

MARCADORES FENOTÍPICOS DE ATENUACIÓN EN CEPAS DE VIRUS JUNÍN RECUPERADAS DE INDIVIDUOS VACUNADOS CON LA CEPA JUNÍN CANDID#1

GRACIELA S. GAMBOA¹, ANA MARÍA AMBROSIO¹, ANDREA S. MAIZA¹, MAURICIO MARIANI¹,
GERALDO RODRIGUES GARCIA ARMÔA², MARÍA DEL CARMEN SAAVEDRA¹

¹Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui (INEVH), Argentina, ²Laboratorio de Esquistosomiasis Experimental, Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil

Resumen La Fiebre Hemorrágica Argentina es una enfermedad producida por el virus Junín. Para la prevención de esta enfermedad se obtuvo una vacuna efectiva denominada Candid#1. Durante un ensayo clínico realizado en el INEVH, dos cepas de virus Junín fueron aisladas de sangre periférica de dos voluntarios mediante co-cultivo de células mononucleares. El objetivo de este trabajo fue comparar las características fenotípicas de atenuación de esas dos cepas recuperadas de humanos con las de la vacuna Candid#1 utilizando los indicadores de atenuación desarrollados por Contigiani y Sabbatini en 1977. A tal fin se midieron los índices de letalidad, infección y protección en cobayos y ratones de diferentes edades. Las tres cepas investigadas resultaron letales para ratones recién nacidos pero no para ratones de 10 a 12 días, ratones adultos ni cobayos, aun a la más baja dilución inoculada. Los cobayos inoculados con las cepas recuperadas de humanos y con la cepa Candid#1 no presentaron síntomas de enfermedad y mostraron estar protegidos cuando fueron desafiados con una cepa patógena. Los índices de infección y de protección hallados indican que estas cepas poseen elevada capacidad infectante y protectora en las especies animales aquí estudiadas. Estos resultados demuestran que las cepas de virus Junín aisladas de voluntarios inmunizados con Candid#1 mantienen el mismo fenotipo atenuado de la vacuna Candid#1 después de un pasaje por humanos.

Palabras clave: fiebre hemorrágica Argentina, candid#1, virus Junín, marcadores fenotípicos de atenuación

Abstract *Phenotypic markers of attenuation in Junin virus strains recently isolated from individuals vaccinated with Junin Candid#1 strain.* Argentine hemorrhagic fever is a severe acute disease caused by Junin virus. For prevention of this disease an effective vaccine called Candid#1 has been developed, composed of a live attenuated Junin virus strain. During a clinical trial conducted at *Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas* (INEVH) in 2005, Junin virus was isolated from two vaccinated volunteers by co-culture of peripheral mononuclear blood cells. The aim of this study was to compare the strains isolated from these human volunteers with Candid#1 strain regarding phenotypic characteristics of attenuation according to the indicators developed by Contigiani and Sabbatini in 1977. The three strains were lethal to suckling mice but not to 10-12 days old mice and guinea pigs. Surviving guinea pigs from primary infection were protected when challenged by intra-muscular inoculation with lethal doses of a virulent strain. Infection and protection rates indicate that these strains are highly infective and protective in the hosts studied herein. These results demonstrate that Junin virus strains isolated from volunteers immunized with Candid#1 maintain the same attenuated phenotype of Candid#1 vaccine after one passage in humans.

Key words: Argentine haemorrhagic fever, candid#1, junin virus, attenuated phenotypes markers

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad aguda grave producida por el virus Junin (VJUN)¹⁻³, integrante de la Familia *Arenaviridae*. El tratamiento de la FHA consiste en la transfusión temprana de plasma inmune de convalecientes con dosis estandarizadas de anticuerpos neutralizantes⁴ que reduce la mortalidad al 1-2%.

Desde que se demostró que el VJUN es el agente etiológico de la FHA y la especie de roedor *Calomys*

musculus el principal reservorio natural del virus, se supo que la enfermedad podía ser controlada pero no erradicada y la estrategia propuesta para el control de la FHA ha estado dirigida a la obtención de una vacuna^{5, 6}.

Los intentos para obtener una vacuna contra la FHA se iniciaron en 1959 y siguieron dos líneas principales de investigación: a) vacunas inactivadas⁷ b) vacunas a virus vivos atenuados. Las investigaciones que resultaron más exitosas fueron las que utilizaron virus homólogos vivos atenuados. En este sentido un importante antecedente lo constituyó la vacuna XJ Clon 3, ensayada en más de 600 voluntarios humanos^{5, 8-12}, cuyo desarrollo y aplicación aportó amplia experiencia para el posterior desarrollo

Dirección postal: Dra. Graciela S. Gamboa, Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui, Monteagudo 2510, 2700 Pergamino, Buenos Aires, Argentina

Fax: (54-2477) 433045

e-mail: graciela2113@yahoo.com.ar

de la vacuna a virus vivo atenuado **Candid#1**^{6, 13-15}. La cepa **Candid#1** de VJUN viva atenuada fue obtenida en 1983^{6, 15}. Esta cepa fue derivada de la cepa parental XJ44 mediante clonados por dilución final y *single burst*¹⁶ en células diploides certificadas FRhL-2 (ATCC-CCL 160). La semilla maestra y la de trabajo fueron cosechadas después de dos pasajes adicionales en células FRhL-2.

