

Estudio de anticuerpos inducidos en ratones por la vacuna antitifoídica cubana de polisacárido Vi

Luis Riverón, Ainel Alemán, Luis Izquierdo, Alina Miranda, Julio Oramas, Pedro Gil, Maribel Cuello, Mildrey Fariñas, Juan Infante, Gustavo Sierra.

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

Se realizó un estudio comparativo de los niveles de anticuerpos séricos inducidos en ratones por tres lotes consecutivos de vacunas obtenidos en la Planta de Producción del Instituto Finlay con una vacuna comercial reconocida (Typhim Vi, de los Laboratorios Pasteur-Merieux), mediante un ELISA de tipo indirecto; se obtuvo como resultado que no hubo diferencias significativas estadísticamente entre los niveles de anticuerpos inducidos por los lotes producidos en el Instituto Finlay y el lote de vacuna de referencia en cuestión. Se apreció un incremento significativo de los niveles de anticuerpos a los 28 días en los ratones vacunados con respecto a los controles, lográndose un 100% de seroconversión para cada uno de los lotes evaluados.

Palabras clave: vacuna, anticuerpos, antitifoídica, Polisacárido Vi.

Introducción

El polisacárido capsular Vi de *Salmonella typhi* ha sido considerado uno de los componentes antigénicos más importantes de esta bacteria. En humanos se observa una pobre respuesta contra este antígeno en la fase aguda de la enfermedad, mientras que la respuesta es extremadamente alta en portadores sanos. Derivado de esta observación surge la idea del papel protector de estos anticuerpos en la inmunidad contra la fiebre tifoidea (1).

El antígeno Vi está ampliamente involucrado en la protección del microorganismo sobre la acción del complemento del suero. Desde el punto de vista inmunogénico este desencadena un mecanismo independiente de células T (2), lo que explica porqué la inmunogenicidad del polisacárido Vi es menor en niños vacunados cuando se compara con adultos, así como el hecho de que una administración adicional del antígeno no incrementa la respuesta de anticuerpos en el suero. Para resolver este problema se han realizado ensayos de conjugación de este polisacárido con diferentes proteínas como, por ejemplo, el toxoide tetánico, la toxina del cólera, la exoproteína A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros, con resultados muy positivos (3,4,5).

Estudios de las propiedades inmunogénicas del antígeno Vi han mostrado la presencia de al menos dos determinantes antigénicos. Uno de ellos es el grupo O-acetilo, que desempeña un papel inmunodominante y el otro es el grupo N-acetilo.

Se ha demostrado que el grupo carboxilo no constituye un determinante inmunológico crítico (6).

Una de las etapas más difíciles en el desarrollo de un producto es sin duda el cambio de escala por los peligros que encierra el hacer masiva la obtención del mismo, y una de las características más sensible es la calidad; es por ello que se hace imprescindible controlar muy rigurosamente la misma, una vez escalada su producción.

En el caso de una vacuna de polisacárido la capacidad de inducir anticuerpos es fundamental, por lo que es una de las características más importantes a tener en cuenta en el nuevo producto. Uno de los modelos animales más usados en la investigación y desarrollo de vacunas ha sido el modelo murino (7) y en especial para este tipo de vacuna de Polisacárido Vi (8, 9, 10).

El objetivo del presente trabajo fue realizar una comparación entre los niveles de anticuerpos inducidos en ratones por tres lotes de vacuna antitifoídica de Polisacárido Vi obtenidos en la Planta de Producción de Vacunas del Instituto Finlay, bajo condiciones de Buenas Prácticas de Producción y con la calidad exigida por la Organización Mundial de la Salud (11), con una vacuna comercial similar.

Materiales y Métodos

Antígenos: Se tomaron tres lotes consecutivos de vacuna de Polisacárido Vi (8001, 8002, 8003); obtenidos en la Planta de Producción del Instituto Finlay bajo condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación; así como un lote de referencia (M1226) constituido por la vacuna comercial Typhim Vi de los Laboratorios Pasteur-Merieux.

