

Estudio de tolerancia local de la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC[®] en ratas Sprague Dawley. Evaluación a los 24 y 36 meses en estante

Reynaldo Oliva-Hernández,* Mildrey Fariñas-Medina, Juan F. Infante-Bourzac, Tamara Hernández-Salazar, Darcy Núñez-Martínez, Alex Quintero-Pérez, Concepción Campa-Huergo, Gustavo Sierra-González

Instituto Finlay de Vacunas.

email: roh@finlay.edu.cu; reyolivacuba@gmail.com

La meningitis meningocócica continua siendo un problema de salud en diferentes países y para la prevención de esta enfermedad se han obtenido diferentes vacunas. La vacuna VA-MENGOC-BC[®] ha constituido ser eficaz y segura en la prevención de la meningitis meningocócica contra los serogrupos B y C. Esta ha demostrado buena estabilidad en el tiempo sin cambiar su calidad como producto; fue conservada a estante durante 24 y 36 meses a temperaturas de 4 a 8 °C. Se evaluó su posible potencial toxicológico a través de un estudio de tolerancia local en ratas Sprague Dawley para extender su vida útil. Los animales inmunizados se observaron diariamente para evaluar síntomas locales y sistémicos de toxicidad. Se realizaron evaluaciones del peso corporal, consumo de agua y alimento, termometría, musculometría e irritabilidad dérmica por el método de Draize. Se realizaron estudios anatomopatológicos periódicos para observar posibles efectos adversos. No se observaron síntomas de toxicidad ni muertes. No se encontraron diferencias entre los grupos experimentales en cuanto al peso corporal, el consumo de agua y de alimentos, no se evidenció fiebre, ni irritabilidad local. Anatomopatológicamente a nivel del punto de inoculación se observaron procesos granulomatosos de tipo macrofágicos característicos en las vacunas que contienen hidróxido de aluminio. Estos resultados permitieron concluir que la vacuna VA-MENGOC-BC[®] que permaneció en estante durante 24 y 36 meses no evidenció efectos adversos locales, ni sistémicos en las ratas.

Palabras clave: VA-MENGOC-BC[®], tolerancia local, termometría, musculometría, irritabilidad dérmica, Sprague Dawley.

Introducción

La enfermedad meningocócica producida por *Neisseria meningitidis* es una de las principales causas de meningitis bacteriana y septicemia en los países industrializados y constituye un problema de salud para muchos países en desarrollo, tiene una alta prevalencia a nivel mundial y existen numerosos lugares donde la enfermedad es endémica. Pudiéndose mencionar el cinturón de la meningitis en África, en Asia y algunos países de América también provoca afectaciones, sobre todo en las estaciones del año, secas y frías.⁽¹⁾

La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé el riesgo de ocurrencia de una epidemia a gran escala en varios países por lo que trabaja en el control de esta enfermedad para el año 2030.⁽²⁾

VA-MENGOC-BC[®] continua siendo un producto útil en la prevención de las enfermedades meningocócicas producidas por los serogrupos B y C.

El agente causal de estas meningitis es una bacteria Gram-negativa: *N. meningitidis*, capaz de colonizar asintóticamente el tracto respiratorio superior. Existen distintos tipos de meningococo, pero cinco serogrupos son los responsables de la mayoría de las infecciones: meningococo A, C, Y, W₁₃₅, y B. La incidencia de la distribución geográfica tanto de la enfermedad como de los serogrupos de la bacteria que la producen, cambian continuamente. Durante los últimos años se ha observado en diferentes regiones un aumento en la circulación del serotipo W₁₃₅, aunque en menor cuantía en estos mismos reportes no han dejado de incidir la aparición de los serogrupos B y C, sobre todo ese último.⁽¹⁻³⁾

Por lo que teniendo en cuenta estos aspectos antes mencionados y que VA-MENGOC-BC[®] continúa siendo un producto eficaz en la prevención de las meningitis producidas por los serogrupos B y C tanto en Cuba como en otras regiones y países del mundo, se decidió evaluar los posibles efectos toxicológicos adversos tras

* Médico Veterinario y Zootecnista, Master en Medicina Preventiva Veterinaria, Doctor en Ciencias de la Salud. Jefe del Departamento de Modelos Animales y Toxicología Experimental. Profesor Adjunto de la Universidad Agraria de la Habana.

la utilización del producto después de 24 y 36 meses de permanencia en estante de 4 a 8 °C a través del estudio de tolerancia local con la finalidad de extender su vida útil de 24 a 36 meses de producida, luego de demostrada la no existencia de cambios físico-químicos de la vacuna.

Materiales y Métodos

Diseño experimental: Se basó fundamentalmente, en las recomendaciones y guías emitidas por la OMS para la evaluación de vacunas.^(4, 5) El diseño experimental contempló la inoculación intramuscular en ratas Sprague Dawley con 0,2 mL de la vacuna. El estudio tuvo una duración de 28 días durante el cual fueron observados y se realizaron eutanasias periódicas (3, 7, 14, 28 días post-inoculación) para monitorear las posibles alteraciones en el punto de inoculación y cualquier otra lesión mediante los estudios anatomopatológicos. Se evaluaron además, el comportamiento del peso vivo de los animales, consumo de agua y alimentos, así como la temperatura corporal y el aumento del volumen muscular durante las primeras 72 h e irritabilidad dérmica en el punto de inoculación por el método de Draize.⁽⁶⁾

Animales: Fueron utilizadas ratas Sprague Dawley (SD) machos con una edad de 6 – 7 semanas. Las mismas fueron suministradas por el Centro Nacional Para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), acompañados de sus certificados de calidad sanitaria y Zootecnia.

