

Estudio de inmunogenicidad de la vacuna antitifoídica cubana de polisacárido Vi vax-TyVi[®] en ratones

Juan Carlos Ramírez, Brenda Serrano, Marianelis Lara, Mildrey Fariñas, Mayelín Mirabal, Sergio Sifontes, Isabel García, Pablo González, Yulieé López, Adina García, Isis Niuris Mesa.

Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P. 11600. Ciudad de La Habana, Cuba. jcramirez@finlay.edu.cu

Salmonella enterica serovar Typhi es un microorganismo que provoca más de 16 millones de casos de fiebre tifoidea con aproximadamente 600 000 muertes al año en todo el mundo. Dentro de las vacunas antitifoídicas la de polisacárido capsular Vi ha encontrado, gracias a sus incuestionables ventajas, una gran aceptación entre productores y consumidores. El presente trabajo aborda el estudio de inmunogenicidad de la vacuna antitifoídica cubana de polisacárido Vi vax-TyVi[®] en ratones. El estudio estuvo conformado por un grupo control no inoculado y un segundo grupo que recibió 0,05 mL de la vacuna por vía intramuscular. Se tomaron muestras de sangre a los -3, 7, 14, 21, 28, 42, 56 y 84 días. La actividad de anticuerpos IgG antipolisacárido Vi de los sueros individuales fue determinada por ELISA. Los datos fueron analizados por grupo y por sexo y se calculó el porcentaje de seroconversión, considerándose respondedor aquel animal que al menos aumentara en cuatro veces su título inicial. La respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna mostró un aumento notable de los títulos de IgG antipolisacárido Vi en el grupo vacunado (100% de seroconversión), mientras que el grupo control no incrementó sus niveles mínimos iniciales (0% de respondedores). Aunque más dispersa, la respuesta de anticuerpos antiVi fue significativamente mayor en las hembras que en los machos.

Palabras clave: Fiebre tifoidea, vacunas, vax-TyVi, inmunogenicidad, preclínica

Introducción

La fiebre tifoidea es una enfermedad distribuida mundialmente con una incidencia anual aproximadamente de 16 millones de casos. Esta enfermedad, mucho más frecuente en países subdesarrollados, presenta numerosas manifestaciones clínicas y subclínicas y es responsable de más de 600 000 muertes al año en todo el mundo (1, 2).

El control de la fiebre tifoidea requiere de la descontaminación de las aguas, un efectivo manejo de los desechos, así como el diagnóstico y tratamiento rápido de pacientes y portadores, lo cual no es posible en países donde la enfermedad es endémica y generalizada (3). La Organización Mundial de la Salud recomienda la inmunización de los niños en edad escolar y adultos jóvenes en aquellas áreas donde la fiebre tifoidea es un problema de salud pública y en particular donde sean prevalentes las cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhi resistentes a los antibióticos (4-6).

Dentro de las vacunas modernas contra la fiebre tifoidea se encuentran las orales a partir de cepas vivas atenuadas (7) y la parenteral químicamente definida de polisacárido capsular Vi de *S. Typhi* (8, 9). Esta última ha demostrado una seguridad, inmunogenicidad y eficacia en estudios preclínicos y clínicos que, junto con las incuestionables ventajas que presenta, han hecho de esta vacuna una de las principales alternativas para el control y erradicación de la fiebre tifoidea a escala mundial (10-14).

En Cuba durante varios años se estuvo aplicando en el Programa Nacional de Inmunizaciones una vacuna de células enteras inactivadas que resultó poco inmunogénica y altamente reactogénica (2). Esto, unido al elevado costo de la vacuna polisacáridica disponible en el mercado trajo como consecuencia que el Instituto

Finlay se diera a la tarea de desarrollar una vacuna de polisacárido Vi contra la fiebre tifoidea.

El propósito de este trabajo es la evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna antitifoídica cubana de polisacárido Vi, vax-TyVi[®], en ratones.