Inmunización: Se utilizaron 50 ratones C57/BL6 machos y de peso semejante (18 g-22 g), suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con su correspondiente certificado de salud y calidad genética. Estos fueron distribuidos en cuatro grupos, con 10 ratones cada uno, correspondientes con cada lote analizado; así como un grupo control no vacunado. La inoculación del antígeno se realizó por vía subcutánea con una dilución 1/25 de la vacuna (1 µg de polisacárido por ratón) en solución buffer isotónica y se compararon los niveles de anticuerpos existentes contra el antígeno Vi antes de la inoculación con respecto a los inducidos a los 28 días.

Detección de Anticuerpos: Se realizó por un método inmunoenzimático ELISA de tipo indirecto (12,13,14,15). Las placas de polivinilo (Costar) fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente con poly-L-Lysina (100µg/mL); se lavó tres veces con solución salina tamponada de fosfato (SSTF) 0,15 M pH 7,2 y Tween 20 (0,05%). Después se adicionó polisacárido Vi a 5 µg/mL como antígeno de recubrimiento y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Los pasos siguientes involucraron la adición de glutaraldehído (0,015%) y de gelatina a 100 µg/mL respectivamente. Posteriormente se añadieron 100 µL en cada pocillo de las muestras individuales de suero diluidas 1/100 utilizando como diluyente SSTF con Tween 20 (0,05%) y leche descremada al 2%. El conjugado utilizado fue anti IgG de ratón-peroxidasa (Sigma) diluido 1/5000. En cada uno de los pasos anteriores se incubaron las placas a 37 °C durante una hora y se realizaron tres lavados entre cada uno de ellos. La solución de sustrato estuvo constituida por ortofenildiamina (0,039mg/mL) y peróxido de hidrógeno al 0,039% en solución tampón de citrato. A los 20 minutos se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2N. Se leyó la absorbancia en un lector Titertek Multiskan (Flow Laboratories) a una longitud de onda de 492 nm.

En el análisis de la seroconversión para cada grupo se tomó como criterio positivo que el título alcanzado a los 28 días por cada ratón individual (medido a través de la absorbancia leída a 492 nm), fuese cuatro veces o más superior con respecto al título inicial obtenido (16).

Procedimiento estadístico: Para el análisis estadístico de los resultados fue utilizado un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple realizado con los datos transformados a logaritmos naturales (base e) para normalizar su distribución. En caso de encontrar diferencias, se usaron las pruebas de

comparaciones múltiples de LSD (menor diferencia significativa), la de Tukey (HSD). Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS (Versión 2.1).

Resultados y Discusión

Al comparar los niveles de anticuerpos Vi presentes antes de la inoculación en cada uno de los grupos evaluados, incluyendo el control; se observó que no existían diferencias estadísticas significativas entre cada uno de ellos ($p \geq 0,05$). A los 28 días, los grupos que recibieron componentes activos alcanzaron títulos mayores y significativamente diferentes al grupo control ($p < 0,05$), mientras que la batería de pruebas de comparaciones múltiples no detectó diferencias significativas entre los títulos alcanzados en este tiempo por los ratones con los lotes 8001, 8002, 8003 y la vacuna de referencia comercial ($p \geq 0,05$).