Candid#1 tiene una historia de pasajes bien definida, incluye un pasaje en cobayo, 44 pasajes en cerebro de ratón recién nacido y 19 pasajes en células FRhL-2¹⁵. Los extensivos ensayos preclínicos y clínicos realizados durante el desarrollo y registro de esta vacuna han demostrado que esta cepa viral es segura, inmunogénica y que protege contra la FHA^{13, 17-22}.

Si bien numerosos trabajos experimentales demuestran relativa estabilidad en la atenuación de la virulencia de la cepa **Candid#1**^{15, 23}, el mantenimiento de esas características luego del pasaje en humanos no ha sido todavía estudiado. Por lo tanto, reviste fundamental interés realizar el estudio de marcadores de atenuación en cepas de VJUN recuperadas de humanos.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) intentar recuperar VJUN por co-cultivo de células mononucleares (CMNs) de sangre periférica de individuos vacunados con **Candid#1**. b) Comparar la cepa **Candid#1** administrada con las cepas recuperadas de individuos vacunados en sus características fenotípicas de atenuación (índices de eficiencia de letalidad, de infección y de protección) en animales de laboratorio.

Materiales y métodos

Cepas de virus Junín: 65604 y 65727 recuperadas por co-cultivo de linfocitos de individuos vacunados con **Candid#1** (semilla de trabajo, 3 pasajes en células Vero C76); vacuna **Candid#1** lote 8; cepa virulenta P 3790 obtenida en cerebro de ratón.

Células Vero C76: se utilizaron para el intento de aislamiento viral por co-cultivo, para realizar las titulaciones de las cepas virales en estudio y para la determinación de anticuerpos neutralizantes (AcNT). La línea Vero C76 (ATCC CCL 81) certificada fue utilizada entre los pasajes 32 a 42.

Animales de laboratorio: se utilizaron ratones albino suizos libres de patógenos específicos, cepa CD1 exocriados, de la colonia del INEVH, originaria de *Charles River Laboratories*, USA, de diferentes edades, ratón recién nacido (rrn), ratón de 10 a 12 días, ratón adulto (rad) y cobayos convencionales, cepa Hartley, exocriados, de la colonia del INEVH, de 250 a 350 g. La calidad de los animales fue certificada en el INEVH mediante controles bacteriológicos, parasitológicos y virológicos realizados regularmente.

Aislamiento viral: se obtuvieron muestras de aproximadamente 10 ml de sangre periférica de 10 voluntarios que concurren al INEVH entre los 9 y 10 días post vacunación²² con síntomas de cefalea, decaimiento y mialgias. Las CMNs fueron separadas mediante la utilización de un gradiente de *Ficoll Hypaque* y co-cultivadas sobre monocapas de células Vero²⁴.

Las semillas maestras (SMs) de las cepas aisladas (65604 y 65727) se obtuvieron por dos pasajes sucesivos en células Vero C76. Para obtener las semillas de trabajo (STs) se reali-

zó un nuevo pasaje a partir de las SMs. Estas se conservaron a -70 °C hasta su utilización.

Las semillas virales se titularon mediante: a) inoculación de rrn, tomando como punto final la muerte y calculando la Dosis Letal 50 (DL₅₀) por el método de Reed y Muench²⁵, y b) método de recuento de UFP en células Vero bajo agar²⁶. Para la titulación en rrn los animales fueron observados diariamente durante 30 días; se calculó la DL₅₀ de cada semilla, descartando los animales muertos durante las primeras 24 horas, considerando la muerte temprana como trauma causado por la inoculación.

El método de neutralización utilizado para detectar y cuantificar AcNT fue desarrollado para sueros humanos, con la técnica de virus constante-suero variable²⁶. El título neutralizante de cada suero se expresó como la inversa de la mayor dilución de suero que inhibió el 80% de UFP contadas en la titulación simultánea de virus.

Las cepas estudiadas fueron identificadas como VJUN mediante su completa neutralización por un suero específico anti-**Candid#1** obtenido en conejo.

Los cálculos de: Dosis Letal 50 (DL₅₀), Dosis Infecciosa 50 (DI₅₀) y Dosis Protectora 50 (DP₅₀) se realizaron por el método de Reed y Muench.

En ratones, la DL₅₀ se calculó tomando como punto final la muerte de los animales. A los 30 días pi se sangró a los animales sobrevivientes y se determinó el título de AcNT. Para calcular la DI₅₀ se incluyeron los muertos y sobrevivientes con AcNT. Cada una de las cepas estudiadas fue titulada simultáneamente en células para obtener el número de UFP/ml. Con estos animales se siguió el esquema de trabajo de la Fig. 1.

