

## Infectividad del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo en hámster Sirio Dorado como modelo para ensayos de inmunogenicidad y eficacia de biomoléculas y candidatos vacunales

Nibaldo Luis González-Sosa<sup>1\*</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8665-4413>  
Reynaldo Oliva-Hernández<sup>2</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8198-9161>  
Madeline Blanco-de Armas<sup>1</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9243-066X>  
Juan Francisco Infante-Bouzac<sup>2</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6369-8608>  
Juliet María Enríquez-Puertas<sup>1</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3951-2498>  
Sandra Rodríguez-Salgueiro<sup>3</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3341-128X>  
Mireida Rodríguez-Acosta<sup>1</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1574-6951>  
Dagmar García-Rivera<sup>2</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2099-1791>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Central Centro de Productos Naturales. La Habana, Cuba.

**Autor para correspondencia:** [nibaluis@gmail.com](mailto:nibaluis@gmail.com)

La rápida propagación del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo desencadenó una emergencia sanitaria global con la consecuente necesidad de desarrollar vacunas y terapias que requieren el empleo de modelos animales para sus evaluaciones. Con el objetivo de conocer el comportamiento de la infección con la cepa de coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo circulante en Cuba en el hámster Sirio Dorado y poder disponer de ese modelo animal en los ensayos de candidatos vacunales cubanos y fármacos contra el virus, se desarrolló un estudio de infectividad. Se utilizaron técnicas moleculares y cultivos virales que demostraron la presencia de ARN viral y virus infectivos en muestras de nasofaringe y pulmones desde el día 3 post infección, periodo donde se observó el pico de mayor concentración viral, seguido de una declinación gradual de la carga viral hasta el día 14. Los hámsteres infectados manifestaron signos de enfermedad, con reducción del peso corporal más notable en los días 5 y 7 post infección. La histopatología demostró ocurrencia de daño pulmonar de severo a grave, principalmente en los días 5 y 7 post infección. Los resultados permiten concluir que el hámster Sirio Dorado es susceptible a la infección con la cepa D614G de coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo circulante en Cuba y reproduce una enfermedad similar a la que sufren los humanos con infecciones leves o moderadas durante la COVID-19, por lo que constituye un modelo valioso para estudios preclínicos con candidatos vacunales y fármacos para el tratamiento de la infección por coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo.

### Introducción

La enfermedad COVID-19, ocasionada por el coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés) emergió a finales del 2019 en Wuhan, China, con el reporte de casos graves de neumonías de etiología desconocida y se propagó rápidamente, con una agresividad inusual, por el resto del planeta. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la declaró como emergencia de salud

pública de importancia internacional y la reconoció como una pandemia cuando había 4.291 fallecidos y 118. 000 casos en 114 países.<sup>(1)</sup> Cuba se sumó al empeño de la OMS para controlar la propagación de la COVID-19 e inició la búsqueda de tratamientos para los enfermos y vacunas capaces de prevenir estadios graves de la enfermedad, consolidando investigaciones preclínicas que requerían disponer de un modelo animal que simulara la enfermedad en el humano. Los modelos

\* MSc. Investigador del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, La Habana, Cuba.

animales (monos, mangostas, ratones, curieles y hámsteres) demostraron ser esenciales para investigar la patogenia del virus, sus variantes de preocupación, los correlatos de protección de las vacunas y las terapias posteriores a la exposición. A cada modelo se le atribuyen ventajas y desventajas, pero a pesar de lo novedoso de la enfermedad y lagunas en su conocimiento, el hámster se considera entre los que mejor recapitula la enfermedad moderada en humanos,<sup>(2)</sup> además de las ventajas que le confieren su bajo costo, tamaño y fácil manejo que facilitan su cuidado. Con el objetivo de conocer el curso de la infección inducida por el SARS-CoV-2 en el hámster Sirio Dorado se desarrolló un estudio de infectividad cuyos resultados se presentan en este artículo.

## Materiales y Métodos

### Condiciones de seguridad del estudio

Las actividades con SARS-CoV-2 y animales infectados se realizaron dentro de la instalación de contención microbiológica de nivel 3 de bioseguridad, del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (Cuba) con licencia de autorización emitida por la Oficina de Regulación y Seguridad Ambiental del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente de Cuba.<sup>(7)</sup>

### Virus

SARS-CoV-2, cepa D614G, aislamiento cubano (código CU 2010-2025), con secuencia genotípica referida en GISAID: hCov-19/Cuba/DC01/2020. El virus se aisló de exudado nasofaríngeo de paciente asintomático diagnosticado con SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real (rRT-PCR).<sup>(3)</sup>

### Modelo animal

Hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*), ejemplares machos de 6 a 8 semanas de edad.

### Infección del modelo

Previo a administrar el inóculo viral infectivo, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilacina (200 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente) por vía intraperitoneal. La inoculación se realizó por la vía intranasal (IN) con una concentración viral de  $10^4$

TCID<sub>50</sub> (del inglés, tissue culture infectious dose 50%) en 100  $\mu$ L de medio MEM con antibiótico, administrado en las dos fosas nasales.