Materiales y Métodos

Diseño experimental del estudio

Fueron usados ratones Balb/c de ambos sexos, con un peso corporal de 18-20 g al inicio del experimento, proporcionados por el Centro Nacional de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los mismos fueron separados en dos grupos, cada uno con 20 ratones, 10 de cada sexo. El primero no fue inoculado porque se consideró como grupo control, mientras que el segundo recibió una dosis de 0,05 mL por vía intramuscular del Lote 4001 de vacuna de polisacárido Vi (vax-TyVi), obtenido en la Planta de Producción del Instituto Finlay bajo condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación.

Las muestras de sangre fueron colectadas a través del plexo retroorbital los días -3, 7, 14, 21, 28, 42, 56 y 84. Los sueros fueron separados por centrifugación y almacenados a -20 °C para la titulación de sus anticuerpos IgG antipolisacárido Vi.

ELISA para la cuantificación de IgG antipolisacárido Vi

Se sensibilizaron placas ELISA (NUNC PolySorp, Cat. No. 475094) con 100 µL por pocillo de poli-L-Lisina a 22 µg/mL en agua destilada. La placa fue incubada durante 1 h en cámara húmeda de 20-25 °C; transcurrido este tiempo fue lavada cuatro veces con 300 µL por pocillo de solución amortiguadora de fosfatos (SAF) 0,15 M pH 7,4. Posteriormente se añadió 100 µL por pocillo de

polisacárido Vi a 4 µg/mL en SAF y se incubó en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C. Los polisacáridos no adsorbidos fueron eliminados al lavar la placa con Tween 20 al 0,05% en agua destilada.

Se adicionó 100 µL por pocillo y por duplicado de cada dilución de la curva, las muestras y los controles del ensayo. La placa fue incubada a 37 °C durante 1 h en cámara húmeda, y luego lavada como ya fue indicado. Se adicionaron 100 µL por pocillo de conjugado anti-IgG de ratón/fosfatasa alcalina 1/10000; nuevamente se incubó la placa a 37 °C durante 1 h en cámara húmeda y se lavó. Como diluyente de la curva, las muestras, los controles y el conjugado se utilizó SAF con Tween 20 al 0,05% y leche descremada al 3%. Fueron añadidos 100 µL por pocillo de p-nitrofenilfosfato de sodio a 1 mg/mL en solución de Dietanolamina pH 9,8 y la placa fue incubada durante 30 min en la oscuridad de 20-25 °C. La reacción se detuvo con 50 µL por pocillo de NaOH 2 N. Las absorbancias fueron leídas en un lector de placas Labsystems Multiskan a 405 nm.

La concentración de anticuerpos de los sueros fue determinada transformando los valores de absorbancias de las muestras a unidades arbitrarias de IgG antipolisacárido Vi (UIgG/mL), utilizando la función logistic-log de cuatro parámetros para construir la curva de referencia a partir de las diluciones del estándar antipolisacárido Vi de actividad conocida empleado en el propio sistema. El cálculo se efectuó con el programa ELISA desarrollado por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta (15).

Procesamiento estadístico de los datos

Se aplicó el paquete estadístico SPSS, versión 10.0 para el análisis de los resultados. Los títulos de IgG anti-Vi fueron analizados por grupo y por sexo mediante la comparación de sus medias geométricas y desviaciones estándar, previa transformación logarítmica de los

datos; además se calcularon los intervalos de confianza al 95% para la media geométrica.

Se aplicó el Modified Levene Equal Variance Test para determinar la homogeneidad de varianzas entre los grupos estudiados. Se realizó un análisis de varianza con 2 pruebas de comparaciones múltiples de medias. Para todas las comparaciones se usó un nivel de significación (α) del 5%.

Se calculó el porcentaje de seroconversión de cada grupo para ambos sexos, considerándose respondedor aquel animal que al menos cuadruplicase su título inicial (14). Se usó la prueba Chi-cuadrado para hacer comparaciones entre grupos.