Los cobayos utilizados en este proyecto fueron sangrados antes de la inoculación de las cepas de VJUN en estudio, para corroborar ausencia de AcNT anti-VJUN. Se inocularon en grupos de 5 animales por vía intramuscular (im) con diferentes diluciones factor 10 de las cepas en estudio. Se registraron signos de enfermedad y la letalidad para calcular la DL₅₀, durante 30 días, momento en el cual los animales fueron sangrados para determinar el título de AcNT y calcular la DI₅₀. A los 39 días pi se los desafió con la cepa patógena P3790 y se calculó la DP₅₀. Cada una de las cepas estudiadas fue titulada simultáneamente en células Vero para obtener el número de UFP/ml. Se siguió el esquema de trabajo de la Fig. 2.

Se registraron los siguientes signos de enfermedad: disminución de los reflejos, letargia, anorexia, pelo erizado, depilaciones, manifestaciones en piel y mucosas, petequias, signos

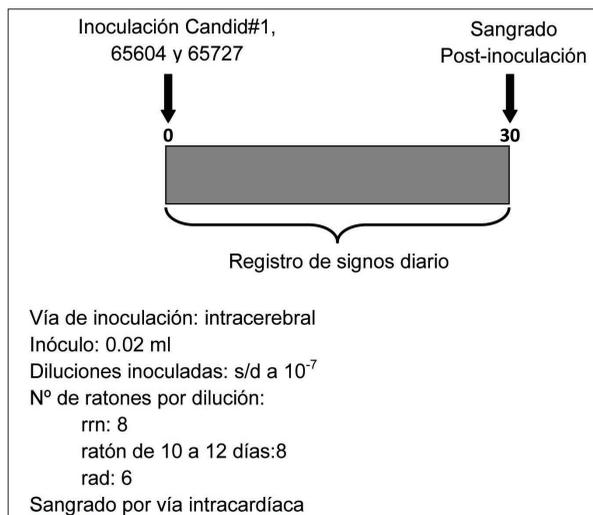


Fig. 1.— Esquema de trabajo en ratones.

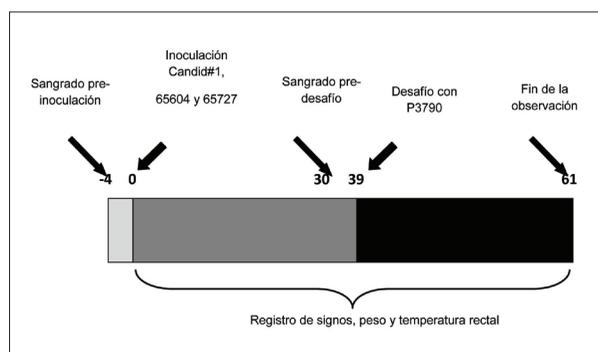


Fig. 2.– Esquema de trabajo en cobayos
Registro de signos diario

Registro de peso y temperatura rectal: 2 veces/semana, las 2 semanas siguientes a la inoculación y al desafío; durante el resto del período de observación 1 vez / semana
Vía de inoculación: intramuscular
Inóculo: 0.5 ml
Diluciones inoculadas: 10^{-3} a 10^{-6}
N° de cobayos por grupo: 5
Sangrado por vía intracardíaca

de dolor como vocalizaciones, arqueado del lomo y/o inmovilidad; signos de deshidratación, ojos hundidos, pliegues persistentes; nerviosos como parálisis o imposibilidad de deglución, temperatura rectal y peso. En todos los casos se acompañó de un grupo de animales sin inocular como control ambiental y otro grupo inoculado con el diluyente del virus, como control de inóculo.

Índice de eficiencia de letalidad (IEL). Se calculó aplicando el logaritmo del cociente entre el título obtenido en cultivos celulares, expresado en UFP, y el título en ratón o cobayo expresado en DL_{50} , ambos para un mismo volumen de inóculo ($IEL = \log UFP/DL_{50}$).

Índice de eficiencia de infección (IEI). Se calculó aplicando el logaritmo del cociente entre el título obtenido en cultivos celulares expresado en UFP y el título en ratón o cobayo expresado en DI_{50} , ambos para un mismo volumen de inóculo ($IEI = \log UFP/DI_{50}$).

Índice de eficiencia de protección (IEP). Se calculó aplicando el logaritmo del cociente entre el título obtenido en cultivos celulares expresado en UFP y el título en cobayo expresado en DP_{50} , ambos para un mismo volumen de inóculo ($IEP = \log UFP/DP_{50}$).

De acuerdo a las fórmulas, podemos decir que a índices mayores, menor es la letalidad, infectividad, protección de la cepa de virus para el huésped inoculado.

Los animales utilizados en estos estudios fueron tratados cumpliendo con las buenas prácticas en el cuidado de animales de experimentación (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences National Research Council, 2011. National Academy Press. Washington, DC*).