### Grupos de estudio

Se utilizaron 20 hámsteres. Un grupo estuvo compuesto por 12 animales inoculados con dosis virales de  $10^4$  TCID<sub>50</sub>, separados en cuatro subgrupos de tres animales, y otro grupo por ocho animales sin infectar que recibieron 100  $\mu$ L de medio MEM con antibiótico (control negativo). Se ubicaron en aisladores de animales independientes. Se sacrificaron tres animales infectados y dos controles negativos por día, en los tiempos 3, 5, 7 y 14 días posteriores a la fecha de inoculación del virus.

### Observaciones clínicas

Se observó el estado físico de cada animal desde la fecha de inicio experimental. Se estableció como línea base del peso corporal el día de la inoculación (tiempo cero). Los pesajes se realizaron los días 0, 3, 5, 7 y 14 post infección. Se realizó exploración clínica dos veces al día durante las primeras 72 h y luego diariamente, prestando atención a la aparición de signos respiratorios, como la hiperventilación o polipnea. Se evaluó grado de actividad, posturas y temperatura corporal en la región torácica con termómetro infrarrojo, en iguales intervalos de tiempo.

### Toma de muestras faríngeas y de pulmón

Para realizar los estudios de reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rRT-PCR) y cultivo viral de las muestras, se efectuaron hisopados faríngeos con hisopos estériles, embebidos en medio MEM con antibiótico y lavados nasofaríngeos posterior a la eutanasia, a tres animales infectados y dos controles negativos en los tiempos 3, 5, 7, y 14 días post infección. Los pulmones extraídos se examinaron macroscópicamente y por estudio histopatológico, así como por cultivo viral y rRT-PCR.

### Procesamiento histológico

Las muestras de un fragmento del lóbulo apical del pulmón derecho fueron deshidratadas con etanol a concentraciones crecientes desde 70% hasta 100%.

Posteriormente, se incluyeron en bloques de parafina y se realizaron cortes de 4 µm de grosor mediante micrótopo. Se prepararon láminas histológicas teñidas con hematoxilina y eosina para estudiar la morfología de pulmón por microscopía óptica. Se realizaron microfotografías con cámara digital, acoplada al microscopio.

En el análisis histopatológico se determinó el área estimada de afectación del pulmón (AEAP), evaluando cada fragmento de tejido seleccionado en toda su extensión y se calculó el daño pulmonar agudo (DPA) en cinco campos histológicos por animal, acorde con lo descrito por la Sociedad Americana del Tórax.<sup>(4)</sup> Se promediaron los puntajes de los campos evaluados para cada parámetro y se calculó el puntaje de DPA de cada animal mediante la fórmula siguiente, donde A, B, C, D y E representan los cinco campos histológicos:

$$\text{Puntaje de DPA} = \frac{[(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)]}{(\text{número de campos histológicos} \times 100)}$$

### **Ensayo de reverso transcripción- reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real a partir de muestras de lavado nasofaríngeo y órganos**

Se realizó inactivación viral a 140 µL de muestra, previo a la extracción automatizada del ARN. La detección del SARS-CoV-2 se efectuó a partir de 5 µL del ARN extraído, utilizando los cebadores y sondas para la detección del gen de la envoltura, en el estuche comercial RIDA®- GENE-SARS-CoV-2-RUO (R-Biopharm AG) según instrucciones del fabricante.<sup>(5)</sup> Para la confirmación se emplearon los cebadores y la sonda disponibles en el estuche comercial Light Mix RdRP COVID-19 (TIB MOLBIOL, Roche), del gen de la polimerasa del SARS-CoV-2 y la enzima Superscript III One Step quantitative RT-PCR with PlatinumTaq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen).<sup>(6)</sup> Se utilizó la plataforma para PCR tiempo Real Rotor Gene Q 5 plex (QIAGEN).

Se determinaron los valores de ciclo de umbral (Ct, del inglés, cycle threshold), (número de ciclos necesarios para detectar el ARN viral mediante rRT-PCR). El ensayo de rRT-PCR se consideró válido cuando los controles positivos mostraron curva sigmoidea típica, con valor de Ct entre 25,0 y 28,0 y los controles negativos no mostraron señal de amplificación. Las

muestras con curvas típicas de PCR y valores de Ct menor a 36 ciclos para el gen E y menores a 40 ciclos para el gen RdRP se consideraron positivos, siempre que el control interno resultase igualmente positivo (Ct de aproximadamente 36 ciclos).<sup>(6)</sup>

### **Cultivo viral a partir de muestras de los animales**

Se inocularon por duplicado 200 µL de las muestras, obtenidas de los diferentes grupos de estudio, en placas de 24 pozos con células Vero E6. Se incubaron 1 h a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, posteriormente se agregó medio MEM suplementado con 4% de suero fetal bovino y antibióticos. Se incubaron durante 7 días en iguales condiciones. En cada placa se utilizaron dos pozos sin muestras, como controles celulares. Las células inoculadas se monitorearon diariamente mediante microscopio invertido para detectar la aparición de efecto citopático (ECP). Cada muestra tuvo al menos tres pases, antes de informar el aislamiento como negativo. Al detectar el ECP, las células fueron desprendidas y sometidas a ciclos de congelación a -80°C y descongelación a 37°C y transferidas a una placa de 24 pozos con células Vero E6. Para confirmar la presencia del SARS-CoV-2 se realizaron ensayos de viabilidad celular por ECP y rRT-PCR a partir del ARN viral del sobrenadante de cultivo.