Condiciones de alojamiento: Los animales fueron alojados en cajas tipo T4 (área de piso: 1800 cm²) de policarbonato (Tecniplast, Italia). Fueron colocados cinco animales por cajas. Se empleó encamado de bagazo de caña desmenuzado suministrado por el CENPALAB y esterilizado en autoclave durante 25 min. a 121 °C cambiándose dos veces por semana. La alimentación consistió en pienso esterilizado para ratas (ALYco[®]), suministrado y certificado por el CENPALAB y agua potable acidulada (pH 2,7-3,0) como bebida, ambos *ad libitum*. Los locales de los animales mantuvieron una temperatura de 22 ± 2 °C y humedad relativa de 60 ± 5%. Estos parámetros fueron diariamente registrados manteniendo un ciclo de 12 h luz y 12 h oscuridad.

Grupos de tratamiento y vía de administración: Se formaron 3 grupos de tratamiento de 20 animales cada uno; un grupo control que recibió Solución Buffer Fosfato (PBS), lo cual permitió no solo el control de las condiciones de inmunización, sino también de los posibles efectos adversos potenciales que pudieran

desarrollarse en el curso del experimento; y dos grupos que recibieron la vacuna VA-MENGOC-BC[®] de 24 meses (Lote: 0021) y 36 meses (Lote: 9001-Y) producida y conservada de 4 a 8 °C en estante. El estudio tuvo la finalidad de evaluar los efectos adversos locales potenciales asociados a la administración del producto con una dosis.

No se consideró necesario la aplicación del número de dosis recomendadas en el esquema de inmunización para humanos (dos dosis). Se empleó la vía intramuscular por ser la utilizada en humanos, en la región media posterior de la cara interna del muslo izquierdo y derecho (100 µL en cada extremidad).

La dosis de la vacuna para uso en humanos se encuentra en un volumen de 0,5 mL. El volumen máximo permisible para ratas de estas tallas y pesos es de 0,1 - 0,2 mL (7). Al tener en cuenta el peso y las relaciones alométricas entre el hombre y el modelo experimental utilizado, la dosis a aplicar permite evaluar un margen de seguridad satisfactorio.

Composición por unidad de dosis de VA-MENGOC-BC[®] (0,5 mL)

Sustancias Activas

Vesícula de Membrana Externa de meningococo B: 50 ug

Polisacarido C: 50 ug

Sustancias auxiliares

Hidróxido de aluminio: 2 mg

Tiomersal: 0.01 %

Cloruro de sodio: 0.85 %

Fosfato: 0.7 mM

Observaciones y síntomas clínicos: Todas las observaciones se comenzaron a realizar a partir de la fecha de inicio experimental tiempo cero (T0) diariamente dos veces al día, considerado este como el momento en que se comenzaron a tomar los primeros datos específicos del estudio. Se prestó especial atención al punto de inoculación y a la aparición y/o manifestación de síntomas como: cojera, piloerección, postración, movimientos involuntarios, ataxia, salivación, lagrimeo, excitación, incoordinación y cualquier otro síntoma.

Peso corporal: Los animales fueron pesados individualmente antes de la inoculación, tres días después de la inoculación y semanalmente hasta concluir el estudio a los 28 días post-inoculación. Se utilizó una balanza modelo Sartorius[®], previa calibración y

certificación para su uso en cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio.

Consumo de agua y alimentos: Ambos fueron suministrados *ad libitum* y medidos al comienzo del estudio y luego en días alternos. El agua se midió con una probeta de 1000 mL; se depositaron y repusieron cada vez 750 mL de agua en el frasco colocado en cada caja de ratas, el volumen remanente se registró y calculó por diferencia del 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.

De forma similar se realizó la evaluación del consumo de alimentos, cada vez que se hizo una medición se completaron en las tolvas de las cajas con 500 g de pienso. Con una balanza técnica modelo Sartorius® se pesó el alimento remanente y se calculó el consumo medio diario por animal, como se describió para el consumo de agua.

Temperatura corporal y musculometría: La evaluación de la temperatura corporal de los animales se realizó por vía rectal utilizando un termómetro clínico de mercurio fino (MEHECO, China), según procedimiento normalizado de operaciones para este proceder. Esta operación se realizó de 1 a 2 minutos y los resultados se recogieron en un registro habilitado al efecto, en los tiempos 0, 8, 24, 48 y 72 horas.

La musculometría se realizó con un Pie de Rey (MasterCraf®), que permitió medir el diámetro de las extremidades inoculadas antes de realizar la misma (Fig. 1-A), la restricción del animal se realizó por un técnico especializado y otro técnico o personal calificado realizó la medición del diámetro muscular que toma como referencia el centro de la musculatura de la región del muslo, quedando los dientes del Pie de Rey por la cara

interna del músculo y la externa; a continuación se cerró el Pie de Rey hasta el tope máximo de ambas caras sin realizar presión. Esta operación se realizó igualmente en los tiempos 0, 8, 24, 48 y 72 horas post-inoculación y los resultados se recogieron en un registro habilitado al efecto.

