

Preparación y evaluación de conjugados de polisacárido Vi de *Salmonella typhi* con toxoide tetánico

Osmir Cabrera, Maribel Cuello, Carmen R. Soto, Oliver Pérez, Carlos M. Taboada, Mildrey Fariñas, Gustavo Sierra.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: ocabrera@finlay.edu.cu

El polisacárido Vi de *Salmonella typhi* es un antígeno T-independiente y ha demostrado ser protector en adultos jóvenes. En ensayos clínicos controlados, realizados en áreas con alta incidencia de fiebre tifoidea, su eficacia protectora ha sido aproximadamente del 70%. Sin embargo, para aumentar la respuesta de anticuerpos y conferir propiedades T-dependientes al polisacárido en poblaciones de alto riesgo, se han utilizado diferentes métodos para la síntesis de conjugados de polisacárido Vi-proteína. En este estudio fue evaluada la inmunogenicidad generada en ratones por un conjugado polisacárido Vi-proteína obtenido en nuestro laboratorio. El polisacárido Vi purificado fue unido al toxoide tetánico (TT) como proteína portadora por medio de la reacción con carbodiimida. El conjugado resultante fue más inmunogénico que el polisacárido Vi solo. En contraste con las propiedades T-independiente del polisacárido Vi, el conjugado indujo respuesta secundaria y un incremento en la duración de los anticuerpos IgG anti Vi en los ratones. El suero de los animales inoculados con el conjugado mostró altos títulos de anticuerpos IgG anti-TT, similar al TT nativo.

Palabras claves: *Salmonella typhi*, polisacárido Vi, conjugados, inmunogenicidad.

Introducción

La fiebre tifoidea es una causa importante de morbilidad y mortalidad en muchos partes del mundo. Con vistas al incremento de la resistencia de *Salmonella typhi* contra los antibióticos y el alto costo asociado con la mejora de las condiciones de higienización, un programa de vacunación reportaría grandes beneficios en los sistemas de salud de estos países (1).

Mucho han progresado las vacunas en desarrollo contra las infecciones entéricas más importantes. En la actualidad la inmunoprofilaxis contra la fiebre tifoidea está basada en la disponibilidad de tres tipos de vacunas: Una vacuna antitifoídica de células enteras inactivada con fenol y calor (2) (esta es la vacuna que se producía anteriormente en nuestro país). Otra es la vacuna atenuada de *S. typhi* (Ty21a) administrada oralmente y la otra vacuna es la que utiliza al polisacárido capsular solo (1, 2, 3).

En el mundo existen en estos momentos varias tendencias en la búsqueda de nuevas variantes de vacunas como son: vacunas compuestas por cepas de *S. typhi* atenuadas y vacunas conjugadas de polisacárido Vi con una proteína portadora (1, 4, 5), sobre estas últimas podemos encontrar reportes de un ensayo clínico realizado en Vietnam, donde se evaluó la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de una vacuna conjugada de polisacárido Vi, unido

covalentemente a la Exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando ser segura, inmunogénica y con más del 90% de eficacia en niños de 2 a 5 años de edad (4, 6).

También se encuentran trabajos que reportan la utilización del polisacárido Vi en vacunas combinadas (7, 8). Por ejemplo, se realizó un estudio multicéntrico donde se evaluó la consistencia de tres lotes de una vacuna combinada de hepatitis A y polisacárido Vi, donde se obtuvo como resultado que el 95% de las personas en estudio mostraron anticuerpos anti Vi y más del 86% mostraron anticuerpos antihepatitis A (7); otros de los estudios de vacunas combinadas utiliza al polisacárido Vi junto con cepas de *Vibrio cholera* CVD 103-HgR, la cual mostró buenos resultados (8).

Una de las líneas de trabajo de nuestro Instituto a partir del año 1995 fue encaminado a desarrollar en primera instancia una vacuna altamente purificada, menos reactogénica y más eficaz contra *S. typhi*, a partir de antígenos polisacarídicos Vi purificados.

Actualmente se está trabajando en un proyecto encaminado a la obtención de vacunas conjugadas, donde uno de los componentes es este polisacárido obtenido en nuestro Instituto; por lo que nos propusimos en este trabajo la obtención de conjugados a partir del polisacárido Vi con TT y la evaluación de los mismos en animales.