### **Consideraciones éticas de los ensayos**

Los ensayos con animales se realizaron bajo las normas y directrices establecidas para el manejo de los animales de experimentación.<sup>(7)</sup> Se realizó eutanasia según el diseño del estudio, posterior a 4 h de ayuno, con sobredosis de tiopental sódico (80 mg/kg de peso animal, Laboratorios AICA, La Habana, Cuba).

### **Procesamiento estadístico de los datos recogidos**

Se determinaron las diferencias estadísticas en el comportamiento del peso corporal entre animales infectados y controles, así como entre los valores de ciclo de umbral de las rRT-PCR para muestras de nasofaringe y pulmones, utilizando una prueba de ANOVA de dos vías y Pairwise-t-Test para las comparaciones múltiples, con un nivel de significación estadística del 0,05 para todas las comparaciones. Los datos se analizaron mediante la aplicación informática RStudio 2024.09.0 Build 375.

## Resultados

### Manifestaciones clínicas

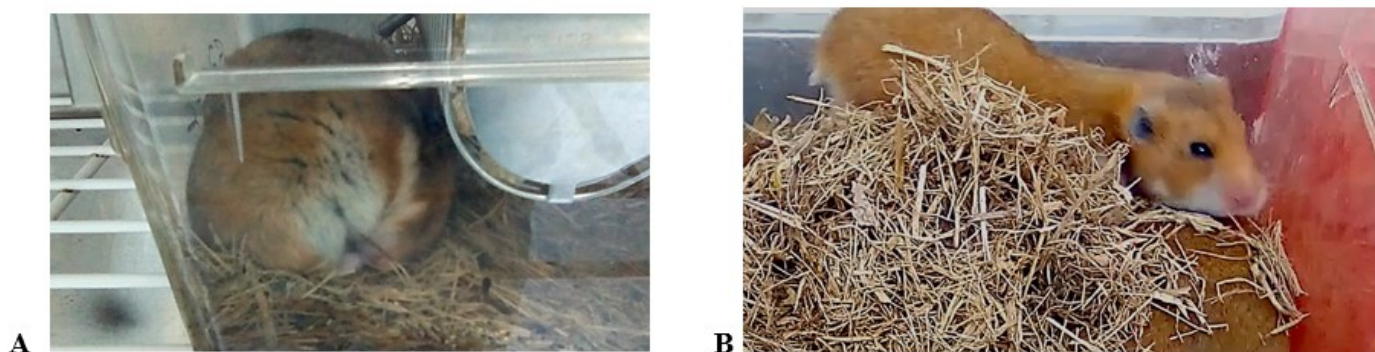
En los animales inoculados se observó disminución de la actividad física hasta 5 días post infección. Fue característico el signo de postración del animal a partir del tercer día, con la postura peculiar de espalda flexionada (Fig. 1 A), acompañada de respiración arrítmica y abdominal. En el grupo control negativo no se observaron tales manifestaciones. (Fig. 1 B).

A partir del tercer día de observación ocurrió disminución del peso corporal en los animales inoculados. El análisis del comportamiento del peso de los animales infectados mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con relación al control negativo en los días 5 y 7. Se observaron las

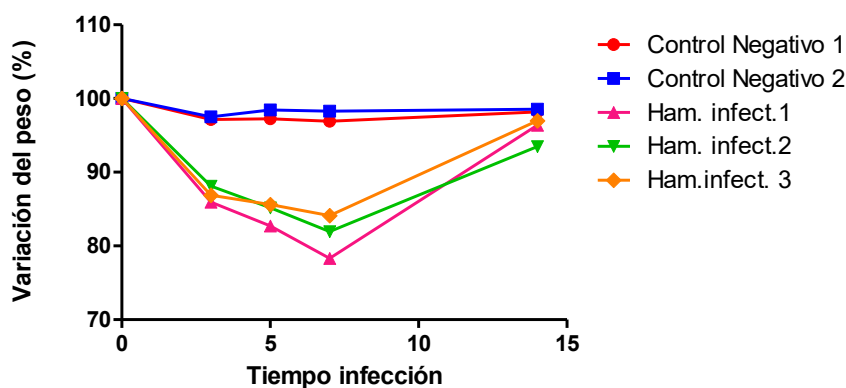
mayores pérdidas de peso en el día 7 post infección (Fig. 2). Los animales recuperaron sus pesos corporales a los 14 días post infección. En la temperatura corporal no se observaron diferencias, entre los hámsteres infectados y el grupo control negativo sin inocular.

### Detección de ARN viral de SARS-CoV-2

Se detectó ARN viral en las muestras de nasofaringe y pulmón de los hámsteres inoculados, los valores de Ct fluctuaron entre 9,07 y 15,53 (nasofaringe) así como entre 10,88 y 13,84 (pulmón) en los días 3 y 5 post infección (Tabla 1). Entre las muestras de pulmón y nasofaringe no hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de Ct y en ambos casos los valores fueron inferiores al control positivo de PCR (Ct de 24,74), Figura 3.



**Fig. 1.** A: Posición del animal mostrando la clásica postura de espalda flexionada, signo peculiar post infección con el virus SARS-CoV-2. B: control negativo.