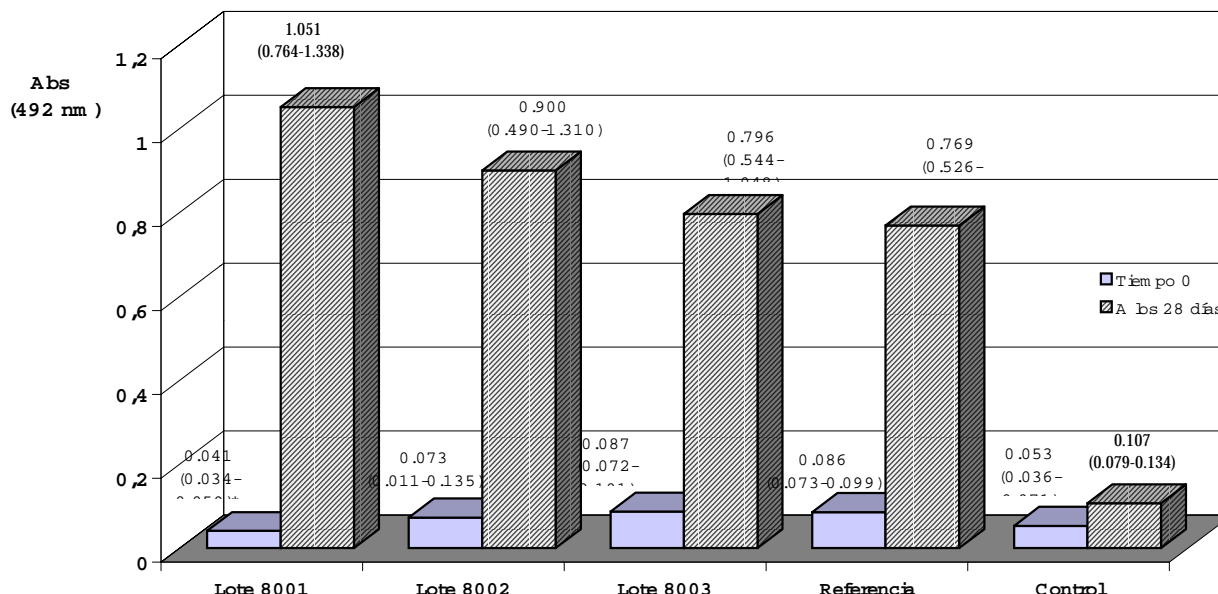
Si se analiza el porcentaje de seroconversión para cada uno de los lotes evaluados se observa que en todos los casos se alcanzó un 100%, lo que avala la capacidad inmunogénica de estos antígenos en ratones (Figura 1).

La capacidad de ciertas vacunas de estimular anticuerpos Vi en ratones está altamente correlacionada con la protección de los mismos contra *Salmonella typhi*, debido a la alta capacidad inmunogénica del antígeno Vi en estas especies (17,18,19,20,21); por lo tanto podemos plantear que los lotes evaluados y el lote comercial de referencia confirieron niveles altos y semejantes de protección en el modelo analizado.

Si se tiene en cuenta además, que la protección en ratones puede servir como una demostración de potencia para la vacuna de polisacárido Vi (22); podemos inferir también que los lotes evaluados y el comercial son altamente potentes desde el punto de vista inmunogénico, por los niveles de anticuerpos alcanzados.

La vacuna Typhim Vi comercializada por los laboratorios Pasteur-Merieux ha demostrado en estudios serológicos en humanos, niveles de producción de anticuerpos excelentes (17,23,24). El hecho de que los niveles e inducción de anticuerpos en el modelo murino fueron muy semejantes entre los lotes 8001, 8002 y 8003 y la vacuna de referencia, constituye un importante aval en los estudios para el licenciamiento de la Vacuna Antitifoídica Cubana de polisacárido Vi.

Figura 1. Comparación de anticuerpos inducidos por los diferentes lotes de vacunas ensayados



*Intervalo de Confianza para un nivel de significación de 95%

Referencias

- Félix A, Krikorian KS, Reitler R. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigens in cases of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. *J. Hyg.* 1935; 35:421-427.
- Robbins JD, Robbins JB. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. *J. Infect. Dis.* 1984; 150:436-499.
- Szu SC, Stone AL, Robbins J.B. Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for prevention of typhoid fever. Preparation, characterization, and immunogenicity in laboratory animals. *J. Exp. Med.* 1987; 166:1510-1524.
- Szu SC, Schneerson R, Vickers JH, Bryla D, Robbins JB. Comparative immunogenicities of Vi polysaccharide-protein conjugates composed of cholera toxin or its B subunit as a carrier bound to high or low molecular weight Vi. *Infect. immun.* 1989; 57:3823-3827.
- Szu SC, Taylor DN, Trofa AC, Clements JD, Shiloach J, Sadoff JC, Bryla D, Robbins JB. Laboratory and preliminary clinical characterization of Vi capsular polysaccharide-protein conjugates vaccines. *Infect. immun.* 1994; 62:4440-4444.
- Szewczyk B, Taylor A. Immunochemical properties of Vi antigen from *Salmonella typhi* Ty2: presence of two antigenic determinants. *Infect. Immun.* 1980; 29:539-544.
- Thate J, Rath S and Bal V. Analysis of immunization route-related variation in the immune response to heat-killed *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 1995;(Jan):99-103.
- Kossaczka Z, Bystricky S, Bryla D. Synthesis and immunological properties of Vi and di-O-acetyl pectin protein conjugates with adipic acid dihydrazide as the linker. *Infect. Immun.* 1997; (June):2088-2093.
- Szu Sh, Li X, Stone A, Robbins J. Relation between Structure and Immunologic Properties of the Vi Capsular Polysaccharide. *Infect. Immun.* 1991; (Dec):4555-4561.
- Fariñas M, Riverón L, Miranda A, Oramas J, Infante J, Fernández A y col. Estandarización de la Prueba de Potencia de la Vacuna Antitifoídica de Polisacárido Vi. *Biotechnología Habana'97; Avances en Biotechnología Moderna*; 1997 Dic 1-6: La Habana, Cuba. *Elfos Scientiae*; 1997. p.v22.
- OMS. Normas para la vacuna antitifoídica de polisacáridos Vi (Normas para sustancias biológicas N° 48). *Serie de informes técnicos.* 1994; (840).
- Cuello M, Riverón L, Cabrera O, Oramas J, Miranda A, Fernández A y col. Estudio de la vía de inoculación y el esquema de vacunación de la Vacuna Antitifoídica de Polisacárido Vi. *Biotechnología Habana'97; Avances en Biotechnología Moderna*; 1997 Dic 1-6: La Habana, Cuba. *Elfos Scientiae*; 1997. p.v22.
- Losonsky GA, Ferreccio C, Kotloff KL, Kaintuck S, Robbins JB, Levine MM. Development and evaluation of an enzyme-linked immunoabsorbent assay for Vi antibodies in detection of chronic *Salmonella typhi* carriers. *Journal of Clinical Microbiology.* 1980; 12:22-26.