Materiales y Métodos

Antígenos: El polisacárido Vi de *S. typhi* (poli Vi) que utilizamos fue procedente de una cepa vacunal de *S. typhi*, producido en la planta no. III, y el Toxoide Tetánico (TT) fue producido en la planta no. II, ambos obtenidos con buenas prácticas de producción en el Instituto Finlay, La Habana, Cuba.

Métodos analíticos: Se realizó la determinación de polisacáridos por medio de la determinación de grupos O-Acetililos por el método de Hestrin (9) y la determinación de proteínas por el método de Lowry.

Obtención de los conjugados: Para activar el polisacárido, se le adicionó 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Carbodiimida (EDAC, Sigma E7750) 0,1 M a una solución de 5 mg/mL del mismo y se dejó en agitación por 20 min, luego se le adicionó una solución de la dihidrazida del ácido Adípico (ADH) 0.33 M y se dejó en agitación 2 h. Posteriormente se puso a reaccionar 1 mg/mL de TT con EDAC (0,1 M) durante 20 min; pasado este tiempo se le adicionó el polisacárido-ADH anteriormente obtenido y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 3 h. Se dializó contra PBS pH 7,2 toda la noche a 4 °C y al día siguiente el dializado se aplicó en una columna XK-26 con Sepharosa CL-4B, de la que se recogió el primer pico eluido a 280 nm. A esta fracción se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry y el contenido de grupos O-acetililos por el método de Hestrin (9). Los conjugados resultantes fueron almacenados a 4 °C con la adición de 0,02% de timerosal.

Inmunización: Se utilizaron cinco grupos de 8 ratones cada uno, de la línea Balb/c entre 18 y 22 g de peso. Cada grupo fue inmunizado con el conjugado por vía intraperitoneal con 2 dosis de 10 µg (cada uno) de polisacárido Vi a los 0 y 28 días. Como controles se emplearon el polisacárido Vi nativo, el TT y PBS. Los sueros fueron obtenidos previo a cada inoculación y a los 35 y 42 días. Los mismos fueron colectados por separados y almacenados a -20 °C hasta su uso.

Determinación de anticuerpos IgG anti-Vi y anti-TT: Se determinó la inmunogenicidad de los conjugados mediante la técnica ELISA, para lo cual se utilizaron placas de acetato de polivinilo (Costar 2595), como antígenos de recubrimiento se utilizó el polisacárido Vi de *S. typhi* de partida, el cual se fija después de un tratamiento previo con Poly L-lisina (3 µg/mL) (Sigma P1399) y el TT de partida en una disolución amortiguadora de carbonato-hidrogenocarbonato pH: 9,6. Las muestras se diluyen 1:100 en PBS / Tween 20. Se utilizó como segundo anticuerpo, un conjugado anti IgG de ratón unido a peroxidasa (Sigma 3742), como sustrato O-fenilendiamina (Merck 7243) y la absorbancia se midió en un equipo Titertek Multiskan a una densidad óptica (DO) de 492 nm.

Tratamiento estadístico: Para el análisis estadístico de los resultados fue utilizado un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significación del 95% para normalizar su distribución. En caso de encontrar diferencias, se usaron las pruebas de comparaciones múltiples de LSD (menor diferencia significativa). Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS (Versión 2.1) instalado en una PC, así como también se utilizó el programa Microsoft Excel para la determinación de las medias y desviación estándar de los valores obtenidos en el ELISA.

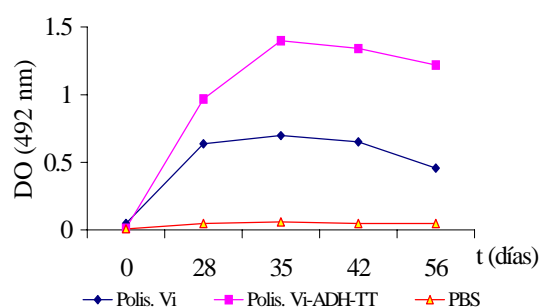
Resultados y Discusión

Obtención de los conjugados: Después de obtenido el conjugado, pasamos a realizarle los controles al mismo, para lo cual, en primer lugar, determinamos la concentración de polisacárido en el conjugado que resultó ser de 1,046 mg/mL y una concentración de proteínas igual a 1,322 mg/mL. Con estos datos obtuvimos que la relación másica (TT/poli Vi) del conjugado era igual a 1,2/1.