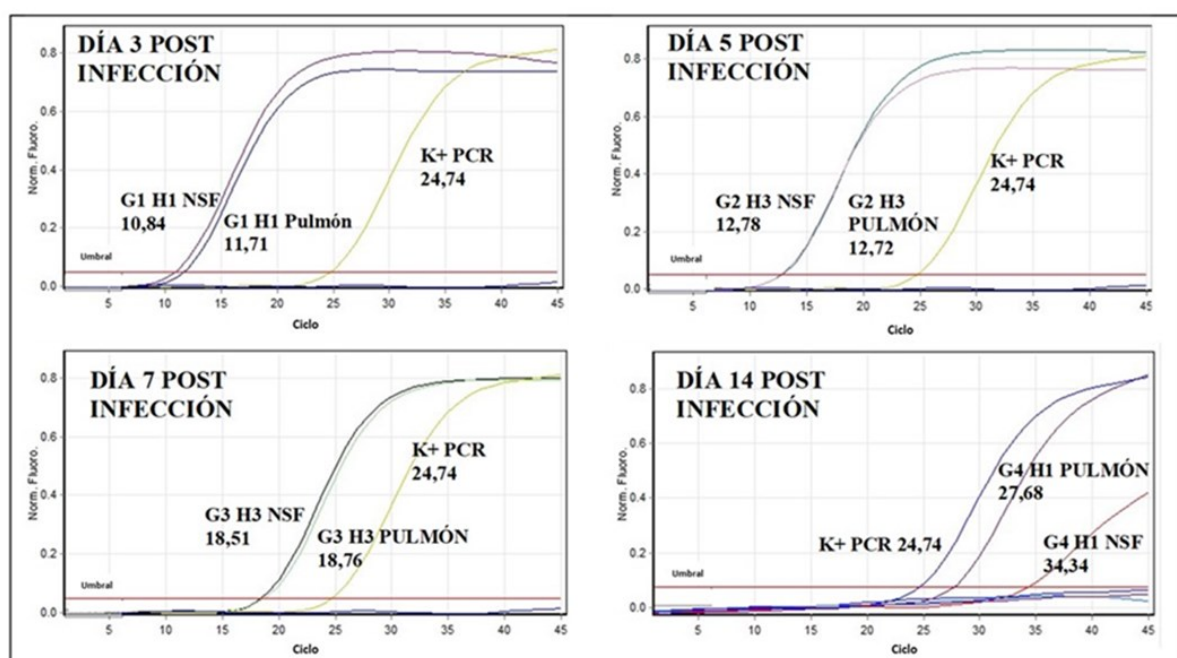


**Fig. 2.** Variación del peso corporal de cada animal del grupo observado por 14 días. Hámsteres inoculados con dosis virales de  $10^4$  TCID<sub>50</sub> (Ham. Infect. 1,2,3) y animales sin infectar (Control Negativo 1 y 2).

**Tabla 1.** Valores de Ct de las rRT-PCR de muestras de nasofaringe y pulmones de animales infectados. Se representan los valores medios y la desviación estándar (DE).

Animales	Ct Día 3 G1		Ct Día5 G2		Ct Día 7 G3		Ct Día 14 G4	
	NSF	Pulmón	NSF	Pulmón	NSF	Pulmón	NSF	Pulmón
H1	10,84	11,71	13,42	13,84	20,8	17,42	34,34	27,68
H2	12,61	10,88	15,53	13,61	18,46	19,13	29,98	28,40
H3	9,07	11,77	12,78	12,72	18,51	18,76	32,56	28,61
<b>Media</b>	10,84	11,45	13,91	13,39	19,26	18,44	32,29	28,23
<b>DE</b>	1,77	0,50	1,44	0,59	1,34	0,90	2,19	0,49

NSF: nasofaringe



**Fig. 3.** Curvas de rRt-PCR de muestras de lavados nasofaríngeos y pulmón de hámster a los 3, 5, 7 y 14 días de inoculados con  $10^4$  TCID<sub>50</sub>. NSF: muestra de nasofaringe. K+ PCR: control positivo de PCR. G1H1: grupo 1 hámster 1. G2H3: grupo 2 hámster 3. G3H3: grupo 3 hámster 3. G4H1: grupo 4 hámster 1.

Posterior al día 7 de infección, se observó el inicio del corrimiento de las curvas de PCR, aumentando los valores de Ct, entre 18,46 y 20,8 (nasofaringe) y entre 17,42 y 18,76 (pulmón). En contraste con lo observado en las rRT-PCR de días anteriores, a partir del día 14 post infección se apreció la separación de las curvas de PCR de las muestras de nasofaringe y pulmón, indicando una mayor concentración de partículas virales en pulmón (Ct medio 28,23) con relación a la observada a nivel de mucosa nasofaríngea (Ct medio 32,29). El valor absoluto de la diferencia de los promedios de Ct para el día 14 fue 4,5 veces mayor en la muestra de nasofaringe, tardando

cuatro ciclos más en detectar el ARN viral, aspecto que clínicamente pudiera sugerir una importante reducción de la carga viral en nasofaringe con relación a los pulmones. La detección del ARN viral en ciclos de umbral, superiores a los del control positivo de la PCR, sugiere una disminución de la carga viral en ese tiempo (Fig. 3). En los hámsteres no infectados no se detectó ARN viral en los días de monitoreo.



