonelosis.

En el estudio comparativo entre dos inmunógenos (Ver Tabla 3), retados con $6,6 \times 10^6$ UFC/ mL del germen *Salmonella typhi*, se obtuvieron sobrevivencias por encima del 90% en la variante polisacárido Vi y superior al 50% en la variante de células enteras, quedó demostrado los niveles de protección conferidos por el preparado vacunal a partir del antígeno polisacárido Vi, purificado en diluciones tan altas como 1/100 y 1/125 respectivamente, y que protegieron al 90% de los ratones. Este resultado tiene un comportamiento superior al compararlo con la sobrevivencia obtenida en la variante de células enteras que estuvo entre un 50% y 90% para

la vía subcutánea y entre un 70% y 60% para la vía intraperitoneal respectivamente, corroborando los resultados experimentales obtenidos anteriormente con vacunas polisacáridicas (10).

Por otra parte quedó evidenciada la superioridad de la vacuna a partir del polisacárido capsular Vi, sobre la variante de células enteras en el modelo ratón C57BL/6, teniendo en cuenta la mayor protección conferida por la primera. Además, si se tiene en cuenta que la vacuna de células enteras produce elevada reactividad en humanos se refuerza el valor de la variante a partir del polisacárido Vi.

Tabla 3. Protección comparativa entre vías SC e IP, vacuna polisacáridica y vacuna de células enteras

Vacuna	Vía	Dosis	N	Sobrevivencia %	Animales con paratifomas %
Polisacárido Vi	SC	1/25	10	100	100
		1/50	10	100	100
		1/100	10	90	100
		1/125	10	90	100
Polisacárido Vi	IP	1/25	10	100	100
		1/50	10	90	100
		1/100	10	100	100
		1/125	10	90	100
Células enteras	SC	Pura	10	100	100
		1/5	10	80	100
		1/25	10	50	100
		1/125	10	90	100
Células enteras	IP	Pura	10	100	100
		1/5	10	100	100
		1/25	10	70	100
		1/125	10	60	100

Estos resultados refuerzan la utilidad del modelo ratón C57BL/6, si tenemos en cuenta que los controles sin vacunar que fueron sometidos a la inoculación experimental con *Salmonella typhi* en concentraciones de $6,6 \times 10^6$ UFC/mL, murieron en un alto porcentaje (85%) representando una sobrevivencia del 15% en comparación con los grupos vacunados tanto con un preparado vacunal como con el otro.

Quedó comprobada la eficacia de este modelo para reproducir la enfermedad al lograrse que la totalidad de animales, aun cuando sobrevivieron presentaron lesiones compatibles con Salmonelosis, lo cual evidencia la susceptibilidad lograda en esta línea de ratón, para facilitar la expresión de lesiones compatibles con las de Salmonelosis.

Referencias

1. Organización Panamericana de la Salud. Informe final IX Reunión interamericana de salud OPS. Nivel ministerial. Washington DC: OPS; 1995.
2. Szu, S.C; Taylor,D.N; Trofa *et al.* Laboratory and preliminar clinical characterization of Vi capsular polysaccharide conjugate vaccines. *Infect. Immun.* 1994, 62(10):4440-4444.
3. Morona,R Mona, J.K *Et al.*Construction of K88 and expressing clones of *Salmonella typhimurium* g30: Immunogenicity following oral administration to pigs. *Vaccine.* 1994; 12(6):513-517.
4. Martínez JC, Ochoa RF, Estrada EA, Riveron L, González M, Ferriol X, García AM, Blanco R, Franklin T. Sotolongo F. Validación de un ELISA para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas humanas anti polisacárido capsular de *Salmonella typhi*. *Vaccimonitor.* 1999; 8:7-11.
5. Smith AH y Jones TC. *Patología veterinaria.* La Habana: Ed Revolucionaria; 1966:1-26.
6. Coles E. *Veterinary Clinical Pathology.* Fourth New York: Ed., Academic Press. 1986:351-352.
7. Jawetz MA, Brookes O. *Microbiología Médica.* Zaragoza: Ed. Editorial Acribia. 1996:756.
8. Benenson AS. XII Informe Oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública, *Organización Panamericana de la Salud*, Washington DC. 1997:203-8.
9. Infante JF. *Neisseria meningitis: Resultados Experimentales sobre los Biomodelos de Ratón y Rata.* La Habana: Ediciones Finlay, Serie Mongráfica SM2;1996:80-3.
10. Infante JF. *Neisseria meningitis. Resultados experimentales sobre los biomodelos de ratón y rata.* La Habana: Ediciones. Finlay;1996.
11. Stanley A, Plotkin MD, Boyuveret LCN. A new typhoid vaccine composed of the Vi capsular Polysaccharide. *Arch Intern Med.* 1995;155:48-53.

Histopathologic study in non-vaccinated and vaccinated mice using *Salmonella typhi* polysaccharidic and whole cell variants by different inoculation routes

Abstract

Typhoid fever is a human disease caused by *Salmonella typhi* which produces an inflammatory response in the intestinal tract. In order to control the disease, Finlay Institute has developed a vaccine using Vi capsular polysaccharide. There is no animal model available that reproduces the symptoms and pathogenesis of the disease and may be used for experimental studies. The development of experimental models and histopathological studies contribute to the knowledge of the disease and to the interpretation of the immune processes. For this reason, the histopathological pattern present in C-57 BL/6 line female and male mice, weighing 18-22 g and used in the potency tests for the typhoid fever vaccine based on purified Vi capsular polysaccharide, was characterized. The protection conferred by subcutaneous and intraperitoneal administrations were evaluated and compared, as well as between the immunogen based on Vi polysaccharide, and the whole cell variant. Considerable efficacy in reproducing the *Salmonella typhi* lesions in liver and spleen, was achieved in C-57 BL/6 mice. Survival of mice vaccinated with the Vi polysaccharide vaccine ranged between 90-100% using both routes. In those mice vaccinated with whole cells it was of 50-100% for the subcutaneous route, and 60-100% for the intraperitoneal route. These data show that the capsular Vi polysaccharide vaccine is superior to the whole cell variant in the C-57 BL/6 line mice.

Key words: Typhoid fever vaccine, histopathology, mouse.