Las muestras obtenidas para realizar el co-cultivo de CMNs de sangre periférica han sido tomadas de voluntarios que participaron en el Ensayo Clínico Puente²², cuyo protocolo fue aprobado por dos Comités de Evaluación Ética independientes y monitoreado por un Comité de Seguimiento de Seguridad de la Información (CSSI).

Resultados

Se logró recuperar VJUN en 2/10 voluntarios, estudiados entre los días 9 y 10 post-vacunación. Los títulos de virus

TABLA 1.– Título de las semillas de trabajo de las cepas de VJUN aisladas por co-cultivo y de la vacuna Candid#1 en células Vero (UFP/ml)

| Cepas de VJUN | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 65604 | 65727 | Candid#1 |
| $10^{5.76}$ UFP/ml | $10^{5.40}$ UFP/ml | $10^{4.72}$ UFP/ml |
| $10^{5.68}$ UFP/ml | $10^{5.40}$ UFP/ml | $10^{4.81}$ UFP/ml |
| $10^{5.18}$ UFP/ml | $10^{5.90}$ UFP/ml | $10^{4.17}$ UFP/ml |
| \bar{X} : $10^{5.60}$ UFP/ml | \bar{X} : $10^{5.63}$ UFP/ml | \bar{X} : $10^{4.64}$ UFP/ml |

obtenidos en el sobrenadante cosechado a los 10 días pi fueron $10^{3.84}$ y $10^{4.18}$ UFP/ml para las cepas 65604 y 65727 respectivamente. Los aislamientos fueron identificados como VJUN por neutralización de placas bajo agar enfrentadas con un suero específico anti-Candid#1 obtenido en conejo.

Las ST de ambas cepas tuvieron títulos promedio de $10^{5.60}$ y $10^{5.63}$ UFP/ml respectivamente (Tabla 1). El título promedio de la vacuna Candid#1 se mantuvo en sus valores históricos, $10^{4.64}$ UFP/ml (Tabla 1). Todos los estudios posteriores se realizaron con la ST de cada una de las cepas aisladas.

En ratones de diferentes edades, la letalidad y la infectividad de cada cepa viral fue expresada como Índice de Eficiencia de Letalidad y de Infectividad.

El rrn fue el único que mostró letalidad con las tres cepas estudiadas, siendo necesario 0.0013 UFP de la cepa 65727, 0.052 UFP de la cepa 65604 y 0.18 UFP de Candid#1 para producir 1 DL_{50} . Sin embargo, para ratón de 10 a 12 días y ratón adulto (rad), ninguna de las cepas estudiadas fue letal, aun para la más baja dilución inoculada, resultando en títulos menores a $10^{1.7} DL_{50}$ para 1 ml de inóculo y en valores de $IEL > 2.47$ (Tabla 2).

Las DI_{50} de las cepas estudiadas fueron calculadas teniendo en cuenta los animales muertos y sobrevivientes con AcNT. Los títulos expresados en DI_{50} estuvieron comprendidos entre $10^{3.89}$ y $10^{7.29}$ para 1 ml de inóculo (Tabla 2). El nivel de infectividad de las tres cepas estudiadas, representado por los IEI, estuvo indicado por valores negativos para rrn y ratón de 10 a 12 días (-1.89 a -0.50) (Tabla 2), lo que se tradujo en que solo 0.013 UFP y 0.32 UFP alcanzaron para obtener 1 DI_{50} . Los valores de IEI obtenidos en rad estuvieron comprendidos entre 0.28 y 1.13, lo que reflejó una menor capacidad infectiva de estas cepas en rad, que posee una menor susceptibilidad a la infección por VJUN (Tabla 2).

Los cobayos inoculados con las cepas 65604, 65727 y Candid#1 fueron controlados diariamente durante 30 días. Ninguno presentó signos de enfermedad, mantuvieron la temperatura rectal dentro de los valores normales ($38^{\circ}C$ y $39,5^{\circ}C$) y presentaron un aumento de peso acorde con la curva de crecimiento normal en los primeros 30 días de observación. Luego del desafío con 275 UFP de la cepa patógena P3790, los animales que habían recibido:

TABLA 2.– Índice de Eficiencia de Letalidad (IEL) y de Infección (IEI) en ratón recién nacido (rrn), ratón de 10 a 12 días y en ratón adulto (rad)

| Cepa | Título en UFP/ml | Título en DL50/ml | IEL | Título en DI50/ml | IEI |
|------------------|--------------------|----------------------|--------|--------------------|-------|
| 65604(rrn) | 10 ^{5.76} | 10 ^{7.28} | -1.28 | 10 ^{6.90} | -1.14 |
| 65604(10-12d) | 10 ^{5.68} | < 10 ^{1.70} | > 3.98 | 10 ^{7.08} | -1.40 |
| 65604(rad) | 10 ^{5.18} | < 10 ^{1.70} | > 3.48 | 10 ^{4.82} | 0.36 |
| 65727(rrn) | 10 ^{5.40} | 10 ^{8.28} | -2.88 | 10 ^{7.29} | -1.89 |
| 65727(10-12d) | 10 ^{5.40} | < 10 ^{1.70} | > 3.70 | 10 ^{7.14} | -1.74 |
| 65727(rad) | 10 ^{5.90} | < 10 ^{1.70} | > 4.20 | 10 ^{4.77} | 1.13 |
| Candid#1 (rrn) | 10 ^{4.72} | 10 ^{5.45} | -0.73 | 10 ^{5.26} | -0.54 |
| Candid#1(10-12d) | 10 ^{4.81} | < 10 ^{1.70} | > 3.11 | 10 ^{5.31} | -0.50 |
| Candid#1(rad) | 10 ^{4.17} | < 10 ^{1.70} | > 2.47 | 10 ^{3.89} | 0.28 |

UFP: Unidades formadoras de placa

34.67 y 3.47 UFP de la cepa 65604; 36.31, 3.63 y 0.36 UFP de la cepa 65727 y 18.5 y 1.85 UFP de Candid#1 sobrevivieron con escasa o ninguna manifestación clínica durante el tiempo que fueron observados (Tablas 3, 4 y 5). La aparición de signos de enfermedad y muerte se incrementó al disminuir las dosis inoculadas de VJUN de las 3 cepas en estudio. Todos los cobayos del grupo control presentaron signos de enfermedad, culminando con la muerte (Tablas 3, 4 y 5).

Al analizar el promedio de la temperatura rectal y el peso de los cobayos después del desafío con la cepa patógena se observó que solo los cobayos inoculados con las dosis más bajas (0.035 UFP de la cepa 65604, 0.036 UFP de la cepa 65727 y 0.018 UFP de Candid#1) presentaron aumento de la temperatura rectal y disminución del peso, siguiendo el mismo comportamiento que los cobayos del grupo control.

Los cobayos inoculados con las dosis más altas de las cepas 65604, 65727 y de la vacuna Candid#1 seroconvirtieron a los 30 días pi, mientras que los cobayos inoculados con las dosis más bajas (0.035 UFP de la cepa 65604, 0.036 UFP de la cepa 65727 y 0.018 UFP de Candid#1) no seroconvirtieron y culminaron con la muerte (Tablas 6, 7 y 8).

Al igual que en el modelo ratón, la letalidad en cobayo de las cepas de VJUN recuperadas de vacunados con Candid#1 se expresó como IEL. Como se observa en la Tabla 9, ninguna de las cepas estudiadas fue letal para cobayos de 250 a 350 g, lo que se evidenció con altos valores de IEL (> 0.42).

Los IEI en cobayo se calcularon teniendo en cuenta los sobrevivientes con AcNT ya que no hubo letalidad con ninguna de las dosis inoculadas de las cepas de VJUN en estudio. Los valores de IEI e IEP obtenidos resultaron negativos, demostrando que estas cepas son altamente infectantes y protectoras en cobayo (Tabla 9).

Discusión

En este trabajo se compararon las características fenotípicas de atenuación de la vacuna Candid#1 con dos cepas de VJUN aisladas de voluntarios participantes en el ensayo clínico puente²². Las cepas virales recuperadas, identificadas como VJUN mediante técnicas de neutralización, fueron denominadas 65604 y 65727. Los parámetros comparados fueron los Índices de eficiencia de letalidad, de infección y de protección, que ya habían permitido demostrar que las características de atenuación de la cepa vacunal Candid#1 son estables a través de pasajes *in vitro* e *in vivo*²⁷. No obstante, no se habían estudiado estos parámetros de Candid#1 luego de su pasaje en humanos. Se obtuvieron y compararon todos los índices mencionados de las cepas 65604, 65727 y Candid#1 en ratones de diferentes edades y cobayos de 250 a 300 g.

Las tres cepas de VJUN estudiadas (65604, 65727 y Candid#1) fueron letales para rrn inoculados por vía ic, mientras que para ratón de 10 a 12 días y rad no fueron letales, presentando IEL > 2.47. La eficiencia de infección fue alta para las tres edades de ratón estudiadas, siendo menor para rad (IEI: 0.28-1.13). En el rrn y ratón de 10 a 12 días fueron necesarias solo 0.013-0.32 UFP para provocar 1 DI₅₀, mientras que para ratón adulto se necesitaron 1.90-13.49 UFP para obtener 1 DI₅₀. Estos resultados confirman lo ya demostrado por otros autores²⁸ que observaron una estrecha relación entre la edad del ratón y la susceptibilidad al VJUN, siendo notoriamente sensible al virus durante el período perinatal, adquiriendo resistencia en función de la edad. No se pudieron realizar pruebas para medir la capacidad protectora de las diferentes cepas en ratones albino suizos porque no se dispone de una cepa que provoque el 100% de letalidad en los ratones adultos controles.