### Descripción de observaciones macroscópicas y hallazgos histopatológicos

A partir del día 3 post infección se corroboraron daños en el tejido pulmonar de los animales inoculados, en correspondencia con la aparición de los primeros signos de enfermedad. Las lesiones principales se visualizaron en los pulmones de los animales con 5 y 7 días de infección, observando la aparición de zonas necróticas o coágulos e, incluso, zonas con edemas. En los pulmones de los hámsteres del grupo control negativo, no se observaron lesiones macroscópicas, resultados que coinciden con el puntaje de DPA determinado por el estudio histopatológico, donde en el día 3 post infección los animales tuvieron un valor promedio de puntaje de 0,11 (DE  $\pm$  0,047), mientras que en los días 5 y 7 post infección el puntaje de daño fue superior: 0,14 (DE  $\pm$  0,029) y 0,12 (DE  $\pm$  0,025), respectivamente, y disminuyó en el día 14 a 0,10 (DE  $\pm$  0,026). En los hámsteres controles negativos el puntaje fue de 0,00.

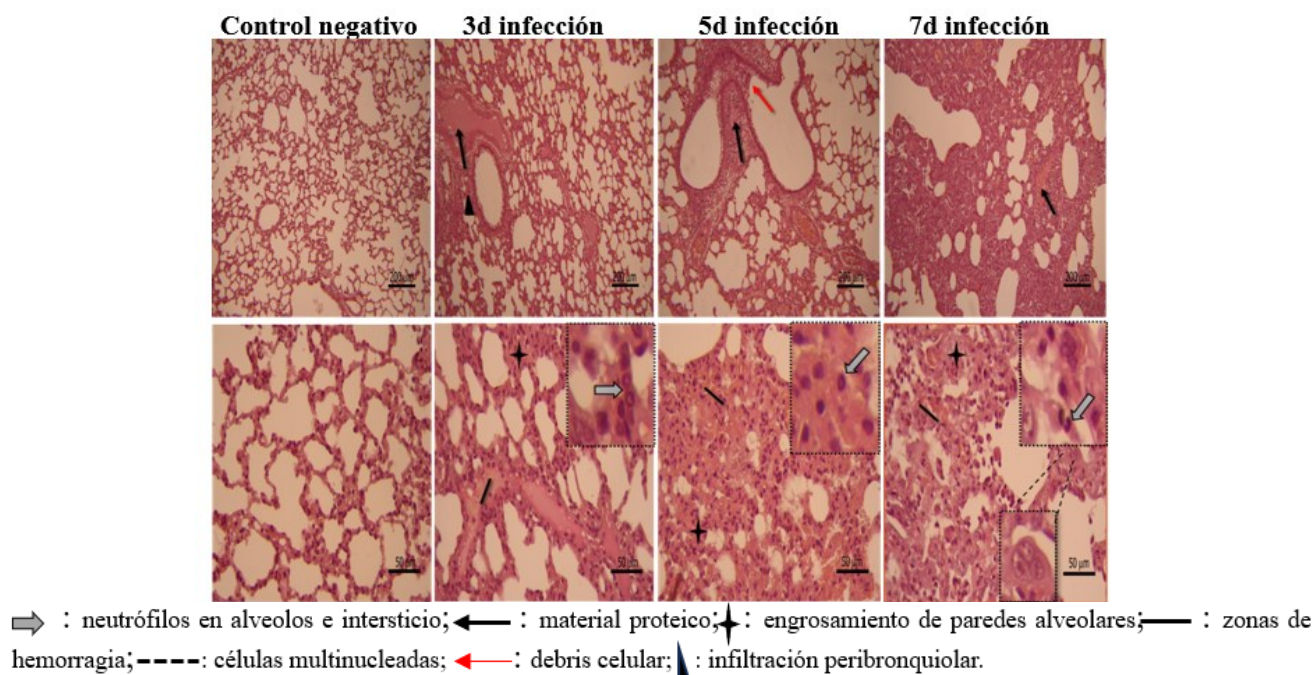
En la Figura 4 se muestran los principales hallazgos histopatológicos en los pulmones de los animales. La inoculación IN del virus indujo alteraciones en el parénquima pulmonar de los hámsteres, correspondiendo fundamentalmente con una neumonía

intersticial acompañada de bronquitis desde los 3 a los 14 días.

En los animales infectados, se constató presencia de debris celular, células inflamatorias y material proteico en las luces bronquiolares e infiltración peribronquiolar de moderada a abundante con linfocitos y algunos neutrófilos. Se observó engrosamiento marcado de las paredes alveolares a partir del día 3 de infección y posterior pérdida de la estructura normal de los alveolos con edema intersticial, abundantes alveolos hemorrágicos y presencia de neutrófilos en el intersticio alveolar. En los días 5 y 7 de infección se observó daño severo difuso en el parénquima pulmonar y presencia de células multinucleadas en las paredes alveolares. En el día 14 se apreciaron alteraciones que sugieren el paso de un estado agudo a uno subagudo, dada la presencia de eosinófilos en estado de degranulación y discreta proliferación fibroblástica a nivel de los alveolos.<sup>(8)</sup>

### Cultivos virales de las muestras

En los cultivos celulares se recobró virus SARS-CoV-2 a partir de la inoculación de las muestras tomadas los días 3, 5 y 7 post infección, procedentes de lavados nasofaríngeos y pulmones de los animales infectados IN



**Fig. 4.** Imágenes histopatológicas de los pulmones de los animales infectados en los días 3 (3d), 5 (5d) y 7 (7d) post inoculación viral con  $10^4$  TCID<sub>50</sub> y sin inocular (control negativo).

con dosis  $10^4$  TCID<sub>50</sub>. La observación del ECP en las células Vero E6 evidenció la presencia de virus replicativos en la mucosa nasofaríngea y pulmones de los hámsteres infectados.