Irritabilidad dérmica: La prueba de irritabilidad dérmica se realizó de forma similar a lo que se ha descrito para fármacos tópicos como cremas, ungüentos, lociones, etc., aplicados sobre la piel o mucosas,⁽⁸⁾ en este estudio, la vacuna fue administrada intramuscularmente, pero evaluamos por el método de Draize la posible irritabilidad de la piel en la zona donde se administró la vacuna, a través de la presencia de eritema, edemas, escaras; así como la presencia de pápulas, siguiendo lo descrito por el PNT/ANI/0207 establecidos por el Centro de Estudio de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos (CEIEB-IFAL). Para esta prueba se realizó una previa depilación de la cara interna del muslo de las extremidades donde se aplicó la vacuna (Fig. 1-B). El cálculo de índice de irritabilidad dérmica (IID) se efectuó sumando todas las observaciones (8, 24, 48 y 72 h post-inoculación) y dividiéndola por el número de observaciones realizadas.

El valor obtenido se comparó con lo reportado en el PNT correspondiente para clasificar el producto y de esta forma su aprobación o rechazo según las normas de la OECD⁽⁸⁾ (Siglas del inglés: Organization for Economic Cooperation and Development. Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica).

Estudios anatomopatológicos: Las observaciones anatomopatológicas macroscópicas se realizaron a cinco animales de cada grupo, inmediatamente después de la eutanasia a los 3, 7, 14 y 28 días post-inoculación. Se tomaron muestras del sitio de inoculación a

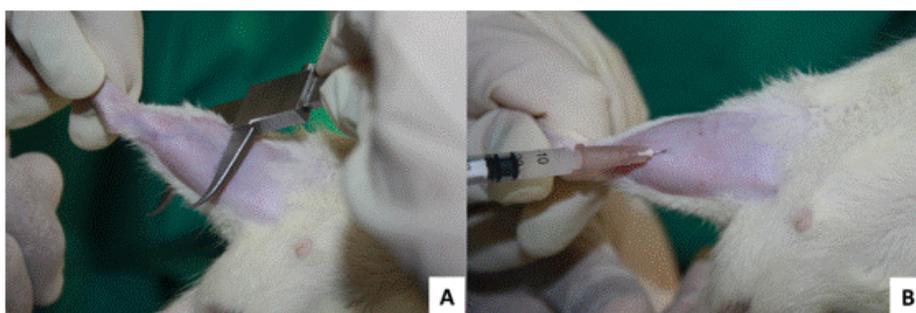


Fig. 1. Extremidad derecha de rata SD macho. A- Evaluación del diámetro muscular antes de la inmunización. B- Aplicación de la vacuna en la región central de la cara interna del muslo. Se muestran las áreas depiladas para la evaluación de la irritabilidad dérmica.

todos los animales, tales como piel y tejido celular subcutáneo, músculo de la región, ganglio linfático poplíteo e inguinal profundo. Fue previsto el examen histopatológico para todos los órganos que mostraran alteraciones macroscópicas en la necropsia.

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, para cortar en parafina. Los cortes se realizaron a un espesor de 4-6 μm (micras) usando un micrótomo Histolide 2000 (Alemania). La dirección y el número de secciones se realizaron según las recomendaciones de la OMS para la evaluación de productos tóxicos.^(4,5) Se realizó tinción de hematoxilina – eosina. Las observaciones se realizaron con microscopios convencionales Leyca y Olympus (modelos DMLB, Alemania, y CH-2, Japón, respectivamente). Se realizó una descripción detallada de las observaciones recolectadas.

Método de Eutanasia y Punto Final: El método de eutanasia de los animales se realizó por sobre dosis de Tiopental Sodio como anestésico, por vía intravenosa, en dosis de 100 mg/kg de peso, según las recomendaciones y guías del consejo canadiense para el cuidado de los animales de laboratorio,⁽⁹⁾ cumpliendo con las directrices sobre la eutanasia de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria.⁽¹⁰⁾ Este método se aplicó en momento del punto final de los grupos de animales según el diseño experimental del estudio y se tuvo en cuenta las recomendaciones de Morton sobre el punto final humanitario.⁽¹¹⁾ Todas las técnicas y procedimientos utilizados en el estudio fueron aprobadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Finlay de Vacunas.

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico se creó una base de datos en Microsoft Excel y se procesaron los mismos utilizando el programa estadístico sistema R, versión 3.1.0 (2014-04-10).⁽¹²⁾ Para todos los casos se aplicó como criterio de significación estadística $p \leq 0,05$. Para las variables continuas (peso corporal, consumo de agua y consumo de alimento) se realizó un análisis de comparación múltiple, incluyendo la comprobación de la normalidad de los datos, así como el chequeo de la igualdad de varianzas. Los grupos de datos que cumplieron lo antes señalado se procesaron por ANOVA y los que no lo cumplieron por la prueba de Kruskal-Wallis.

Resultados y Discusión

La rata es considerada la especie roedora de preferencia para este tipo de estudio y la línea SD está bien caracterizada y ha sido ampliamente usada por su gran sensibilidad en los estudios de toxicidad.^(7, 13-16) Es además, una línea no isogénica, por lo que puede dar una respuesta heterogénea de mayor valdes para la especie humana. Se considera que la rata SD constituye un modelo de relevancia potencial para la evaluación de la toxicidad intrínseca y asociada a la respuesta inmune de productos vacunales contra meningococos,⁽¹⁴⁾ además se ha usado en otros estudios toxicológicos de vacunas contra meningococos.⁽¹⁷⁾

Observaciones y síntomas clínicos

Durante el ensayo no se observaron síntomas clínicos, ni se registraron muertes en ninguno de los animales en estudio. Resultado que refuerza la seguridad de este producto descrita por otros autores,^(13, 17) lo que hace que VA-MENGOC-BC[®] continúe siendo una vacuna de elección para combatir o precaver epidemias contra las meningitis producidas por los serogrupos B y C.