Resultados y Discusión

Estudios dirigidos a la determinación de la seguridad y eficacia de un nuevo y potencial producto médico antes de su primera administración a humanos, antes de realizar pruebas terapéuticas en poblaciones extensas, y por último, antes de poner el producto en el mercado, constituyen una necesidad científica y ética. En la determinación de la inmunogenicidad de un preparado vacunal la respuesta de anticuerpos producida por el antígeno en el tiempo, constituye una demostración indirecta fehaciente de la potencialidad del producto para proteger contra la invasión y/o colonización del agente infeccioso (16).

El diseño experimental del estudio que aborda el presente trabajo, tuvo en cuenta la ruta, dosis y esquema propuestos para la inmunización en humanos, así como la presencia de ambos sexos y la comparación del grupo vacunado con un grupo control no inoculado. La Figura 1 muestra la cinética de anticuerpos IgG antipolisacárido Vi obtenida para ambos grupos de tratamiento.

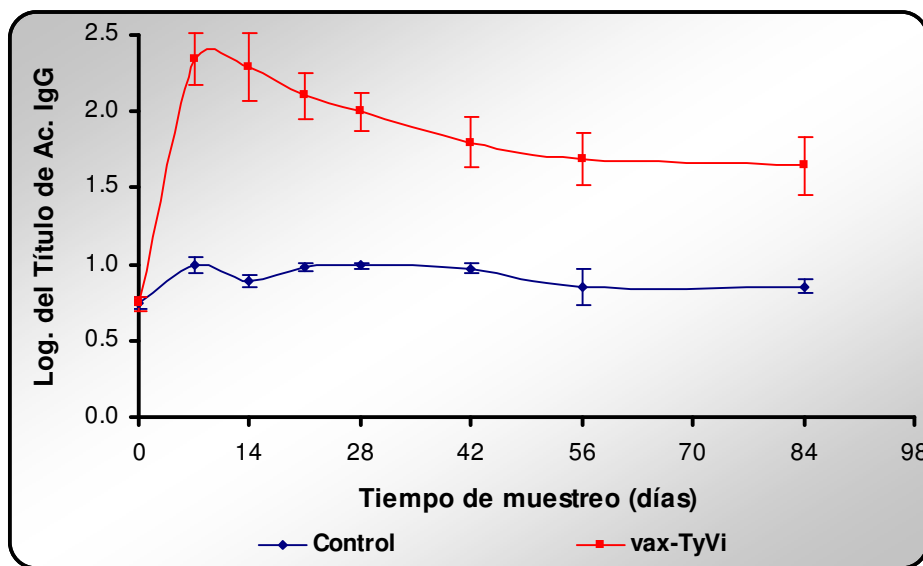


Figura 1. Cinética de la respuesta de anticuerpos IgG antipolisacárido Vi.

La respuesta inmune a la vacuna estuvo caracterizada por un rápido incremento de los títulos de anticuerpos IgG antipolisacárido Vi, los cuales alcanzaron su máximo el séptimo día posterior a la vacunación, disminuyendo paulatinamente a partir de ese punto hasta la culminación del estudio el día 84. El grupo control no varió de forma significativa sus títulos mínimos iniciales.

El análisis estadístico de estos resultados no detectó la existencia de diferencias significativas entre los títulos medios geométricos iniciales para ambos grupos. Para el resto de los tiempos analizados durante el estudio sí se encontraron diferencias significativas entre los títulos de IgG antipolisacárido Vi del control no inoculado y el grupo inmunizado con vax-TyVi ($p < 0,05$).

Como puede apreciarse en el gráfico, esta vacuna polisacárida no conjugada que por definición desencadena una respuesta inmune independiente de células T, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos IgG, inmunoglobulina característica de una respuesta inmune secundaria, consistente hasta tres meses posterior a la inoculación (17). Reportes de estudios de campo han mostrado que estas vacunas de polisacárido Vi, administradas como una sola dosis, presentan una inmunogenicidad y eficacia consistentes (9), resultando protectoras al cabo de los 10-11 años con niveles de anticuerpos anti Vi en el 58 % de los casos (18). No obstante, debido a su insuficiente inmunogenicidad en niños menores de dos años su uso ha sido aprobado a partir de esta edad con reinmunizaciones recomendadas cada 3 años (4, 9).

