



Sueros de animales convalecientes inmunizados con candidatos vacunales del Instituto Finlay de Vacunas, inhiben la colonización del SARS-CoV-2 en Hamster Sirio Dorado.

Nibaldo Luis González Sosa¹

Madeline Blanco de Armas¹

Reynaldo Oliva Hernández²

Enrique Noa Romero¹

Yanet Climent Ruiz²

Sonsire Fernández Castillo²

Mildrey Fariñas Medina²

¹ Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, Mayabeque, Cuba, madeniba@infomed.sld.cu

² Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba, dagmar.garcia@gmail.com

Resumen: El desarrollo de candidatos vacunales cubanos, estuvo acompañado de ensayos de inmunización y reto viral en modelos animales que aportaron valiosa información en los estudios preclínicos sobre inmunogenicidad y protección de las moléculas empleadas. Evaluar la capacidad de inhibir la replicación y colonización del SARS-CoV-2 en un modelo vivo, inoculado con virus y sueros hiperinmunes de animales convalecientes inmunizados con los candidatos vacunales fue el objetivo del trabajo. Se inmunizaron Hámster convalecientes de la infección por SAR-CoV-2 con una dosis de biomoléculas FR-01, FR01A y FR02. Se determinaron títulos de IgG anti RBD y anticuerpos neutralizantes. Los sueros hiperinmunes se pusieron una hora de contacto con el virus y la mezcla se inoculó vía intranasal a Hámster sanos. Se monitoreó peso corporal, signos de enfermedad, presencia de ARN viral por RT – PCR y replicación viral por efecto citopático en células Vero E6. Se realizó histopatología de los pulmones. Los Hámster convalecientes inmunizados tuvieron altos títulos de anticuerpos neutralizantes y se observó que en los animales inoculados con la mezcla de virus y sueros de convalecientes vacunados, ocurrió inhibición de la replicación viral en la mucosa nasofaríngea, con valores bajos de carga viral en pulmones y menor área de daño pulmonar, a diferencia de los animales inoculados con mezcla de sueros negativos y virus, donde se observaron valores altos de carga viral en nasofaringe y pulmones, así como agravamiento del daño pulmonar. Los resultados permiten concluir que las biomoléculas FR01, FR01A, FR02, inducen anticuerpos neutralizantes en convalecientes que inhiben la colonización del virus SARS-CoV-2 y evitan el agravamiento del daño pulmonar

Palabras clave: inhibición de la colonización, inmunogenicidad en hámster, SARS-CoV-2, neutralización del SARS-CoV-2.

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de una vacuna implica varias fases de estudio, donde el uso de modelos animales en las fases preclínicas continúa siendo de suma importancia para verificar seguridad y eficacia en organismos completos, más que en células aisladas o por predicciones bioinformáticas únicamente, herramientas que no han podido reemplazar el uso de los modelos para evaluar la respuesta inmune desencadenada contra un patógeno de interés.⁽¹⁾

La semejanza entre la fisiología humana y animal en algunos aspectos de los distintos modelos animales, ha sido útil debido a que proporciona valiosa información acerca del comportamiento de los sistemas humanos frente a los patógenos. Enfermedades infecciosas como las provocadas por Hantavirus, virus Ébola, virus Nipah, entre otras, se han estudiado a profundidad utilizando modelos animales, en particular Hámster Sirios Dorados⁽²⁾.

El desarrollo de candidatos vacunales cubanos contra la COVID-19, estuvo acompañado de diversos estudios en modelos animales en las etapas preclínicas de evaluación, donde se realizaron diferentes ensayos para demostrar la seguridad, inmunogenicidad y protección de las formulaciones, utilizando el biomodelo Hámster Sirio Dorado.

El modelo Hámster Sirio Dorado se ha descrito como un modelo animal ideal para los estudios de infectividad del SARS-CoV-2 y ensayos de reto viral, por su capacidad de reflejar la progresión de la enfermedad similar a la Covid-19 padecida por los humanos, además de las ventajas que proporciona su bajo costo, talla pequeña y fácil manejo.⁽³⁾

Los aislamientos de SARS-CoV-2 se replican de manera eficiente en los pulmones de los Hámster Sirios y causan lesiones patológicas graves en los pulmones de estos animales similares a las reportadas de pacientes con neumonía por COVID-19⁽⁴⁾; igualmente se ha demostrado que existe una alta interacción funcional del RBD del SARS-CoV-2 con el receptor ACE-2 del Hámster.⁽³⁾