TABLA 3.– Signos observados en cobayos inoculados con diferentes dosis de la cepa 65604 luego de ser desafiados con la cepa patógena P3790

| Signos | Dosis inoculadas de la cepa 65604 | | | | Controles |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| | 34.67 UFP* | 3.47 UFP | 0.35 UFP | 0.035 UFP | |
| Depresión del sensorio | 0** | 0 | 4 | 5 | 5 |
| Anorexia | 0 | 0 | 2 | 5 | 5 |
| Manifestaciones del pelaje | 0 | 2 | 4 | 5 | 5 |
| Manifestaciones en piel y mucosa | 0 | 2 | 4 | 0 | 5 |
| Manifestaciones de dolor | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 |
| Diátesis hemorrágica | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Deshidratación | 0 | 2 | 2 | 5 | 5 |
| Parálisis | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| N° de muertos | 0 | 0 | 3 | 5 | 5 |

*UFP: Unidades formadoras de placa; ** n° de cobayos con signos;
n: 5 cobayos por grupo

TABLA 4.– Signos observados en cobayos inoculados con diferentes dosis de la cepa 65727 luego de ser desafiados con la cepa patógena P3790

| Signos | Dosis inoculadas de la cepa 65727 | | | | Controles |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| | 36.31 UFP* | 3.63 UFP | 0.36 UFP | 0.036 UFP | |
| Depresión del sensorio | 0** | 0 | 0 | 5 | 5 |
| Anorexia | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| Manifestaciones del pelaje | 0 | 2 | 1 | 5 | 5 |
| Manifestaciones en piel y mucosa | 0 | 2 | 0 | 5 | 5 |
| Manifestaciones de dolor | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 |
| Diátesis hemorrágica | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Deshidratación | 0 | 2 | 5 | 5 | 5 |
| Parálisis | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| N° de muertos | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 |

*UFP: Unidades formadoras de placa; **Número de cobayos con signos;
n: 5 cobayos por grupo

TABLA 5.– Signos observados en cobayos inoculados con diferentes dosis de la vacuna Candid#1 luego de ser desafiados con la cepa patógena P3790

| Signos | Dosis inoculadas de la vacuna Candid#1 | | | | Controles |
|-------------------------|--|----------|----------|-----------|-----------|
| | 18.50 UFP* | 1.85 UFP | 0.18 UFP | 0.018 UFP | |
| Depresión del sensorio | 0** | 0 | 2 | 4 | 5 |
| Anorexia | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 |
| Manif. del pelaje | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 |
| Manif. en piel y mucosa | 0 | 0 | 2 | 2 | 5 |
| Manif. de dolor | 0 | 0 | 5 | 4 | 5 |
| Diátesis hemorrágica | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Deshidratación | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 |
| Parálisis | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| N° de muertos | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 |

*UFP: Unidades formadoras de placa; **Número de cobayos con signos;
n: 5 cobayos por grupo

Los cobayos inoculados por vía im con las cepas de VJUN estudiadas no presentaron signos de enfermedad durante los 30 días de observación previos al desafío con la cepa patógena P3790, sobreviviendo el 100% de los animales inoculados. Con respecto a los cobayos

inoculados con la cepa 65604 (34.67 y 3.47 UFP), la cepa 65727 (36.31, 3.63 y 0.36 UFP) y Candid#1 (18.5 y 1.85 UFP), el 100% de los animales presentó AcNT previo al desafío con la cepa virulenta P3790 habiendo sido protegidos en su totalidad luego del desafío (0% mortalidad).

TABLA 6.– Respuesta de anticuerpos neutralizantes en cobayos inoculados con diferentes dosis de la cepa 65604

| | Dosis | | | | Control |
|--------|------------|----------|----------|-----------|---------|
| | 34.67 UFP* | 3.47 UFP | 0.35 UFP | 0.035 UFP | |
| 320** | | 10 240 | 10 240 | neg | neg |
| 2 560 | | 320 | neg | neg | neg |
| 10 240 | | 640 | 1 280 | neg | neg |
| 320 | | 10 240 | neg | neg | neg |
| 160 | | 640 | neg | neg | neg |

*UFP: Unidades formadoras de placa; ** Título de Ac NT

Nota: El título corresponde a cada uno de los 5 cobayos inoculados por grupo

TABLA 7.– Respuesta de anticuerpos neutralizantes en cobayos inoculados con diferentes dosis de la cepa 65727

| | Dosis | | | | Control |
|---------|-----------|----------|----------|-----------|---------|
| | 36.1 UFP* | 3.63 UFP | 0.36 UFP | 0.036 UFP | |
| 1 280** | | 2 560 | 40 | neg | neg |
| 5 120 | | 640 | 1 280 | neg | neg |
| 10 240 | | 2 560 | 1 280 | neg | neg |
| 10 240 | | 2 560 | 2 560 | neg | neg |
| 2 560 | | 1 280 | 5 120 | neg | neg |