En la Tabla 1 se exponen los títulos medios geométricos e intervalos de confianza al 95% del grupo vacunado agrupado por sexo y total de cada tiempo de muestreo.

Tabla 1. Títulos de IgG antipolisacárido Vi por sexo y totales del grupo vacunado

Tiempo (días)	Hembras		Machos		Total	
	TMG (UIgG/mL)	IC 95 % (UIgG/mL)	TMG (UIgG/mL)	IC 95 % (UIgG/mL)	TMG (UIgG/mL)	IC 95 % (UIgG/mL)
0	5,6	(5,1; 6,1)	5,5	(5,1; 5,9)	5,5	(5,3; 5,8)
7	249,6	(177,2; 351,7)	191,2	(160,4; 227,8)	218,5	(181,6; 262,8)
14	258,9	(172,7; 388,3)	146,3	(126,2; 169,5)	194,6	(153,4; 246,8)
21	151,6	(114,1; 201,7)	107,0	(94,3; 121,3)	127,3	(108,2; 149,9)
28	113,3	(90,5; 142,0)	87,5	(77,1; 99,4)	99,6	(87,3; 113,7)
42	79,1	(59,7; 104,8)	50,3	(43,9; 57,6)	63,1	(52,9; 75,3)
56	61,7	(47,9; 79,7)	38,5	(32,0; 46,4)	48,7	(40,7; 58,4)
84	60,9	(49,1; 75,6)	32,1	(26,5; 39,0)	44,3	(36,2; 54,1)

Leyenda: TMG: Título Medio Geométrico

IC: Intervalo de Confianza

Durante todo el estudio pudo observarse que, aunque mayores, los títulos de anticuerpos se encuentran más dispersos en las hembras que en los machos. Por otra parte, en el grupo vacunado las hembras alcanzaron su título máximo el día 14 mientras que la respuesta de los machos fue mayor el día 7. El análisis estadístico de estos resultados evidenció que para cada uno de los tiempos de muestreo posterior a la vacunación los TMG fueron significativamente menores en los machos con respecto a las hembras ($p < 0,05$). Un similar comportamiento fue reportado en un estudio en humanos realizado en China con una vacuna de polisacárido Vi de ese país donde la respuesta inmune mostró una mayor eficacia protectora en las mujeres que en los hombres (9). La respuesta entre ambos sexos del grupo no inoculado, así como en el tiempo 0 del grupo inmunizado no presentó diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

El análisis del porcentaje de animales respondedores reveló una seroconversión del 100% en el grupo vacunado alcanzada a partir del día 7 posterior a la vacunación, condición que se mantuvo hasta el día 84 en que la concentración de IgG antipolisacárido Vi de uno de los machos del grupo se encontró por debajo del criterio establecido; en el grupo control no inoculado ningún animal logró seroconvertir. Diferentes estudios de inmunogenicidad de vacunas de polisacárido Vi en humanos reportan porcentajes de respondedores entre el 70% y 80% (18, 19).

Los resultados obtenidos en este trabajo están en correspondencia con los estudios precedentes realizados a vax-TyVi (11, 20) y demuestran la capacidad inmunogénica de nuestra vacuna, la cual podría ser empleada en el control de la fiebre tifoidea en Cuba y en otras regiones del planeta.