Peso corporal

Todos los animales incrementaron su peso corporal durante el estudio (Fig. 2). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el control ($p \geq 0,05$). Las curvas de incremento de peso de los animales se correspondieron con las observadas en ensayos anteriores en nuestras instalaciones y los reportados por la literatura.⁽¹³⁻¹⁹⁾

Consumo de agua y alimentos

El consumo de agua se comportó de forma similar entre todos los grupos evaluados en el estudio sin diferencias estadísticas ($p \geq 0,05$, Tabla 1), los machos consumieron como promedio 34,0 mL de agua, resultados que se corresponden con los valores históricos observados para las ratas de esta categoría en nuestras instalaciones.⁽¹³⁻¹⁹⁾ El consumo de alimentos tampoco mostró diferencias significativas ($p \geq 0,05$, Tabla 1) entre los grupos de tratamientos siendo el promedio de 25,1 g.

Temperatura corporal y musculometría

La temperatura corporal registrada durante las diferentes evaluaciones realizadas post-inoculación no mostró diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los grupos de tratamientos (Tabla 1), la misma se comportó dentro

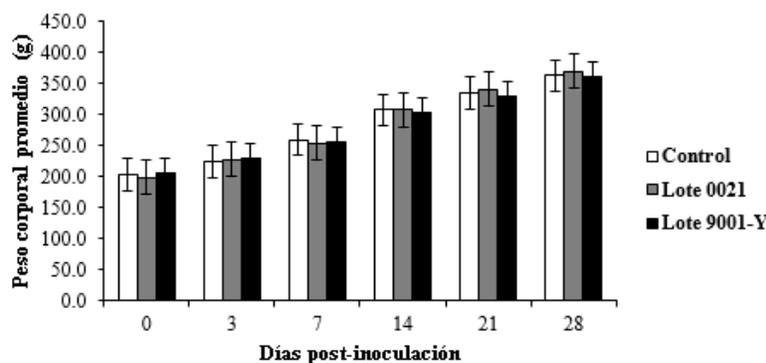


Fig. 2. Comportamiento del peso corporal de ratas SD machos durante el estudio de tolerancia local de VA-MENGOC-BC[®]. Cada valor representa el promedio de los animales y el error típico de la media de cada grupo. Prueba estadística Kruskal-Wallis $p \geq 0,05$.

Tabla 1. Valor promedio del consumo de agua, alimentos y de la temperatura corporal en las ratas SD machos (media \pm DS) y valores de p entre los grupos. Estudio de tolerancia local de la vacuna VA-MENGOC-BC[®].

Grupos	Variables		
	Agua (mL)	Comida (g)	Temperatura corporal (°C)
Control	32,2 \pm 2,4	24,8 \pm 1,5	37,4 \pm 0,4
Lote 0021	34,9 \pm 4,0	26,0 \pm 2,4	37,3 \pm 0,4
Lote 9001-Y	34,8 \pm 3,2	24,4 \pm 1,8	37,3 \pm 0,4
Media general	34 \pm 3,4	25,1 \pm 2,0	37,3 \pm 0,4

Los datos del consumo de agua y alimentos se evaluaron en días alternos y se agruparon por semanas para facilitar el análisis estadístico, mientras que la temperatura corporal se evaluó a las 0, 8, 24, 48 y 72 horas post-inoculación. Prueba estadística de Kruskal-Wallis $p \geq 0,05$.

de los rangos fisiológicos reportados para la especie.⁽²⁰⁾ Esta evaluación es un criterio importante en los estudios de reactogenicidad que se conducen en los ensayos clínicos. Los mismos, se sustentan en la observación de eventos adversos esperados y no esperados, entre los que se recogen, la fiebre, dolor de cabeza, dolor en el sitio de administración, enrojecimiento, dolor abdominal, vómitos, diarreas, entre otros.^(21, 22)

La termometría de los animales en los estudios toxicológicos preclínicos para evaluar la temperatura corporal de los mismos, puede contribuir de forma predictiva a los ensayos clínicos sobre la reactogenicidad de determinado fármaco o vacuna; por esa razón, debe ser un ensayo a incorporar en los estudios toxicológicos de las vacunas, sobre todo teniendo en cuenta la naturaleza de los antígenos que las pueden componer y si presentan adyuvantes conocidos o novedosos. En este trabajo como se pudo apreciar, los resultados son satisfactorios, al no observarse fiebre en los animales vacunados con dos lotes de VA-MENGOC-BC[®] almacenados por 24 y 36 meses en condiciones controladas de temperatura (4 - 8 °C). Este resultado soporta todas las anteriores evaluaciones realizadas permitiendo evidenciar en

conjunto la baja reactogenicidad del producto en ensayo, brindando un mayor margen de seguridad y estabilidad para VA-MENGOC-BC[®].