Los sueros hiperinmunes inducidos por los diferentes candidatos vacunales contra la Covid-19 se evalúan por los títulos de anticuerpos IgG anti RBD y su funcionalidad para neutralizar el virus en ensayos *in vitro* o *in vivo*. Con el objetivo de evaluar la capacidad de neutralización de sueros hiperinmunes de animales convalecientes inmunizados con candidatos de vacunas Soberana 01 (FR01), Soberana 01A (FR01A) y Soberana 02 (FR02), se realizó un ensayo de inhibición de la colonización del SARS-CoV-2 utilizando el modelo vivo Hámster Sirio Dorado.

II. MÉTODO

Hámster machos adultos de 30 días de convalecencia a la infección con SARS-CoV-2, fueron inmunizados vía intramuscular con una dosis de los candidatos vacunales del Instituto Finlay de Vacuna (IFV), FR-01, FR-01A y FR-02. Se comprobaron los títulos de anticuerpos IgG anti RBD y de anticuerpos neutralizantes, previa inmunización de refuerzo y a los 21 días posteriores de vacunados.

Se tomaron 50 µL de suero de hámster convalecientes inmunizados con las diferentes biomoléculas y se mezclaron con 50 µL de virus SARS-CoV-2 (variante viral D614G) a una concentración de 10^4 DICC₅₀ en medio MEM con antibiótico. De igual manera se procedió con los sueros de convalecientes sin refuerzo de inmunidad, que también fueron mezclados con el virus, y suero de hámster sano sin inmunizar que se mezcló bajo las mismas condiciones, a modo de emplearlo como control positivo en el ensayo. Como placebo (control negativo) se utilizó suero de hámster sano sin inmunizar y sin mezclar con el virus.

Suero de ratas inmunizadas (28 días) con dosis de FR-01 y FR-01A igualmente fueron mezclados con el virus, de manera similar a los anteriormente descrito.

Las mezclas de los sueros con el virus se mantuvieron durante una hora a 37⁰C, posteriormente 100 µL de las mezclas de virus más sueros hiperinmunes, y los sueros controles positivos y negativos, fueron inoculados vía intranasal a 21 Hámster sanos, machos entre 100 y 120 g de peso, formando los grupos de estudio (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7) según se describen en la **Tabla 1**.

Tabla1. Distribución de los grupos de estudio del ensayo

Grupos de estudio	N	4h	48h	72h
G1. Inoculados con suero (convaleciente + FR 01) + virus	3	Hisopado nasal	Hisopado nasal	Lavado nasofaríngeo y pulmón
G2. Inoculados con suero (convaleciente + FR 01A) + virus	3	Hisopado nasal	Hisopado nasal	Lavado nasofaríngeo y pulmón
G3. Inoculados con suero (convaleciente + FR 02) + virus	3	Hisopado nasal	Hisopado nasal	Lavado nasofaríngeo y pulmón
G4. Inoculados con suero (rata + FR 01+FR01A) + virus	3	Hisopado nasal	Hisopado nasal	Lavado nasofaríngeo y pulmón
G5. Inoculados con suero convaleciente + virus	3	Hisopado nasal	Hisopado nasal	Lavado nasofaríngeo y pulmón
G6. Inoculados con suero negativo + virus. Control Positivo	3	Hisopado nasal	Hisopado nasal	Lavado nasofaríngeo y pulmón
G7. Inoculados con suero negativo. Control Negativo	3	Hisopado nasal	Hisopado nasal	Lavado nasofaríngeo y pulmón

Los animales inoculados fueron observados durante 72 h, determinándose el peso corporal, actividad física (evaluación de signos de enfermedad) y se les realizó hisopado faríngeo a las 24 y 48 h, así como eutanasia a las 72 h donde se realizó lavado nasofaríngeo (NSF) y necropsia para estudio molecular, virológico e histopatológico de los pulmones. (**Fig. 1**)