Ensayos de inmunodifusión mostraron para los conjugados una línea de precipitación similar a el polisacárido nativo, solo o como un componente de los conjugados (datos no mostrados).

Determinación de anticuerpos IgG anti-polisacárido Vi: Conociendo que la conjugación permite que los antígenos TI se conviertan en TD y que la respuesta de estos últimos está caracterizada por la inducción de anticuerpos del tipo IgG, la aparición de una respuesta secundaria y la permanencia de esta respuesta en el tiempo, se realizó la determinación de este isotipo de anticuerpos en los sueros de los animales (Figura 1).

Figura 1. Determinación de la respuesta de anticuerpos IgG anti-polisacárido Vi en los sueros de ratones Balb/c inmunizados con dos dosis (días: 0 y 28) de polisacárido Vi nativo, PBS y con un conjugado obtenido a partir del polisacárido Vi con la dihidrazida del ácido adipico (ADH) como brazo espaciador y el TT como proteína transportadora.



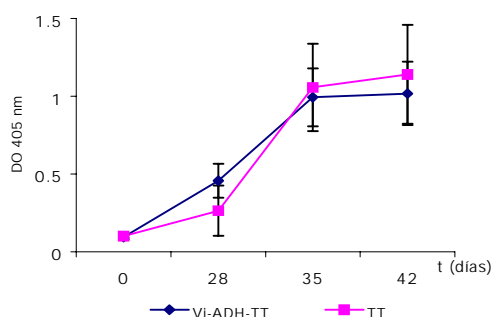
En los resultados que se muestran en la Figura 1, se observó que a partir de la primera dosis se obtuvo una respuesta de IgG anti poli Vi significativamente superior ($P < 0,05$) en el grupo de animales inmunizados con el conjugado, respecto a los grupos inmunizados con el poli Vi nativo y el PBS. Los

títulos de anticuerpos se incrementaron a partir de los 28 días al administrárseles la segunda dosis a los animales, hasta alcanzar el máximo valor de absorbancia en el tiempo 35, para el grupo inmunizado con el conjugado, donde se mostró la aparición de una respuesta secundaria, no encontrándose este efecto en el grupo inmunizado con el polisacárido Vi nativo. También podemos observar que en el tiempo 56 (28 días después de la 2^{da} dosis) se encuentran valores de absorbancia superiores para el conjugado respecto al poli Vi nativo, lo cual nos da una idea de que la respuesta de anticuerpos IgG obtenida con el conjugado es de más larga duración que la obtenida con el polisacárido Vi sin conjuguar. Estos resultados corroboran lo planteado en la literatura de que con el proceso de conjugación empleado para la obtención de vacunas se logra cambiar la TD del polisacárido utilizado y coincide con lo reportado por otros autores (10) para el caso de conjugados obtenidos con polisacáridos capsulares proveniente de otras bacterias.

También para el caso particular del poli Vi, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados en la literatura por otros autores (4,5), que demuestran que con la conjugación de este a una proteína portadora se logra un aumento en la eficacia de las vacunas contra *S. typhi*, así como, se observa un cambio hacia la TD del polisacárido.

Determinación de anticuerpos IgG anti-TT: Con el objetivo de conocer si la proteína portadora sufre afectaciones en sus propiedades inmunogénicas, después del proceso de conjugación, procedimos a realizar la determinación de anticuerpos IgG anti-TT presentes en los sueros de los animales inmunizados con el conjugado y con TT. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Figura 2. Determinación de la respuesta de IgG anti-TT en los sueros de ratones Balb/c inmunizados con dos dosis (días: 0 y 28) de TT y con un conjugado obtenido a partir del polisacárido Vi con la dihidrazida del ácido adípico (ADH) como brazo espaciador y el TT como proteína transportadora.