Otro aspecto a considerar durante los ensayos clínicos, es la respuesta local en el sitio de inmunización, pudiéndose recoger efectos adversos indeseados como dolor, inflamación, rubor, ardor, calor, enrojecimiento, entre otros.^(21, 22) En este sentido, consideramos de valor predictivo a los ensayos clínicos, la evaluación del volumen muscular del sitio de administración de la vacuna en un ensayo toxicológico preclínico. Esta evaluación, puede permitir discernir la ocurrencia de procesos inflamatorios locales medibles y de forma consistente, al utilizar herramientas de reconocida precisión como el Pie de Rey.⁽²³⁾

Los estudios de musculometría evidenciaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre controles y vacunados a las 24 y 48 horas y no entre grupos vacunados (Fig. 3). Estos resultados eran de esperar sobre todo frente a los animales controles que recibieron PBS y donde dicho aumento de volumen se debe principalmente, al proceso inflamatorio provocado por el hidróxido de aluminio

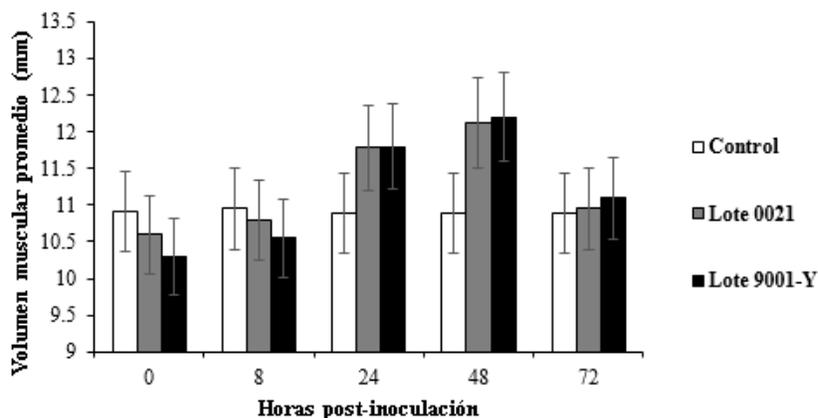


Fig. 3. Comportamiento del volumen muscular en ratas SD machos durante el estudio de tolerancia local de VA-MENGOC-BC®. Cada valor representa el promedio de 10 animales y el error típico de la media de cada grupo. Prueba estadística Kruskal-Wallis $p \leq 0,05$.

utilizado como adyuvante.^(14, 15) Todo lo cual evidencia, un bajo nivel de reactogenicidad de la vacuna, ya que a pesar de este proceso inflamatorio, como se recogió anteriormente, los animales no evidenciaron síntomas de cojera, dolor o algún tipo de dificultad locomotora.

Irritabilidad dérmica

Los estudios de irritabilidad dérmica durante la última década del siglo pasado y del presente siglo, fueron unos de los requisitos exigidos para el licenciamiento de fármacos o productos por entidades regulatorias europeas como la OECD,⁽⁸⁾ además, tanto el ensayo de irritabilidad dérmica como el oftálmico, han sido de los de mayor controversia desde el punto de vista ético en el uso de los animales de laboratorio con estos fines.⁽²⁴⁾ Hoy estos ensayos ya no se realizan en animales. han sido sustituidos por métodos alternativos, como los ensayos *in vitro*.⁽²⁵⁾ Aunque no existe ninguna vacuna hasta la fecha que su administración sea tópica sobre la piel; las que sí existen y se aplican por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular, pudieran ser evaluadas por este método.

Nosotros consideramos, que este método al igual que los descritos anteriormente (temperatura corporal y volumetría muscular) es también una herramienta predictiva para los ensayos clínicos, toda vez que permite brindar más información y soporte a la suma de todos los resultados. En los humanos la reacción local a determinado producto sobre la piel o sitio específico es fácilmente observable, sobre todo por la existencia de menos vellosidades en la piel, con respecto a los animales de laboratorio más comunes utilizados con estos fines.

El ensayo de irritabilidad dérmica realizado por el método de Draize permitió descartar a través de las lecturas de la piel en el sitio de administración de VA-MENGOC-BC® la ausencia de eritemas, edemas, escaras, o pápulas, por lo que el índice de irritación dérmica para ambos lotes de la vacuna fue 0,0. Este resultado permite catalogar a la vacuna como potencialmente no irritante para la piel, según la escala establecida en la literatura y cumple con las directrices de la OECD.^(6, 8)

Estudios anatomopatológicos

A partir de los resultados anatomopatológicos macroscópicos realizados en la primera eutanasia (tres días post inoculación), se observó en los animales inmunizados con ambos lotes de VA-MENGOC-BC® posibles procesos granulomatosos a nivel del punto de inoculación de tipos difusos, que posteriormente fueron evolucionando a la abscesación (Fig. 4 A-D), estos difirieron significativamente ($p \leq 0,05$) de los animales del grupo control. Por otra parte la presencia de adenitis en los ganglios poplíteos e inguinales profundos fue similar en frecuencia de aparición entre ambos lotes vacunados sin diferencias significativas entre ellos ($p \geq 0,05$); observadas con mayor frecuencia en las eutanasias realizadas a los 3, 7 y 14 días post-inoculación, mientras que a los 28 días post-inoculación, solo se observó una ligera adenitis en dos animales vacunados con el lote 0021 y en tres animales vacunados con el lote 9001-Y, todo lo cual apunta a un regreso hacia el estado normal de este ganglio. Por su parte, en los animales del grupo control solamente se presentó adenitis del ganglio inguinal profundo en un solo animal a los tres días post-inoculación (Tabla 2).