**UFP: Unidades formadoras de placa; ** Título de Ac NT

Nota: El título corresponde a cada uno de los 5 cobayos inoculados por grupo

TABLA 8.– Respuesta de anticuerpos neutralizantes en cobayos inoculados con diferentes dosis de la cepa Candid#1

| | Dosis | | | | Control |
|---------|-----------|----------|----------|-----------|---------|
| | 18.5 UFP* | 1.85 UFP | 0.18 UFP | 0.018 UFP | |
| 5 120** | | 5 120 | 2 560 | neg | neg |
| 160 | | 5 120 | 20 | neg | neg |
| 5 120 | | 2 560 | neg | neg | neg |
| 5 120 | | 5 120 | neg | neg | neg |
| 5 120 | | 2 560 | neg | neg | neg |

*UFP: Unidades formadoras de placa; ** Título de Ac NT

Nota: El título corresponde a cada uno de los 5 cobayos inoculados por grupo

TABLA 9.– Índice de eficiencia de letalidad, de infección y de protección de las cepas de VJUN aisladas por co-cultivo y de la vacuna Candid#1 inoculadas en cobayos

| Cepa | UFP/ml | DL50/ml | DI50/ml | DP50/ml | IEL | IEI | IEP |
|----------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------|-------|-------|
| 65604 | 10 ^{5.76} | < 10 ^{3.3} | 10 ^{6.13} | 10 ^{6.13} | > 2.46 | -0.37 | -0.37 |
| 65727 | 10 ^{5.40} | < 10 ^{3.3} | 10 ^{6.80} | 10 ^{6.92} | > 2.10 | -1.40 | -1.52 |
| Candid#1 | 10 ^{3.72} | < 10 ^{3.3} | 10 ^{5.13} | 10 ^{5.62} | > 0.42 | -1.41 | -1.90 |

Estos resultados muestran que los AcNT juegan un rol específico contra el VJUN⁴. Sin embargo, es evidente que existen otros mecanismos que intervienen, como la participación de los linfocitos T en la respuesta inmune celular. Esto se puede observar en el grupo de cobayos inoculados con 0.18 UFP de la cepa Candid#1, donde tres animales inoculados sobrevivieron al desafío a pesar de que solo dos presentaron AcNT (Tablas 5 y 8).

Otra evidencia de similitud entre las cepas de VJUN recuperadas de humanos y la vacuna Candid#1 se ve reflejada en los valores de los índices de eficiencia de

letalidad, infección y protección (Tabla 9), demostrándose ausencia de letalidad y un alto poder infeccioso y protector de las tres cepas estudiadas en el cobayo de 250 a 350 g inoculado por vía im.

Los resultados presentados constituyen la primera demostración de que la vacuna Candid#1 mantiene sus características fenotípicas de atenuación luego de un pasaje en humanos. Si bien son datos obtenidos sobre un limitado número de cepas, es importante resaltar la enorme relevancia de los mismos porque Candid#1 puede recuperarse *in vivo* en solo 20% de los intentos de

aislamiento, en contraste con el 98% de recuperación de VJUN a partir de pacientes de FHA.

Por otra parte, las cepas recuperadas mostraron características fenotípicas idénticas a las de la cepa vacunal original, pese a haber sido replicadas en dos pasajes por células Vero, lo que contribuye a desafiar la estabilidad de la atenuación de estas cepas. Estudios moleculares y fenotípicos de un mayor número de cepas vacunales recuperadas luego de su aplicación en humanos deberán agregarse a los datos aquí presentados. Cabe destacar, sin embargo, que el escaso número de trabajos previos de esta índole ratifica el presente estudio como una contribución de importancia.

Agradecimientos: A los médicos del INEVH, a los técnicos de serología, por su colaboración en el trabajo de laboratorio, a los técnicos de cultivos celulares y control de calidad por la producción de líneas celulares certificadas, a los técnicos de bioferio por la provisión de ratones spf y al personal de cómputos por su ayuda en la compaginación del trabajo.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés respecto de este trabajo.