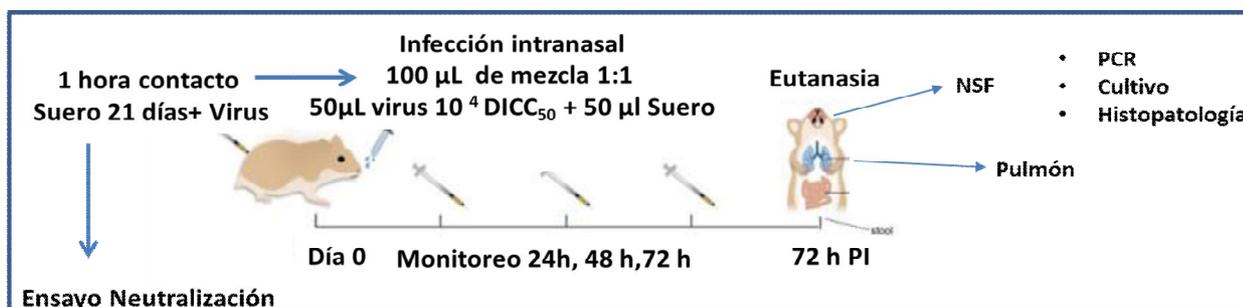


Fig 1: Marcha experimental.

(Leyenda: DICC₅₀: Dosis infectiva media en cultivo celular; NSF: Lavado nasofaríngeo; PI: período post infección)

Las muestras de los hisopados y lavados nasofaríngeos, así como de los pulmones se estudiaron por RT-PCR para determinar presencia de ARN de SARS-CoV-2. La detección del virus SARS-CoV-2 se realizó haciendo uso de 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).⁽⁵⁾ Para la confirmación se utilizaron los cebadores y la sonda disponibles en el estuche comercial Light Mix RdRP COVID-19 (TIB MOLBIOL, Roche), que reconoce el gen de la polimerasa del SARS-CoV-2. Se utilizó la plataforma para PCR Tiempo Real Rotor Gene Q 5 plex (QIAGEN).⁽⁶⁾

La utilidad del ensayo de RT-PCR para estimar la carga viral mediante el valor de Ct (*cycle threshold*) en español ciclo de umbral (número de ciclos necesarios para detectar el ARN viral extraído y amplificado por la prueba de PCR en tiempo real), está bien descrita en la literatura.^(7,8)

Paralelamente se realizó cultivo viral de las muestras mediante la inoculación de células Vero E6 en placas de 24 pozos. Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 7 días. Las células inoculadas se monitorearon diariamente, para detectar cambios o la aparición de efecto citopático (ECP) y demostrar la viabilidad del virus en las muestras.

Para los estudios histopatológicos se realizó necropsia de la cavidad torácica. Se examinaron macroscópicamente los pulmones y se colectaron muestras de los mismos, las cuales fueron lavadas con medio MEM con antibiótico y maceradas. El sobrenadante del tejido macerado se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min y se filtró por filtros de 0,45µ y 0,2µ para los ensayos virológicos y de biología molecular.

Los estudios que conllevaron la manipulación de cultivos virales y manejo de animales infectados con SARS-CoV-2 se condujeron dentro de una instalación de Nivel de Bioseguridad 3.

III. RESULTADOS

Títulos de anticuerpos. En la **Tabla 2** se muestran los títulos de anticuerpos IgG anti RBD de los sueros de hámster de 30 días de convalecencia inmunizados con una dosis de las diferentes biomoléculas en los tiempos 0, 7, 14 y 21 días. En los Hámster convalecientes se observaron títulos altos de anticuerpos anti RBD, mantenidos hasta los 21 días posteriores de aplicadas las inmunizaciones, previo al inicio del ensayo de inhibición de la colonización viral. Resultados similares se observaron en el ensayo de neutralización viral donde se demostró la presencia de altos títulos de anticuerpos funcionales capaces de neutralizar el SARS-CoV-2, en los sueros que se pusieron en contacto con el virus y que posteriormente fueron inoculados en el modelo animal. (**Tabla 3**)

Tabla 2. Respuesta de anticuerpos IgG anti RBD de hámster convalecientes inmunizados con candidatos vacunales FR-01, FR-01A, FR-02

Sueros	Títulos de IgG anti RBD Log (10)				
	0 días	7 días	14 días	21 días	28 días
Conv. + FR-01	3,607	3,130	3,130	3,130	-
Conv. + FR-01A	3,607	3,607	3,130	3,130	-
Conv. + FR-02	3,130	3,130	3,130	3,130	-
Rata +FR-01+FR-01A	-	-	-	-	2,480

(Leyenda: Conv. + FR-01: hámster convaleciente inmunizado con FR-01, Conv. + FR-01A: hámster convaleciente inmunizado con FR-01^a, Conv. + FR-02: hámster convaleciente inmunizado con FR-02, Rata: rata inmunizada con una dosis de FR-01 y una dosis de FR-01^a)