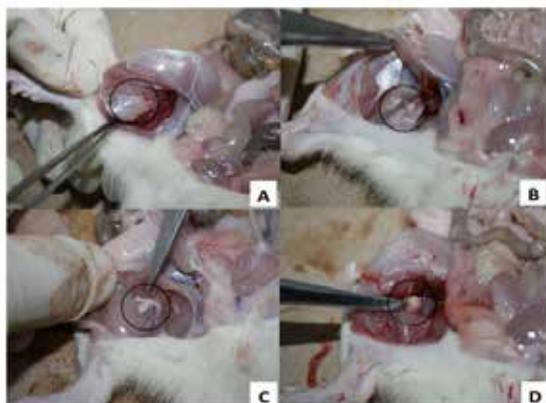


Fig. 4. Ratas macho del grupo vacunado con VA-MENGOC-BC[®]. Extremidad posterior izquierda. Sitio de inoculación, A- Eutanasia realizada a los 3 días, el círculo enmarca tejido muscular donde se observa posible formación abscedada difusa, B- Eutanasia realizada a los 7 días, el círculo enmarca posible formación granulomatosa abscedada ligeramente delimitada, C- Eutanasia realizada a los 14 días, el círculo enmarca posible formación granulomatosa abscedada con mayor delimitación, D- Eutanasia realizada a los 28 días, el círculo enmarca una franca formación abscedada, bien delimitada y encapsulada.

Tabla 2. Estudio de tolerancia local de la vacuna VA-MENGOC-BC[®]. Resumen de las alteraciones macroscópicas relacionadas con el sitio de inoculación en ratas SD machos observadas en las diferentes eutanasias.

Eutanasias Días*	Frecuencia de las alteraciones observadas	Grupos de tratamientos/n animales			
		C	V-1	V-2	Total
3	Procesos inflamatorios de posible origen granulomatoso difusos	0/5a 0%	5/5b 100%	4/5b 80%	9/15 60%
	Adenitis en ganglios poplíteos	0/5a 0%	5/5b 100%	5/5b 100%	10/15 66,6%
	Adenitis en ganglios inguinales profundos	1/5a 20%	5/5b 100%	5/5b 100%	11/15 73,3%
7	Posibles formaciones granulomatosas que comienzan a abscedar	0/5a 0%	4/5b 100%	5/5b 100%	9/15 60%
	Adenitis en ganglios poplíteos	0/5a 0%	5/5b 100%	5/5b 100%	11/15 73,3%
	Adenitis en ganglios inguinales profundos	0/5a 0%	5/5b 100%	5/5b 100%	10/15 66,6%
14	Posibles formaciones granulomatosas abscedadas	0/5a 0%	4/5b 80%	2/5a 40%	6/15 40%
	Adenitis en ganglios poplíteos	0/5a 0%	3/5b 60%	3/5b 60%	6/15 40%
	Adenitis en ganglios inguinales profundos	0/5a 0%	3/5b 60%	4/5b 80%	7/15 46,6%
28	Posibles formaciones granulomatosas francamente abscedadas y encapsuladas	0/5a 0%	5/5b 100%	5/5b 100%	10/15 66,6%
	Adenitis en ganglios inguinales profundos	0/5a 0%	2/5a 40%	3/5b 60%	5/15 33,3%

Leyenda: *- días post-inoculación; V1- animales vacunados con el lote 0021 de 24 meses; V2- animales vacunados con el lote 9001-Y de 36 meses; C- animales controles inoculados con PBS; n- cantidad de animales, % - por ciento del total de animales observados con la alteración descrita, Prueba exacta de Fisher $p \leq 0,05$ letras diferentes difieren.

Tabla 3. Frecuencia de cambios histológicos relacionados con el sistema inmune en el estudio de tolerancia local de VA-MENGOC-BC® en ratas SD machos observadas en las diferentes eutanasias.

Eutanasias	Frecuencia de las alteraciones observadas	Grupos de tratamientos/n animales			
		C	V-1	V-2	Total
3	Abundantes células cebadas en ganglios	2/5 40%	2/5 40%	1/5 20%	5/15 33,3%
	Formaciones granulomatosas de tipo macrofágico en músculos	0/5a 0%	4/5b 80%	5/5b 100%	9/15 60%
7	Abundantes células cebadas en ganglios	1/5 20%	0/5 0%	2/5 40%	3/15 20%
	Folículos linfoides secundarios	3/5 60%	4/5 80%	4/5 80%	11/15 73,3%
	Formaciones granulomatosas de tipo macrofágico en músculos	0/5a 0%	5/5b 100%	4/5b 80%	9/15 60%
	Abundantes células plasmáticas en ganglios	2/5 40%	4/5 80%	3/5 60%	9/15 60%
	Linfocitos en apoptosis en ganglios linfáticos	1/5 20%	3/5 60%	2/5 40%	6/15 40%
14	Abundantes células cebadas en ganglios	1/5 20%	1/5 20%	2/5 40%	4/15 26,6%
	Folículos linfoides secundarios	3/5 60%	4/5 80%	4/5 80%	11/15 73,3%
	Formaciones granulomatosas de tipo macrofágico en músculos	0/5a 0%	5/5b 100%	4/5b 80%	9/15 60%
	Abundantes células plasmáticas en ganglios	2/5 40%	4/5 80%	3/5 60%	9/15 60%
	Linfocitos en apoptosis en ganglios linfáticos	1/5 20%	3/5 60%	2/5 40%	6/15 40%
28	Abundantes células cebadas en ganglios	1/5 20%	5/5b 100%	5/5b 100%	10/15 66,6%
	Folículos linfoides secundarios	4/5 80%	4/5 80%	5/5 100%	13/15 86,6%
	Formaciones granulomatosas de tipo macrofágico en músculos	0/5a 0%	4/5b 80%	4/5b 80%	8/15 66,6%
	Abundantes células plasmáticas en ganglios	2/5 40%	2/5a 40%	2/5 40%	6/15 40%