Bibliografía

1. Arribalzaga RA. Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia nefrótica, leucopénica y enantemática. *Día Médico* 1955; 27: 1204-10.
2. Parodi AS, Geenway DJ, Rugiero HR, et al. Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. *Día Médico* 1958; 30: 2300-1.
3. Pirotsky I, Martini P, Zuccarini J, et al. **Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense (endemoepidémica, febril, exantemática y leucopénica).** V: la vacuna específica y la vacunación. *Orientación Médica* 1959; 8: 743-4.
4. Enria DA, Briggiler AM, Fernandez N, Levis S, Maiztegui J. Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. *Lancet* 1984; 2: 255-6.
5. Guerrero LB. Vacunas experimentales contra la fiebre hemorrágica Argentina. *Medicina (B Aires)* 1977; 37: 252-9.
6. Barrera Oro JG, Mc Kee KT Jr. Hacia una vacuna contra la Fiebre Hemorrágica Argentina. *Bol of Sanit Panam* 1992; 112: 296-305.
7. Carballal G, Videla C, Oubiña JR, Frigerio MJ. Antígenos inactivados de virus Junin. *Medicina (B Aires)* 1985; 45: 153-58.
8. Guerrero LB de, Weissenbacher MC, Parodi AS. Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada del virus Junin; I: estudio de una cepa modificada del virus Junin, inmunización de cobayos. *Medicina (B Aires)* 1969; 29: 1-5.
9. Rugiero HA, Astarloa L, González Cambaceres C, Maglio F, Squassi G. Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada de virus Junin: II, inmunización de voluntarios, análisis clínico y de laboratorio. *Medicina (B Aires)* 1969; 29: 81-7.
10. Weissenbacher M, Guerrero LB de, Help G, Parodi AS. Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada de virus Junin. III. Reacciones serológicas en voluntarios. *Medicina (B Aires)* 1969; 29: 88-92.
11. Rugiero HA, Magnoni C, Cintora FA. Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada de virus Junin: análisis de 636 vacunados. *Pren Med Argent* 1974; 61: 231-40.
12. Rugiero HA, Magnoni C, Guerrero LB de, et al. Persistence of antibodies and clinical evaluation in volunteers 7 to 9 years following the vaccination against Argentine hemorrhagic fever. *J Med Virol* 1981; 7: 227-32.
13. Barrera Oro JG, Eddy GA. Characteristics of candidate live attenuated Junin virus vaccine. International Conference on Comparative Virology. Banff, Alberta, Canada. 1982; Abstracts Book N° S 4-10.
14. McKee KT Jr, Barrera Oro JG, Kuehne AI, Spisso JA, Mahlandt BG. Candid N° 1 Argentine hemorrhagic fever vaccine protects against lethal Junin virus challenge in Rhesus macaques. *Intervirology* 1992; 34: 154-63.
15. Enria DA, Barrera Oro JG. Junin virus vaccines. En: MBO Oldstone – Springer – Verlag (eds). *Arenaviruses II. Current Topics in Microbiology and Immunology* 2002; 263: 239-64.
16. Walen, KH. Demonstration of inapparent heterogeneity in a population of an animal virus by single-burst analyses. *Virology* 1963; 20: 230-4.
17. MacDonald C, McKee K, Peters C, et al. Initial clinical assessment of humans inoculated with a live-attenuated Junin virus vaccine. Edmonton, Canada 1987; Programs and abstracts of the VII International Congress of Virology. R3.27.
18. Maiztegui J, Feinsod F, Briggiler A, et al. Inoculación de los primeros voluntarios argentinos con la cepa atenuada Candid 1 de virus Junin. XXXII Reunión Conjunta de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y de la Sociedad Argentina de Inmunología. *Medicina (B Aires)* 1987; 47: 565.
19. Maiztegui J, Levis S, Enria D, et al. Inocuidad e inmunogenicidad en seres humanos de la cepa Candid 1 de virus Junin. *Medicina (B Aires)* 1988; 48: 660.
20. Maiztegui JI, McKee KT Jr, Barrera Oro JG, et al. Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 1998; 177: 277-83.
21. Ambrosio AM, Riera LM, Saavedra MC, Sottosanti MJ. Ensayo preclínico de la vacuna Candid#1 (fiebre hemorrágica argentina) producida en Argentina. *Medicina (B Aires)* 2005; 65: 329-32.
22. Enria DA, Ambrosio AM, Briggiler AM, Feuillade MR, Crivelli E, y Grupo de Estudio de la vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina. Vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina Candid#1 producida en la Argentina. Inmunogenicidad y seguridad. *Medicina (B Aires)* 2010; 70: 215-22.
23. Contigiani M, Medeot S, Diaz G. Heterogeneity and stability characteristics of Candid 1 attenuated strain of Junin virus. *Acta virol* 1993; 37: 41-6.
24. Ambrosio AM, Enria DA, Maiztegui JI. Junin virus isolation from lympho-mononuclear cells of patients with Argentine Hemorrhagic Fever. *Intervirology* 1986; 25: 97-102.
25. Reed LJ, Muench HA. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-7.
25. Webb P, Johnson K, Mackenzie R. The measurement of specific antibodies in Bolivian hemorrhagic fever by neutralization of virus plaques. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 130: 1013-9.
26. McKee KT Jr, Barrera Oro JG, Kuehne AI, Spisso JA, Mahlandt B. Safety and immunogenicity of a live-attenuated Junin (argentine hemorrhagic fever) vaccine in rhesus macaques. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 403-11.
27. Contigiani MS, Sabattini MS. Virulencia diferencial de cepas de virus Junin por marcadores biológicos en ratones y cobayos. *Medicina (B Aires)* 1977; 37 (Supl 3): 244-51.