Tabla 3. Títulos de anticuerpos neutralizantes de hámster convalecientes y convalecientes inmunizados

Sueros	Títulos de Anticuerpos Neutralizantes				
	0 días	7 días	14 días	21 días	28 días
Conv + FR-01	-	1:891	1:640	1:640	
Conv + FR-01A	-	1 ≥ 1280	1:891	1:891	
Conv + FR-02	-	1:640	1:891	1:640	
Rata + FR-01 + FR-01A	1:40	-	1:112	-	1:224
Pool suero convaleciente sin refuerzo (30 días post-infección)	1:891	-	-	-	

(Leyenda: Conv. + FR-01: hámster convaleciente inmunizado con FR-01, Conv. + FR-01A: hámster convaleciente inmunizado con FR-01^a, Conv. + FR-02: hámster convaleciente inmunizado con FR-02, Rata: rata inmunizada con una dosis de FR-01 y una dosis de FR-01A)

Signos de enfermedad. Los hámster inoculados con las mezclas de sueros de convalecientes más virus (G5), sueros de convalecientes inmunizados con FR-01 (G1), FR-01A (G2), FR-02 (G3) y suero de rata inmunizada con FR-01 y FR-01A (G4) tuvieron un comportamiento similar a los controles negativos (G7), no mostraron signos de enfermedad en el periodo de observación, ni manifestaron disminuciones significativas del peso corporal, a diferencia de los controles positivos (G6) donde se observaron a las 72 h pérdidas superiores al 10 % del peso corporal inicial. Los grupos G2, G3, G5 y G7 (controles negativos) tuvieron diferencias estadísticamente significativas con relación al G6. (**Fig. 2**). El comportamiento de los animales tratados con suero de rata inmunizada con dos dosis de FR-01 y FR-02, fue similar al de los tratados con suero de convalecientes inmunizados con una dosis de los diferentes candidatos vacunales.

En los Hámster controles positivos se observaron signos de poca actividad física, letargia, postura encorvada y respiración arrítmica después de 48 h de inoculación. Los signos de enfermedad antes descritos y las pérdidas de peso durante el proceso infeccioso coinciden con las observaciones de otros autores en estudios de infectividad con el SARS-CoV-2, sobre todo en Hámster machos. ⁽⁹⁾

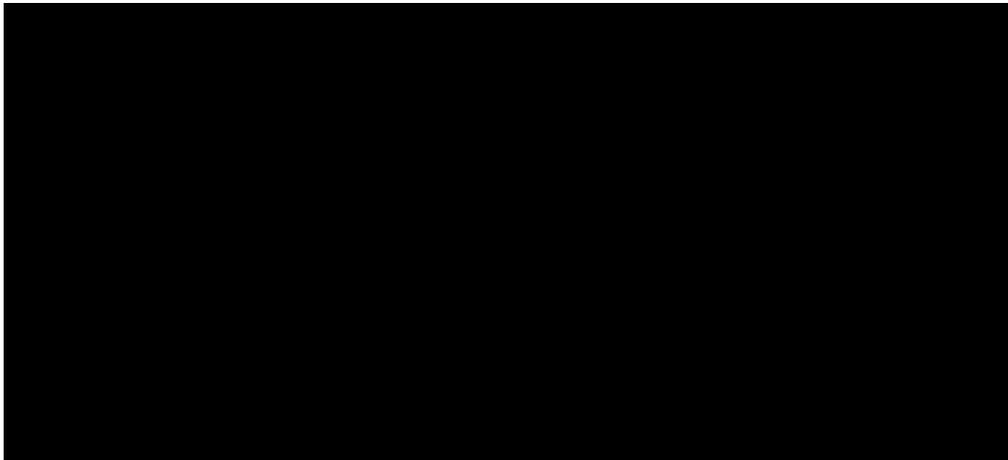


Fig. 2. Comportamiento del peso corporal de los hámster por grupo de estudio. El grupo G6 K+ (controles positivos de infección) presentó las mayores pérdidas de peso corporal a las 72 h post inoculación.