## Discusión

La proteína de espiga del SARS-CoV-2 emplea receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) del huésped para entrar en las células y replicarse.<sup>(9)</sup> En el hámster Sirio Dorado las proteínas ACE2 son muy similares a la ACE2 humana, con sólo 3-4 mutaciones en la interfaz, y presentan la mayor afinidad de unión al pico de SARS-CoV-2, entre todas las especies excepto humanos y macacos Rhesus,<sup>(10)</sup> razones que lo hacen ser, entre otros factores, un modelo animal selectivo para estudios de infectividad e inmunogenicidad.

A diferencia de lo que ocurre con el virus del síndrome respiratorio agudo severo que se replica en los pulmones de los hámsteres, pero sin ocasionar pérdida de peso, ni evidencia de enfermedad,<sup>(11)</sup> durante la infección con SARS-CoV-2 en los hámsteres se ha descrito anosmia, neurotropismo e inflamación vascular,<sup>(12)</sup> y la ocurrencia de lesiones patológicas en los pulmones, similares a las reportadas en pacientes con neumonía por COVID-19.<sup>(13)</sup> En esta investigación, además de demostrar la presencia de ARN viral en las muestras de nasofaringe y pulmones de los animales inoculados, se observó a partir del día 3 post inoculación, la aparición de signos de enfermedad.

La significativa disminución del peso corporal de los animales enfermos (entre un 15 y un 20%) en los días 5 y 7 post inoculación, se corresponde con las observaciones realizadas por otros autores utilizando dosis de inóculos y animales adultos similares, donde registraron pérdidas de peso entre 13,8 y 21,9% al séptimo día post inoculación.<sup>(14)</sup> Los estudios realizados por Chan, et al. y Sia, et al., describieron pérdidas de peso corporal alrededor del 11%<sup>(10,15)</sup> en igual periodo de observación.

La poca variación de la temperatura corporal entre infectados y no infectados coincidió con los reportes de otros autores en hámsteres infectados de diferentes grupos etarios.<sup>(16)</sup>

El método para deducir las cargas virales en las muestras según los valores de Ct, permitió apreciar la dinámica del proceso infeccioso en el modelo. En todos los animales infectados, se detectó ARN del virus desde el día 3 post infección y se infirió por los valores de Ct la disminución progresiva de la carga viral hasta los 14 días post infección, tiempo donde se apreció una reducción significativa de material genómico en las muestras. En la literatura está bien descrita la utilidad del ensayo de rRT-PCR para estimar la carga viral mediante el valor de Ct. Se basa en la información que proporcionan los valores de Ct, como una medida inversa con relación a las cargas virales presentes en las muestras.<sup>(21)</sup> Valores bajos de Ct, representan un menor número de ciclos de amplificación para detectar el ARN viral, lo que se traduce como mayor carga viral estimada en la muestra. Una prueba que registra un resultado positivo después de 12 rondas (valor de Ct de 12) comienza con más de 10 millones de veces más material genético viral que una muestra con un valor de Ct de 35,0.<sup>(17)</sup>

Los valores bajos de Ct observados en muestras de pulmón y nasofaringe al tercer día de infección, apuntan a la ocurrencia del pico de multiplicación viral en ese tiempo, al ser detectado tempranamente el ARN viral en los ciclos de PCR por los altos valores de carga viral presentes en las mismas; resultados que coinciden con lo reportado por otros autores, que señalan la presencia de los picos de ARN viral y de títulos infecciosos en pulmones y lavados faríngeos, al tercer día de infectados los hámsteres con inóculos virales entre  $10^3$  y  $10^{5.3}$  unidades formadoras de placas (UFP).<sup>(13)</sup> Otros estudios señalan que la ocurrencia del pico de multiplicación viral depende de las concentraciones virales de los inóculos y puede ocurrir entre el 2 y 5 día post infección.<sup>(10)</sup>

Aunque se han realizado investigaciones para determinar las dosis infectivas mínimas del SARS-CoV-2 en humanos y otros animales, aún no están bien definidas,<sup>(18)</sup> por lo que resulta necesario continuar las investigaciones para determinar la dosis infectiva óptima, ya que el exceso de virus en los inóculos pudiera producir interferencias por la detección de ARN residual procedente de los inóculos de reto<sup>(19)</sup> y los inóculos con cargas virales bajas pueden limitar la

aparición de lesiones más severas en los animales y falsear los resultados de eficacia de candidatos vacunales y fármacos antivirales.

En los resultados se destaca la poca diferencia en los valores de Ct entre las muestras de nasofaringe y pulmones en los primeros 7 días de infección, lo que coincide con lo descrito por otros autores<sup>(13,16)</sup> y permite sugerir a los lavados nasofaríngeos como un sustituto confiable para determinar la presencia o ausencia de virus en los pulmones en la primera semana de infección, e indica la utilidad de esta técnica de muestreo en el monitoreo de la replicación del SARS-CoV-2 en los hámsteres.

