

Inmunogenicidad y Protección Inducida en Ratones por Polisacárido Vi de *Salmonella typhi*

Maribel CUELLO-PÉREZ *, Luis RIVERÓN-MARTÍNEZ, Osmir CABRERA-BLANCO,
 Julio ORAMAS-GARCIA, Alina MIRANDA-GALUZZO, Mildrey FARIÑAS-MEDINA,
 Juan F. INFANTE-BOURZAC, Gustavo SIERRA-GONZÁLEZ

*Instituto Finlay. Ave. 27 No. 19805, La Lisa.
 AP 16017. Cod.11600, La Habana, Cuba.*

RESUMEN. Se evaluaron diferentes esquemas de inmunización con el preparado vacunal cubano contra *Salmonella typhi* (polisacárido Vi) en ratones, con el objetivo de determinar su posible influencia para su empleo en humanos. Cuatro esquemas fueron ensayados, utilizando dos vías de inmunización, la Subcutánea (SC) y la Intramuscular (IM), con 1 y 2 dosis a intervalos de 7 y 14 días entre ellas. La dinámica de anticuerpos se determinó mediante un ensayo inmunoenzimático. Los niveles de anticuerpos obtenidos en cada ensayo fueron similares. La inmunización confirió niveles de protección de un 70% en todos los esquemas utilizados, por lo que el esquema de inmunización para humano de 1 dosis por vía IM ó SC puede ser empleado.

SUMMARY. "Immunogenicity and Protection Induced in Mouse by Polysaccharide Vi of *Salmonella typhi*". Different immunization schemes with the Cuban vaccine preparation against *Salmonella typhi* (Polysaccharide Vi) were evaluated in mice, in order to determinate the possible influence for human use. Four immunization schemes were used: two different route of immunization, subcutaneous (SC) and Intramuscular (IM), with 1 or 2 doses with intervals 7 or 14 days between them. Total antibodies to polysaccharide Vi of *Salmonella typhi* were measured by an immunoenzymatic assay. The immunogenicity levels were similar for all schemes. The vaccine provided protection level of 70%. According to this results we propose the immunization human schemes of one doses of polysaccharide administered by IM o SC route.

INTRODUCCIÓN

Las fiebres entéricas continúan siendo una causa considerable de morbilidad y mortalidad en países que no tienen asegurado un control de las aguas albañales y presentan contaminación en el agua potable. En estos países la causa más frecuente y seria de fiebre entérica es *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea) ^{1,2}, donde se ha estimado que anualmente ocurren alrededor de 33 millones de casos producido por *S. typhi*, de los cuales 0,5 millones tienen un desenlace fatal.

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 ^{3,4}. Esta es la vacuna que se producía anteriormente en nuestro país. La segunda es la va-

cuna atenuada de *S. typhi* (Ty21a) administrada oralmente y la tercera vacuna es la que utiliza al polisacárido capsular como inmunógeno ⁴⁻⁶.

En el mundo existen en estos momentos varias tendencias en la búsqueda de nuevas variantes de vacuna, como la vacuna de polisacárido Vi, las vacunas conjugadas de polisacárido Vi con una proteína portadora ^{7,9} y vacunas combinadas; como ejemplo podemos citar 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 ^{7,10}.

También ha sido utilizado el polisacárido Vi

PALABRAS CLAVE: Inmunogenicidad, Polisacárido Vi, *Salmonella typhi*.
KEY WORDS: Immunogenicity, Polysaccharide Vi, *Salmonella typhi*.

* Autora a quien dirigir la correspondencia. Fax: (53-7) 28 6075, 28 6754. E-mail: mcuello@finlay.edu.cu

Cuello-Pérez, M., L. Riverón-Martínez, O. Cabrera-Blanco, J. Oramas-García, A. Miranda-Galuzzo, M. Fariñas-Medina, J.F. Infante-Bourzac & G. Sierra-González

en vacunas combinadas; por ejemplo, se realizó un estudio multicéntrico donde se evaluó la consistencia de 3 lotes de una vacuna combinada de hepatitis A y polisacárido Vi en 462 personas de edades comprendidas entre 15 y 50 años, obteniendo como resultado que después de 14 días de inmunizados el 95% de las personas en estudio mostraron anticuerpos anti Vi y más del 86% mostraron anticuerpos anti Hepatitis A ¹¹; otro de los estudios de vacunas combinadas utiliza al polisacárido Vi junto con cepas de *Vibrio cholera* CVD 103-HgR, la cual mostró buenos resultados ¹².

Una de las líneas de trabajo del Instituto Finlay de La Habana es desarrollar en primera instancia una vacuna altamente purificada, menos reactogénica y más eficaz, por lo que a partir del año 1995 se propuso obtener una nueva vacuna antitifoídica a partir de antígenos polisacáridos Vi purificados.