Referencias

1. Crump N. Current Trends in Typhoid Fever. *Current Gastroenterology Reports* 2003;5:279-86.
2. Pérez A, Aguiar P. Fiebre tifoidea. Caracterización epidemiológica. Situación mundial y en Cuba. *VacciMonitor* 1999;8(6):1-10.
3. House D, Bishop A, Parry C, Dougan G, Wain J. Typhoid Fever: Pathogenesis and Disease. *Curr. Opin. Infect. Dis* 2001; 4:573-8.
4. Ivanoff B, Levine M, Lambert P. Vaccination against typhoid fever: present status. *Bull. World Health Organ* 1994;72(6):957-71.
5. Garmory H, Brown K, Tieball R. Salmonella vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol. Rev* 2002; 26(4):339-53.
6. Wain J, Kidgell C. The emergence of multidrug resistance to antimicrobial agents for the treatment of typhoid fever. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 2004;98:423-30.
7. Chatfield S, Roberts M, Londono P, Cropley I, Douce G, Dougan G. The development of oral vaccines based on live attenuated Salmonella strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*1993;7:1-7.
8. Klugman KP, Gilbertson IT, Koornhof HJ, Robbins JB, Schneerson R, Schulz D, et al. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet.*1987;2(8569):1165-9.
9. Hessel L, Debois H, Fletcher M, Dumas R. Experience with *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*1999;18(9):609-20.
10. Fernández JM, Infante JF, Riverón L, Fariñas M, Oramas J, Pérez V, y colaboradores. Ensayo toxicológico a dosis única del producto vacunal Polisacárido Vi contra *Salmonella typhi* en ratones OF-1. *VacciMonitor* 1999;8(8):2-6.
11. Cuello M, Riverón L, Cabrera O, Oramas J, Miranda A, Fariñas M, y colaboradores. Immunogenicidad y protección inducida en ratones por polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. *Acta Farm. Bonaerense* 2001; 20(3):221-4.
12. Klugman KP, Koornhof HJ, Robbins JB, Le Cam NN. Immunogenicity, efficacy and serological correlate of protection of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. *Vaccines.*1996;14(5):435-8.
13. Yang H. Efficacy trial of Vi polysaccharide vaccine against typhoid fever in south-western China. *Bull. World Health Organ* 2001; 79(7):625-31.
14. Ochoa RF, Martínez JC, Ginebra M, Ferriol XR, Rodríguez VM, Sotolongo FT. Immunogenicity of a new *Salmonella typhi* Vi polysaccharide vaccine - vax-TyVi - in Cuban school children and teenagers. *Vaccine* 2003;3806:1-3.
15. Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol* 1991;29:1439-46.
16. Kayhty H. Immunogenicity Assays and Surrogate Markers to Predict Vaccine Efficacy. In: Plotkin S, Brown F, Horaud F. *Preclinical and Clinical Development of New Vaccines.* Dev. Biol. Stand. Basel, Karger. 1998; 95:175-80.
17. Ochoa RF. Bosquejo del sistema inmune en la defensa frente a infecciones. En: Ochoa RF. *Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación.* Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2005:7-27.
18. 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.
19. Engels EA, Bennish ML, Falagas ME, Lau J. Typhoid fever vaccines. *Vaccine* 2000;18(15):1433-4.
20. Riverón L, Alemán A, Izquierdo L, Miranda A, Oramas J, Gil P, y col. Estudio de anticuerpos inducidos en ratones por la vacuna antitifoídica cubana de polisacárido Vi. *VacciMonitor* 1999; 8(9):1-4.

Study of immunogenicity in mice of the Cuban Vi Polysaccharide Typhoid vaccine, vax-Tyvi

Abstract

Salmonella enterica serovar Typhi is a microorganism causing more than 16 millions of typhoid fever cases with about 600 000 deaths per year around the world. Typhoid fever vaccines based on *S. Typhi* Vi capsular polysaccharide have been well received between producers and customers. The present work deals with the immunogenicity study in mice of the Cuban polysaccharide typhoid fever vaccine vax-TyVi. The experimental design included a control group and one group receiving 0.05 mL of Cuban vaccine by intramuscular route. Blood samples were taken at days -3, 7, 14, 21, 28, 42, 56 and 84, and the titers of IgG antibodies against Vi polysaccharide were measured by ELISA. Data were analyzed by group and sex. Seroconversion rates (≥ 4 -fold increase of anti-Vi antibody titers over pre-immunization levels) were calculated. The antibody response induced after vaccination showed enhanced IgG titers against Vi polysaccharide in the vaccinated group (100% of seroconversion rates) while the control group kept its initial titers (0% of respondents). IgG response was significantly higher in females than in males.

Keywords: Typhoid fever, vaccines, vax-TyVi, immunogenicity, preclinics