Detección de ARN viral. En las PCR realizadas a partir de los lavados de mucosa nasofaríngea se observó que en los animales inoculados con la mezcla de virus y sueros de convalecientes vacunados, ocurrió inhibición de la replicación viral a nivel de la mucosa nasofaríngea, con valores de Ct con diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo control positivo. Solamente en tres Hámster, correspondientes a los grupos de estudio G1, G4 y G5 amplificó material genómico de SARS-CoV-2, detectable a las 24 h post infección, con valores de Ct altos, indicativos de baja carga viral, en el resto de los animales no se detectó ARN viral. En los controles negativos no hubo amplificación de material genómico del virus, pero para su representación gráfica se les asignó un valor de Ct de 40. (**Fig. 3**)

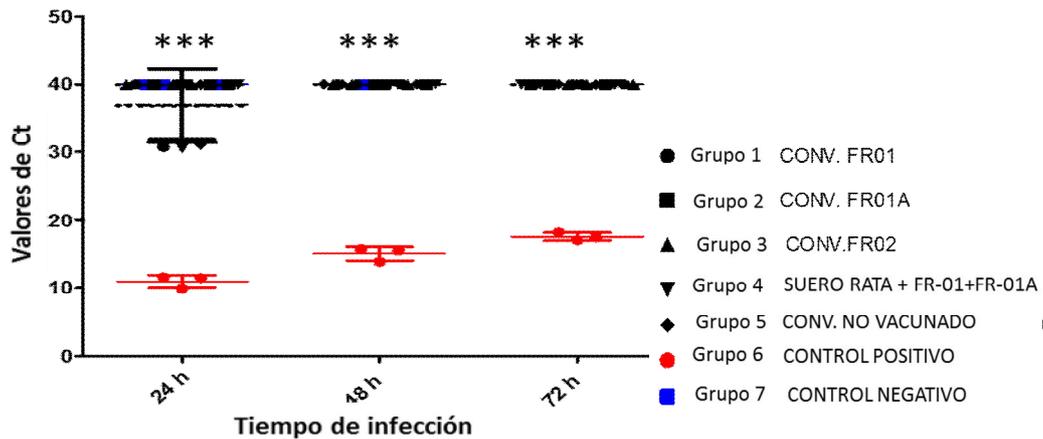


Fig. 3. Resultados de la RT-PCR de muestras de nasofaringe de animales de los diferentes grupos de estudio. Los animales tratados con suero de convalecientes, y sueros de convalecientes vacunados mostraron baja carga viral con diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo control positivo de infección.

Los valores de Ct proporcionan una medida inversa con relación a las cargas virales presentes en las muestras, 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. ⁽⁷⁾

En las PCR realizadas a partir de las muestras de pulmones, se observaron también diferencias estadísticamente significativas en los valores de Ct de los controles negativos y animales inoculados con las mezclas de virus y sueros de convalecientes vacunados, con relación a los controles positivos donde se observaron valores bajos de Ct, indicando elevada carga viral. A las 72 h post infección en los grupos de estudio G1, G2, G3, G4, G5 se apreciaron valores bajos de carga viral en 7 animales, y en 8 no se detectó ARN de SARS-CoV-2 en los pulmones. Los valores de Ct observados en los animales tratados con suero de rata inmunizada con dos dosis de FR-01 y FR-02, fue similar al apreciado en los Hámster tratados con suero de convalecientes inmunizados con una dosis de los diferentes candidatos vacunales, lo que evidencia la inmunogenicidad y protección conferida por dichas biomoléculas. En los controles negativos no hubo amplificación de material genómico del virus, pero para su representación gráfica se les asignó un valor de Ct de 40. (Fig. 4)