En las pruebas en animales de los preparados vacunales en estudio se hace necesario comprobar si las vías de inoculación y los esquemas de inmunización propuestos son adecuados ¹³. Con estos fines se estandarizó y evaluó un sistema ELISA, que además creará las bases para un sistema de cuantificación del antígeno en los preparados vacunales, tal como lo recomienda la OMS ^{1,34} para esta vacuna y se retaron los animales con *S. typhi* para determinar la protección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inmunización

Para este trabajo se utilizaron ratones C57BL/6 machos entre 18-22 g de peso al inicio del experimento, procedentes del centro nacional de producción de animales de laboratorio (CENPALAB Habana Cuba). Seis grupos de 10 ratones cada uno, distribuidos de la siguiente manera: dos de ellos para comparar las vías de inoculación reportadas (IM y SC) y cuatro para evaluar las distintas dosis por vía SC (un grupo con una dosis única, otro con dos dosis con un intervalo entre dosis de siete días, un tercer grupo con dos dosis pero con un intervalo de catorce días y un grupo no vacunado como control negativo). Estos ensayos se repitieron 3 veces.

Los sueros de los animales fueron colectados por separado a los 0, 7, 14, 21 y 28 días posteriores a la inmunización. La concentración de polisacárido Vi fue de 1 µg/ratón en solución tampón isotónica. El polisacárido Vi procedía de la Planta de Producción del Instituto Finlay.

Detección de Anticuerpos

Los anticuerpos se detectaron por un ELISA indirecto ^{2,14}. Previamente las placas de polivinilo de 96 pozos (Costar) fueron incubadas 1 h a temperatura ambiente con Poly-L-Lysina (100 µg/ml). Se lavaron las placas tres veces con solución salina tamponada de fosfato (SSTF) 0,15 M de pH 7,2 y Tween 20 al 0,05%. Después se adicionó 100 µl de Polisacárido Vi a 5 µg/ml como antígeno de recubrimiento y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Luego se añadió 100 µl de glutaraldehído (0,015%) y 100 µl de gelatina a 100 µg/ml, respectivamente, seguido de incubación a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 100 µl en cada pocillo de las muestras individuales de suero diluidas 1/100 utilizando como diluyente SSTF con Tween 20 al 0,05% y leche descremada al 2%. Como control positivo se tomó un suero de alto título contra Polisacárido Vi obtenido de un experimento previo y como control negativo se utilizó un suero obtenido de animales sin inocular. 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 (0,039 mg/ml) y peróxido de hidrógeno al 0,039 % en solución tampón de citrato de pH 5. A los 20 min se detuvo la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 2 N. Se leyó la absorbancia en un lector Titertek Multiskan (Flow Laboratories) a una longitud de onda de 492 nm.

El análisis de seroconversión para cada grupo se realizó tomando como criterio positivo el título alcanzado a los 28 días por cada suero individual y teniendo en cuenta que este valor fuera cuatro veces mayor o igual que el valor inicial obtenido ¹⁵.

Protección

Todos los grupos de animales fueron sometidos a una prueba de reto con microorganismos vivos a una concentración de 100 veces la Dosis Letal 50.

Análisis 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) y la de Tukey (HSD). Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS (Versión 2.1).

RESULTADOS

Vías de inoculación

Los resultados obtenidos por ELISA en la evaluación de la inmunogenicidad del preparado vacunal empleado por diferentes vías de inoculación (IM y SC) con una dosis son mostrados en la Figura 1. En ambos casos se observó una respuesta caracterizada por un aumento de los niveles de anticuerpos IgG después de la inmunización de los ratones por las vías estudiadas, no se observan diferencias significativas entre las mismas en ninguno de los tiempos de inoculación.

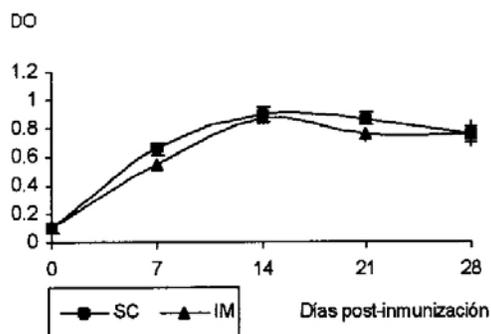


Figura 1. Comparación de anticuerpos IgG anti polisacárido Vi inducidos por Polisacárido Vi en ratones inmunizados por vía subcutánea (SC) y por vía intramuscular (IM) con una dosis por vía.