14. Brugier JCh, Barra A, Schulz D, Preud'homme JL. Isotype of human vaccinal antibodies to the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*. 1993;23:38-41.
15. Cryz SJ, Fürer E, Baron LS, Noon KF, Rubin FA, Kopecko DJ. Construction and Characterization of a Vi-Positive Variant of the *Salmonella typhi* Live Oral Vaccine Strain Ty21a. *Infect. immun*. 1989; (Dec):3863-3868.
16. Lee W. Typhim Vi Vaccine. *J.Travel. Med*. 1997; 4:32-37.
17. Klugman K, Koornhof H, Gilbertson I. Protective Activity of Vi Capsular Polysaccharide Vaccine against Typhoid Fever. *The Lancet*. 1987:1165-1169.
18. Felix A. New type of typhoid and paratyphoid vaccine. *Br. Med. J*. 1941;1:391-395.
19. Landy M. Studies of Vi antibody. VII. Characteristics of the immune response in the mouse. *Am. J. Hyg.*1958;65:593-598.
20. Landy M, Lamb E. Estimation of Vi antibody employing erythrocytes treated with purified Vi antigen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1953;82C:593-598.
21. Wong KH, Feeley JC, Pittman M. Adhesion of Vi antigen and toxicity in typhoid vaccines inactivated by acetone or by heat and phenol. *J.Infect. Dis*. 1974; 129:501-506.
22. United States Government Code of Federal Regulation National Archives and Records Administration. Food and Drugs. Title 21. Point 620. Subpart B. 1986;620:69-70.
23. Plotkin SA, Bouveret-Le Cam NA. A new typhoid vaccine composed of the Vi capsular polysaccharide. *Arch. Intern. Med*. 1995; 155:2293-2299.
24. Acharya IL, Lowe CU, Thapa R. Prevention of typhoid fever in nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. *N. Engl. J. Med*. 1987; 317(18):1101-1104.

Study of the antibodies elicited in mice by the Cuban Polysaccharide Vi typhoid vaccine

Abstract

It was carried out a comparative study about the levels of elicited antibodies in mice by three serial batches of vaccines that had been produced in the Plant of Production of the Finlay Institute with a commercial vaccine ("Typhim Vi" from the Pasteur-Merieux Laboratories), through an immunoenzymatic test (ELISA of indirect type); it was obtained as result that there was not significant statistical differences between the levels of elicited antibodies by the vaccine batches produced in the Finlay Institute and the batch of reference vaccine. It was appreciated a significant increase of the levels of antibodies at 28 days in the vaccinated mice at compare with the controls, achieving a 100% of seroconversion for each one of the evaluated batches.

Keywords: Vaccine, antibody, typhoid, Vi polysaccharide.