Leyenda: *- días post-inoculación; V1- animales vacunados con el lote 0021 de 24 meses; V2- animales vacunados con el lote 9001-Y de 36 meses; C- animales controles con PBS; n- cantidad de animales, % - por ciento del total de animales observados con la alteración descrita, Prueba exacta de Fisher $p \leq 0,05$ letras diferentes difieren.

Estas alteraciones fueron observadas de forma similar en las zonas próximas al sitio de inoculación en las eutanasias realizadas a los 7, 14 y 28 días post-inoculación, las cuales se consideran características de productos vacunales que contienen en su formulación

hidróxido de aluminio como adyuvante de depósito. ^(13, 14)

Fuera del punto de inoculación, no fueron encontradas otras alteraciones o lesiones en la investigación macroscópica realizadas a los diferentes sistemas y órganos de los animales.

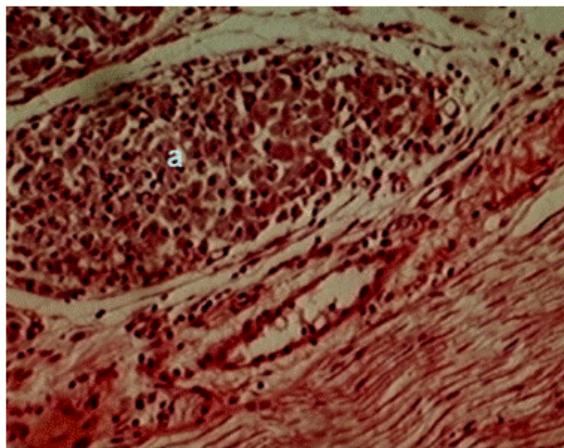


Fig. 5. Corte histológico del sitio de administración de VAMENGOC-BC® mostrando tejido muscular con formación granulomatosa de tipo macrófágico (a) de eutanasia 28 días post-inoculación. Hematoxilina-Eosina x 120.

Desde el punto de vista histopatológico las lesiones diagnosticadas como posibles procesos granulomatosos a nivel del punto de inoculación fueron verificadas microscópicamente (Fig. 5), dichas lesiones arrojaron diferencias significativas $p \leq 0,05$ con respecto al grupo control (Tabla 3).

De forma similar al hallazgo macroscópico, estas lesiones son frecuentemente observadas en animales a los cuales se les inoculan productos que contienen como adyuvante el hidróxido de aluminio como es el caso de VA-MENGOC-BC®, las mismas han sido observadas en experimentos similares y en la misma especie.⁽¹⁴⁾ De esta manera los procesos granulomatosos, solo se presentan en los animales donde se inoculó la vacuna que contiene el adyuvante.

Estas lesiones granulomatosas de tipo macrófágicas evolucionaron hacia procesos reparativos con sustitución por tejido conjuntivo que encapsuló las mismas. Los fenómenos descritos a nivel de los ganglios linfáticos regionales correspondientes a los puntos donde se inocularon las vacunas en ensayo han sido descritos para productos similares.⁽¹⁵⁾

Conclusiones

Bajo las condiciones del estudio y según los criterios establecidos, la vacuna VA-MENGOC-BC® que permaneció en estante durante 24 y 36 meses de 4 a 8 °C, no evidenció efectos adversos toxicológicos en el modelo animal, siendo bien tolerada después de su aplicación por vía intramuscular; por lo que se considera potencialmente no tóxica para humanos.

Referencias

1. World Health Organization. Epidemic meningitis control in countries of the African meningitis belt. *The Weekly Epidemiological Record*. 2018;93(14):173–84. Disponible en: <http://www.who.int/wer>.
2. World Health Organization. [Homepage on the internet]. Geneva: Developing a new generation Rapid Diagnostic Tests for Meningitis; 2018. Disponible en: <http://www.who.int/emergencies/diseases/meningitis/en/>.
3. World Health Organization. [Homepage on the internet]. Geneva: Situation Update on Meningitis C Epidemic risk; 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/infographic/meningitis/en/>.
4. World Health Organization. Guidelines on the evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccine, Technical Report Series No 987, Annex 2. Geneva: WHO; 2013. Disponible en: http://www.who.int/biologicals/vaccines/nonclinical_evaluation_of_vaccines/en/.
5. World Health Organization. Guidelines on nonclinical evaluation of vaccine. Technical Report Series, No. 927. Geneva: WHO; 2005. Disponible en: http://www.who.int/biologicals/vaccines/nonclinical_evaluation_of_vaccines/en/.
6. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1944; 3(82):377-90.
7. Verdier F. Non-clinical vaccine safety assessment. *Toxicology* 2002;134(1):37-43.
8. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the Testing of Chemicals No 404. Paris: OECD; 2004. Disponible en: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
9. The National Academies Press. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition. Washington: NAP; 2010. Disponible en: <https://www.nap.edu/download/12910>.
10. American Veterinary Medical Association. Guidelines on euthanasia. Schaumburg IL: AVMA; 2013. Disponible en: <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Euthanasia-Guidelines.aspx>.
11. Morton DB. Humane endpoints in animal experimentation for biomedical research: ethical, legal and practical aspect. *Laboratory animals* 2005;8:5-12.
12. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: GBIF; 2014. Disponible en: <http://www.R-project.org/>.
13. Núñez JF, Herrera L, Infante JF, González P, Pérez V, Argamasilla M, et al: Estudio de toxicidad por dosis única y tolerancia local de una vacuna antimeningocócica tipo B en ratas Sprague Dawley. *Vaccimonitor* 2006;15(2) 9-14.
14. Infante Bourzac JF. Estudio de inocuidad e inmunogenicidad protectogénica de la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC en modelos murinos. [Tesis Doctoral]. La Habana: Universidad Agraria de la Habana; 2000.
15. Fariñas M, Oliva R, Infante JF, Valdez Y, Nuñez D, Valmaceda T, et al. Ensayo piloto de inmunogenicidad y toxicidad preclínica de la vacuna Salmonella typhi conjugada en ratas Sprague Dawley.