Cantidad de Dosis

En la Figura 2 se muestra la dinámica de la respuesta de anticuerpos obtenida en los sueros de los ratones inmunizados con 1 ó 2 dosis por vía SC. Con los resultados mostrados se evidenció que no es necesario una segunda dosis, ya que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos a los 28 días en los niveles de anticuerpos que se alcanzaron en los animales inmunizados con una o dos dosis. También observamos que al inmunizar a los siete días después de la primera dosis hay un aumento sustancial de los niveles de anticuerpos que comienzan a caer a los 7 días posterior a esta segunda inmunización; estos anticuerpos IgG generados en ese intervalo de tiempo pudieran ser de utilidad en caso de que necesitemos altas concentraciones de anticuerpos para estudios inmunológicos posteriores.

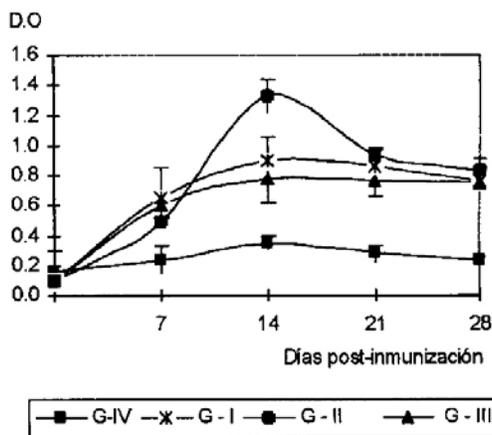


Figura 2. Comparación de los anticuerpos IgG anti polisacárido Vi inducidos en ratones por el Polisacárido Vi siguiendo distintos esquemas de vacunación. GI: grupo que recibió una dosis; GII: grupo que recibió una dosis de refuerzo a los 7 días; GIII: grupo que recibió una dosis de refuerzo a los 14 días; GIV: Control negativo.

Todos los grupos de animales incluidos en este estudio fueron sometidos a la prueba de reto, donde se obtuvo iguales porcentajes de supervivencia en los casos inmunizados con los diferentes esquemas (70%), mientras que en los animales del grupo control negativo fue de un 10%.

DISCUSIÓN

En la actualidad la inmunoprofilaxis contra la fiebre tifoidea está basada en la disponibilidad de tres tipos de vacunas. En el caso de la vacuna celular que está compuesta por células enteras de *S. typhi* inactivadas con calor-fenol, los esquemas de vacunación empleados utilizan dosis de 5×10^8 bacterias por vía subcutánea y en estudios clínicos realizados se demostró que una sola dosis induce una protección significativa de hasta 2 años, mientras que una tercera dosis aumenta el tiempo de protección hasta 5 años de vacunado, no obstante presenta la dificultad de ser tóxica y en los vacunados se producen reacciones adversas ^{3,4}.

Otra de las vacunas es la obtenida a partir de una cepa atenuada de *S. typhi* (Ty21a) administrada oralmente y que requiere 3 dosis de 2×10^9 bacterias a intervalos de un día entre ellas para inducir protección ⁴; así también podemos encontrar en la literatura que se han realizado estudios de dosis relacionadas con protección, donde se ha demostrado que con 2 o 3 dosis se alcanza una protección significativa de hasta 2

Cuello-Pérez, M., L. Riverón-Martínez, O. Cabrera-Blanco, J. Oramas-García, A. Miranda-Galuzzo, M. Fariñas-Medina, J.F. Infante-Bourzac & G. Sierra-González

años ^{1,16}. Por otra parte encontramos otros autores que realizan un estudio de 7 años de duración donde prueban 2 variantes de formulación de esta vacuna: una formulación líquida (la vacuna liofilizada es reconstituida en buffer) y otra formulación de la vacuna que la presenta en forma de cápsula; para ambas formulaciones se usan esquemas de inmunización de 3 dosis en días alternos y demuestran que la formulación en forma de cápsula indujo una protección del 63% en 3 años y de un 62% a los 7 años posterior a la administración de la vacuna, mientras que con la formulación líquida se encontró una protección del 77% a los 3 años y de un 78% a los 5 años ¹⁶.

La tercera de las vacunas es la que utiliza al polisacárido capsular como inmunógeno, la cual según evaluaciones clínicas realizada en poblaciones de alto riesgo, han facilitado evidencia que confiere inmunidad contra la fiebre tifoidea. El esquema de vacunación para esta vacuna en humanos utiliza una sola dosis de Polisacárido Vi administrada por vía IM o SC y obtiene de un 70-75% de protección de hasta 2 años de duración ^{4,6}. Recientemente se ha reportado que experiencias de campo de 8 años han mostrado que esta vacuna (administrada como 1 sola dosis y por vía IM o SC) presenta una inmunogenicidad y eficacia consistente ¹⁷. En otro trabajo se realiza un ensayo randomizado a doble ciego con 83 personas en edades comprendidas entre los 16 y 20 años de edad, quienes fueron vacunados hace 10 u 11 años con la vacuna de polisacárido Vi. Como resultado de este estudio se encontró que el 58% de los casos estudiados

presentaban niveles de anticuerpos anti Vi protectores contra *S. typhi* ⁶.