A diferencia de lo explicado en el ensayo de infectividad realizado por Imai M, et al., donde no se detectó virus en los órganos de animales infectados (excepto dos muestras) al día 10 de infección,<sup>(13)</sup> en este estudio observamos en el día 14, muestras de nasofaringe y pulmón positivas, aunque con valores de Ct altos, próximos a negativizar, sugestivos de carga viral baja, particularmente en nasofaringe.

Desde el punto de vista patológico, en los hámsteres no ha sido bien determinada la relación entre la gravedad de la patología pulmonar y los signos clínicos de leves a moderados.<sup>(15,20)</sup> No obstante, en el estudio se observó correspondencia entre los animales con mayores signos de enfermedad y las observaciones macroscópicas de lesiones pulmonares que se asociaron al daño pulmonar producto del proceso infeccioso con SARS-CoV-2. En los animales infectados, se apreció un aumento progresivo y considerable de la neumonía intersticial a través del tiempo de observación, alcanzando su máxima expresión el día 7 post infección, los hallazgos histopatológicos se corresponden con lo descrito por Rosenke K, et al., que describieron en las secciones pulmonares de los hámsteres la presencia de neumonía intersticial crónica activa diseminada, de moderada a grave.<sup>(21)</sup>

En los días donde se observaron las mayores lesiones según los puntajes de daño pulmonar (días 5 y 7 post infección), fueron detectadas cargas virales altas en el tejido pulmonar. Resultados que coinciden con lo publicado por otros autores que reportaron el pico de patología y consolidación pulmonar en el día 7 post

infección.<sup>(10,13,18)</sup> El mayor daño patológico en los pulmones de los animales infectados se observó unos pocos días después de estimarse la ocurrencia del pico de concentración viral lo que se corresponde con lo descrito por otros autores en varios modelos de animales.<sup>(13,22)</sup> comportamiento diferente a lo que ocurre en la COVID-19 en humanos donde la progresión clínica de la enfermedad se asocia con la inmunopatología y suele ocurrir mientras las cargas virales están disminuyendo.<sup>(23)</sup>

La investigación demostró que el modelo hámster Sirio Dorado es susceptible a la infección por la variante D614G de SARS-CoV-2 circulante en Cuba y confirma que el virus reproduce un proceso infeccioso respiratorio similar a la COVID-19 en humanos, con signos evidentes de enfermedad, que se correlacionan con las lesiones pulmonares observadas. Los ensayos de rRT-PCR y cultivo viral demostraron la presencia de virus en la mucosa nasal y pulmones a partir del día 3 de infección, así como disminución del ARN viral a los 14 días, sugiriendo ciclos de multiplicación viral mucho más cortos y recuperación más rápida en el modelo animal que en el humano. Los resultados alcanzados avalan la utilización del biomodelo como una herramienta analítica de utilidad para la evaluación de la eficacia de candidatos vacunales y medicamentos cubanos contra la COVID-19.

### **Conflicto de intereses**

Los autores no declaran conflictos de intereses.

### **Roles de autoría**

Nibaldo Luis González-Sosa: conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, administración del proyecto, redacción borrador original, redacción-revisión y edición.

Reynaldo Oliva-Hernández: conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología.

Madeline Blanco-de Armas: conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, redacción-revisión y edición.

Juan Francisco Infante-Bouzac: curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, redacción-revisión y edición.



Juliet María Enríque-Puertas: curación de datos, investigación.

Sandra Rodríguez-Salgueiro: curación de datos, análisis formal, metodología.

Mireida Rodríguez-Acosta: supervisión, redacción-revisión y edición.

Dagmar García-Rivera: conceptualización, administración del proyecto, supervisión, redacción-revisión y edición.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

### Agradecimientos

Los autores dedican este trabajo y agradecen por su contribución a la zootecnista Yuliet Sotes Sarguero, fallecida meses después de concluir el mismo.

Agradecemos, además, a: Mildrey Fariñas Medina, Liuber Yans Machado, Darcy Nuñez Martínez, Tamara Hernández Salazar, Enrique Noa Romero, Marta Dubed Echevarría, Alex Quintero.

### Referencias

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Alocución de apertura del Director General de la OMS en la rueda de prensa sobre COVID-19 celebrada el 11 de marzo de 2020. Ginebra: OMS;2020. Disponible en: <https://www.who.int/es/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. (Consultado en línea: 20 enero, 2024).
2. Muñoz-Fontela C, Dowling WE, Funnell SGP, Gsell PS, Riveros-Balta AX, Albrecht RA, et al. Animal models for COVID-19. *Nature*.2020; 586(7830): 509–15. doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2787-6>.
3. Noa Romero E, Enríque Puertas JM, Machado Zaldívar LY, González Sosa NL, Montero González TJ, Falcón Cama V, et al. SARS-CoV-2 isolation from Cuban COVID-19 patients. *American J Rare Dis Diagn Ther*. 2020; 3(1): 009-015. Disponible en: <https://www.sciresliterature.org/RareDisorders/AJRDDT-ID18.pdf>. (Consultado en línea: 20 enero, 2024).
4. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(5):725-38. doi: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0210ST>.