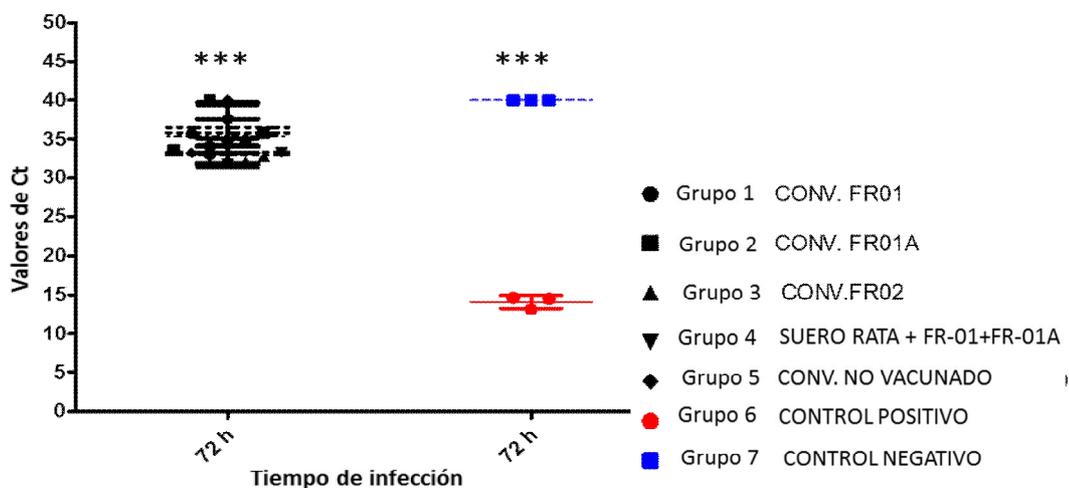


Fig.4. Resultados de la RT-PCR de muestras de pulmones de animales de los diferentes grupos de estudio. Los animales tratados con suero de convalecientes, y sueros de convalecientes vacunados mostraron diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo control positivo de infección, que mantuvo a las 72 h valores bajos de Ct, indicando alta carga viral en el tejido pulmonar.

Cultivo viral e histopatología. No se observó efecto citopático en los cultivos virales de las muestras procedentes de pulmones de los Hámster pertenecientes a los grupos G7 (control negativo) y grupos G1, G2, G3, G4, G5, de animales que recibieron el inóculo viral con suero de animales inmunizados y convalecientes inmunizados con los candidatos vacunales, a diferencia del grupo G6 (controles positivos) donde se demostró daño celular producto de la replicación viral, a partir de los tejidos de pulmones con virus infectivos. Coincidiendo estos resultados con los hallazgos de los estudios de detección de ARN viral por RT-PCR. Los daños histopatológicos se correspondieron con los hallazgos de los estudios moleculares y virológicos. Un hámster del G1, dos del G4 y otro del G5 tuvieron lesiones leves con un bajo

por ciento de área pulmonar afectada, por el contrario, en el G6 (controles positivos) se observó presencia de neumonía intersticial aguda con mayor extensión del daño en los pulmones.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que los candidatos vacunales Soberana 01 (biomoléculas FR01), Soberana Plus (FR01A) y Soberana 02 (FR02), inducen anticuerpos neutralizantes en Hámster convalecientes de la infección por SARS-CoV-2, que inhiben la replicación del virus en mucosa nasofaríngea y evitan el agravamiento del daño pulmonar en el modelo biológico empleado.

REFERENCIAS

1. Aceves MJ, Flores MA. Modelos animales para la evaluación de vacunas contra tuberculosis. Laboratorios de Investigación en Biotecnología Médica. Estudios Preclínicos en Investigación, Desarrollo e Innovación Biotecnológica. CIATEJ 2016. ISBN 978-607-97421-0-2. <http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/590>
2. Warner BM, Safronetz D, Kobinger GP. Syrian Hamsters as a Small Animal Model for Emerging Infectious Diseases: Advances in Immunologic Methods. *Adv Exp Med Biol - Advances in Microbiology*. 2017; 972:87-101. doi: 10.1007/5584_2016_135
3. Imai M, Kiyoko IH, Hatta M, Halfmann PJ, Loeber S, Kawaoka Y, et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *PNAS*; 117 (28) 16587-16595. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>
4. Chak-Yiu Lee A, Zhang AJ, Fuk-Woo Chan J, Li C, Fan Z, Liu F, Chen Y, et al. Oral SARS-CoV-2 Inoculation Establishes Subclinical Respiratory Infection with Virus Shedding in Golden Syrian Hamsters. *Cell Reports Medicine* 2020, 1: 100121.
5. R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße. Insert. RIDA®GENE SARS-CoV-2 (2022-01-28) 17, 64297 Darmstadt, Alemania
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. <https://doi.org/10.1128/JCM.00557-20>.
7. Service, R F. “A call for diagnostic tests to report viral load”. *Science* 2020; 370(6512):22
8. Dai T, Singh S. COVID-19 diagnostic testing and viral load reporting. 23 December 2020. <https://voxeu.org/article/covid-19-diagnostic-testing-and-viral-load-reporting>
9. Rosenke K, Meade-White K, Letko M, Clancy C, Hansen F, Liu Y, et al. Defining hamster as a highly susceptible preclinical model for SARS-CoV-2 infection. *Emerging Microbes and Infections*. 2020 (9)1: 2673-2684.