- Retel. 2014;44:17-34. Disponible en: <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=936>.
16. López Y, Pastor M, Infante JF, Díaz D, Oliva R, Fernández S, et al. Repeated dose toxicity study of *Vibrio cholerae*-loaded gastro-resistant microparticles. *J Microencapsul* 2014;31:86-92.
17. Fariñas M, Arencibia DF, Díaz D, Infante JF, Valdés Y, Hernández T, et al. Estudio de Toxicidad por Dosis Única de la Vacuna Antimeningocócica ACW135 en Ratas Sprague Dawley. *Retel*. 2011;35:23-42. Disponible en: <https://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=775>.
18. Charles River Laboratories. [Homepage on the internet]. Wilmington MA: Charles River Labs-Research Models, Sprague Dawley Rat Informational Resources; 2018. Disponible en: <https://www.criver.com/products-services/find-model/sas-sprague-dawley-rat?region=3616>.
19. Taconic Technical Library. [Homepage on the internet]. Cambridge: Taconic Sprague Dawley, Growth and Phenotyping Data; 2018. Disponible en: <http://www.taconic.com/rat-model/sprague-dawley>.
20. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals: Ottawa: CCAC; 1984.
21. Ochoa RF, Baró IM, Menéndez J, Triana T, Mirabal M, Armesto M, et al. Reactogenicidad e inmunogenicidad de una nueva vacuna de toxoide tetánico y diftérico con concentración reducida en adolescentes cubanos. *VacciMonitor* 2006;15(2):13-7.
22. García HM, Thompson R, Valera R, Fando R, Fumane J, Mirabal M, et al. A single dose of live-attenuated 638 *Vibrio cholerae* oral vaccine is safe and immunogenic in adult volunteers in Mozambique. *VacciMonitor* 2011;20(3):1-8.
23. Hexagon. Standard Gage. Precision Measuring Instruments. Estocolmo: Hexagon Metrology; 2018. Disponible en: https://www.merici-pristroje.cz/files/ckeditor/5_Produkty/Standard_gage/Standard_Gage.pdf.
24. Liguori GR, Jeronimus BF, de Aquinas Liguori TT, Moreira LFP, Harmsen MC. Ethical Issues in the Use of Animal Models for Tissue Engineering: Reflections on Legal Aspects, Moral Theory, Three Rs Strategies, and Harm–Benefit Analysis. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2017;23(12):850-62.
25. Organization for Economic Cooperation and Development. Test No 439, In Vitro Skin Irritation, Reconstructed Human Epidermis Test Method. Paris: OECD; 2015 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264242845-en>.

Local tolerance study of the VA-MENGOC-BC[®] antimeningococcal vaccine in Sprague Dawley rats. Evaluation at 24 and 36 months of shelf

Abstract

Meningococcal meningitis continues to be a health problem in different countries and different vaccines have been obtained for the prevention of this disease. VA-MENGOC-BC[®] vaccine has been effective and safe in the prevention of meningococcal meningitis against serogroups B and C. This has shown good stability over time without changing its quality as a product; It was stored on a shelf for 24 and 36 months at temperatures of 4 to 8 °C. Their possible toxicological potential was evaluated through a local tolerance study in Sprague Dawley rats. Immunized animals were observed daily to evaluate local and systemic toxicity symptoms. Body weight, water and feed intake, thermometry, musculometry were performed and dermal irritability by the Draize method. Anatomopathological studies to observe possible adverse effects were made. No symptoms of toxicity or deaths were observed. No differences were found between the experimental groups in terms of body weight, water and food consumption, no fever or local irritability was evident. Anatomopathologically no lesions of diagnostic value were observed, at the site of inoculation, granulomatous processes of macrophagic type characteristic in vaccines containing aluminum hydroxide were observed. These results allowed us to conclude that the VA-MENGOC-BC[®] vaccine that remained on the shelf for 24 and 36 months did not show any local or systemic effects in rats.

Keywords: VA-MENGOC-BC[®], local tolerance, thermometry, musculometry, dermal irritability, Sprague Dawley.

Recibido: Noviembre de 2018

Aceptado: Diciembre de 2018