5. R-Biopharm AG. RIDA®GENE SARS-CoV-2 REF PG6820. Darmstadt: R-Biopharm AG;2020.
6. Nalla AK, Casto AM, Huang M-LW, Perchetti GA, Sampoleo R, Shrestha L, et al. Comparative performance of SARS-CoV-2 detection assays using seven different primer-probe sets and one assay kit. *J Clin Microbiol*.2020; 58:e00557-20. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.00557-20>.
7. Asociación Médica Veterinaria Americana. Asociación Médica Veterinaria Estadounidense: Guías para la eutanasia de animales:edición 2013. Schaumburg: Asociación Médica Veterinaria Americana; 2013.
8. Steinbach TJ, Patrick DJ, Cosenza ME. *Toxicologic Pathology for Non-Pathologists*. New York: Humana New York; 2020. doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9777-0>.
9. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004; 203: 631-7. doi: <https://doi.org/10.1002/path.1570>.
10. Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, Poon VK, Chan CC, Lee AC, et al. Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. *Clinical Infectious Diseases*. 2020; 71(9): 2428–46. doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>.
11. Roberts A, Vogel L, Guarner J, Hayes N, Murphy B, Zaki S, Subbarao K, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters. *J Virol*. 2005;79(1):503-11. doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.503-511>.
12. de Melo GD, Lazarini F, Levallois S, Hautefort C, Michel V, Larrous F, et al. COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci Transl Med*. 2021;13(596):eabf8396. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf8396>.
13. Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Loeber S, Halfmann PJ, Nakajima N, et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *PNAS*. 2020;117(28):16587–95. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>.
14. Dhakal S, Ruiz-Bedoya CA, Zhou R, Creisher PS, Villano JS, Littlefield K, et al. Sex Differences in Lung Imaging and SARS-CoV-2 Antibody Responses in a COVID-19 Golden Syrian Hamster Model. *mBio*. 2021;12(4): e0097421. doi: <https://doi.org/10.1128/mbio.00974-21>.
15. Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 2020; 583(7818):834-8. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>.

16. Osterrieder N, Bertzbach LD, Dietert K, Abdelgawad A, Vladimirova D, Kunec D, et al. Age-Dependent Progression of SARS-CoV-2 Infection in Syrian Hamsters. *Viruses*. 2020;12(7):779. doi: <https://10.3390/v12070779>.
17. Service RF. A call for diagnostic test to report viral load. *Science*. 2020;370(6512):22. doi: <https://10.1126/science.370.6512.22>.
18. SeyedAlinaghi S, Karimi A, Mojdeganlou H, Pashaei Z, Mirzapour P, Shamsabadi A, et al. Minimum infective dose of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 based on the current evidence: A systematic review. *Sage Open Medicine*. 2022; 10:20503121221115053. doi: <https://10.117/2053121221115053>.
19. Khoury DS, Wheatley AK, Ramuta MD, Reynaldi A, Cromer D, Subbarao K, et al. Measuring immunity to SARS-CoV-2 infection: comparing assays and animal models. *Nat Rev Immunol*. 2020; 20(12): 727-38. doi: <https://10.1038/s41577-020-00471-1>.
20. Yuan L, Zhu H, Zhou M, Ma J, Chen R, Chen Y, et al. Gender associates with both susceptibility to infection and pathogenesis of SARS-CoV-2 in Syrian hamster. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6(1):136. doi: <https://10.1038/s41392-021-00552-0>.
21. Rosenke K, Meade-White K, Letko M, Clancy C, Hansen F, Liu Y, et al. Defining the Syrian hamster as a highly susceptible preclinical model for SARS-CoV-2 infection. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):2673-84. doi: <https://10.1080/22221751.2020.1858177>.
22. Jiang Ren-Di, Liu Mei-Qin, Chen Ying, Shan Chao, Zhou Yi-Wu, Shen Xu-Rui, et al. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. *Cell*. 2020; 182(1): 50-8.e8. doi: <https://10.1016/j.cell.2020.05.027>.
23. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(5):565–74. doi: [https://10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://10.1016/S1473-3099(20)30196-1).

---

## **Infectivity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in Golden Syrian hamster as a model for immunogenicity and efficacy trials of biomolecules and vaccine candidates**

### **Abstract**

The rapid spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 throughout the world triggered a global sanitary emergency with the consequent need to develop vaccines and therapies against the virus, which require the use of animal models for their evaluations. An infectivity study was carried out to determine the behavior of infection with the circulating strain of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in Cuba in the Golden Syrian hamster in order to use this animal model in the trials of Cuban vaccine candidates and drugs against the virus. Molecular techniques and viral cultures were used, which demonstrated the presence of viral RNA and infective virus in samples of nasopharynx and lungs on day 3 post infection, period where the highest viral concentration peak was observed, followed by a gradual decline of the viral load until day 14. Infected hamsters showed signs of disease, with the most notable reduction in body weight on days 5 and 7 post infection. Histopathology showed occurrence of severe to serious lung damage, mainly on days 5 and 7 post infection. The results allow us to conclude that the Golden Syrian hamster is susceptible to infection by the D614G strain of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 circulating in Cuba, and reproduces a disease similar to that suffered by humans with mild infections during COVID-19, making it a valuable model for preclinical studies with vaccine and drug candidates for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection.

*Recibido: 8 de julio del 2024*

*Aceptado: 25 de noviembre del 2024*