Al realizar la determinación de IgG anti-TT (Figura 2) se observó que como resultado de la primera inoculación, se obtuvo una respuesta de anticuerpos IgG para ambas muestras (conjugado y TT). Después de la segunda dosis se pudo apreciar la aparición de

una elevada respuesta de anticuerpos en las dos muestras estudiadas, no encontrándose diferencias significativas entre los valores de Abs, obtenidos en ambos casos. Estos resultados indican que el proceso de conjugación empleado no afecta las propiedades inmunogénicas de la proteína portadora y por ello la conjugación incrementa la respuesta contra el poli Vi.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran un cambio en la TD del polisacárido una vez conjugado, ya que se observó en animales un efecto secundario en la respuesta de anticuerpos IgG anti-Vi frente al conjugado y mm, gfb jkno frente al poli Vi nativo. También se observó para el caso del conjugado que la respuesta de IgG anti-Vi permanecía superior a la respuesta obtenida para el polisacárido Vi nativo en todas las evaluaciones después de la 1ra dosis.

Por otra parte, se observó que el procedimiento de conjugación no afectó la respuesta de IgG anti-TT característica de la proteína portadora.

Referencias

1. Cordero-Yap L, Rivera RG, Dispo AP, Mallabo J. Evaluation of a new Vi polysaccharide typhoid vaccine in children aged 2-5 years. *Biodrugs*. 2001; 15: (suppl. 1):27-27
2. Engels EA, Lau J. Vaccines for preventing typhoid fever. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2):CD001261.
3. Keddy KH, Klugman KP, Hansford CF, Blondeau C, Bouveret le Cam NN. Persistence of antibodies to the *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine in South African school children ten years after immunization. *Vaccine*. 1999; 17(2): 110-3.
4. Lin FY, Ho VA, Khiem HB, Trach DD, Bay PV, Than TC, Kossaczka Z, Bryla DA, Shiloach J, Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. The efficacy of a *Salmonella typhi* Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. *J. Med.* 2001; 344(17):1263-9.
5. Singh M, Ganguly NK, Kumar L, Vohra H. Protective efficacy and immunogenicity of Vi-porin conjugate against *Salmonella typhi*. *Microbiol. Immunol.* 1999; 43(6):535-42.
6. Kossaczka Z, Lin FY, Ho VA, Thuy NT, Van Bay P, Thanh TC, Khien HB, Trach DD, Karpas A, Hunt S, Bryla DA, Schneerson R, Robbins JB, Szu SC. Safety and immunogenicity of Vi conjugate vaccines for typhoid fever in adults, teenagers, and 2- to 4 year old children in Vietnam. *Infect Immun.* 1999; 67(11):5806-10.

7. Beran J, Beutels M, Levie K, Van Damme P, Dieussaert I, Gillet M, Van Hoecke C, Tornieporth N. A single dose, combined vaccine against typhoid fever and hepatitis A: consistency, immunogenicity and reactogenicity. *J. Travel Med.* 2000; 7(5):246-52.
8. Foster RH, Noble S. Bivalent cholera and typhoid vaccine. *Drugs.* 1999; 58 (1):91-6.
9. Hestrin S. The reaction of acetyl choline and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamina and its analytic application. *J. Biol Chem.* 1949; 180:249.
10. Pawlowski A, Kallenius G, Svenson SB. A new method of non cross-linking conjugation of polysaccharide to proteins via thioether bonds for the preparation of saccaride-protein conjugate vaccines. *Vaccine.* 1999; 17:1474.

Preparation and evaluation of *Salmonella typhi* Vi polysaccharide-tetanus toxoid conjugates

Abstract

Salmonella typhi Vi polysaccharide is a T-independent antigen that has proven to be protective in young adults. In controlled clinical trials in areas with high rates of typhoid fever, the protective efficacy of the Vi was approximately 70%. However, in high-risk populations, different methods have been used, to synthesize Vi polysaccharide-protein conjugates in order to enhance the antibody response and to confer T-dependent properties to the polysaccharide. In this study a conjugate, Vi polysaccharide -protein, was obtained and its immunogenicity was evaluated in mice. Purified Vi polysaccharide was linked to a carrier protein (tetanus toxoid (TT), via a carbodiimide-mediated reaction. The resultant conjugate was more immunogenic in mice than Vi alone. In contrast to the T-independent properties of Vi, the conjugates of this polysaccharide with TT induced secondary responses and an increase in the duration of IgG anti Vi antibodies, in mice. Serum of animals inoculated with the conjugate showed high IgG anti-TT antibody titers, similar to native TT.

Key words: *Salmonella typhi*, polysaccharide Vi, conjugates, immunogenicity.