También es conocido que la capacidad de ciertas vacunas de estimular anticuerpos anti polisacárido Vi está altamente correlacionada con la protección de los mismos contra *S. typhi*, debido a la alta inmunogenicidad del antígeno Vi en estas especies ^{5,6}.

Nuestra preparación vacunal, al igual que la anterior, está compuesta por el polisacárido Vi y los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los planteados para este tipo de vacuna, ya que los resultados de los diferentes esquemas de vacunación donde se estudió la cantidad de dosis reflejó que una segunda dosis no se justifica para una mayor protección (70%). Aunque una segunda dosis a los siete días nos permitiría obtener sueros con altos títulos para cualquier fin deseado.

Por otra parte, en el estudio de la vía de administración quedó evidenciado que nuestro preparado vacunal puede administrarse tanto por vía subcutánea como intramuscular, ya que el estudio no mostró diferencias significativas entre ambas vías, tanto en la generación de anticuerpos como en el porcentaje de protección por reto, lo cual concuerda también con los resultados de los autores que utilizan este tipo de vacuna ^{2,13}. Estos resultados avalan la utilización de nuestro preparado vacunal en los ensayos clínicos con un esquema de una dosis por vía IM o SC. Así como también avalan la utilización de este producto en futuras vacunas combinadas y conjugadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ivanoff, B., M. Levine & P.H. Lambert (1994) *Bull. W.H.O.* **72**: 957-71
- Brugier JCh, A. Barra, D. Schulz & J.L. Preud'homme (1993) *Int. J. Clin. Lab. Res.* **23**: 38-41
- O.M.S. (1994) "Norma para la vacuna antitifoídica de Polisacárido Vi. Norma para Sustancias Biológicas N° 48. Anexo 1". Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos N° 840
- Engels, E.A. & J. Lau. (2000) "Vaccines for preventing typhoid fever". *Cochrane Database Syst. Rev.* (2): CD001261
- Klugman, K.P., H.J. Koornhof, R. Schneerson, M. Cadoz, T.T. Gilbertson & J.B. Robbins (1987) *Lancet.* **330**: 1165-9
- Keddy, K.H., K.P. Klugman, C.F. Hansford, C. Blondeau & N.N. Bouveret le Cam. (1999) *Vaccine* **17**: 110-3
- Lin, F.Y., V.A. Ho, H.B. Khiem, D.D. Trach, P.V. Bay, T.C. Than, Z. Kossaczka, D.A. Bryla, J. Shiloach, J.B. Robbins, R. Schneerson & S.C. Szu (2001) *J. Med.* **344**: 1263-9
- Szu, C., R. Schneerson, J.B. Robbins & Ch. Chase (1993) Polysaccharide-Protein conjugates. United States Patent. PN: 5,204,098
- Singh, M., N.K. Ganguly, L. Kumar & H. Vohra (1999) *Microbiol. Immunol.* **43**: 535-42
- Kossaczka, Z, F.Y., Lin, V.A. Ho, N.T. Thuy, P. Van Bay, T.C. Thanh, H.B. Khiem, D.D. Trach, A. Karpas, S. Hunt, D.A. Bryla, R. Schneerson, J.B. Robbins & S.C. Szu (1999) *Infect. Immun.* **67**: 5806-10
- Beran, J., M. Beutels, K. Levie, P. Van Damme, I. Dieussaert, M. Gillet, C. Van Hoecke, & N. Tornieporth. (2000) *J. Travel Med.* **7**: 246-52
- Foster, R.H. & S. Noble (1999) *Drugs* **58**: 91-6; discussion 97-8
- Thate, J., S. Rath & V. Bal (1995) *Infect. Immun.* **63**: 99-103
- Cryz, S., E. Furer, L.S. Baron, K.F. Noon, F.A. Rubin & D.J. Kopecko (1989) *Infect. Immun.* **57**: 3863-8
- Lee, W. (1997) *J. Travel. Med.* **4**: 32-7
- Levine, M.M., C. Ferreccio, P. Abrego, O.S. Martin, E. Ortiz & S. Cryz. (1999) *Vaccine* **17** (Suppl 2): S22-7
- Hessel, L., H. Debois, M. Fletcher & R. Dumas (1999) *Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**: 609-20