

INSTITUTO "CARLOS J. FINLAY"

Seguridad e inmunogenicidad de una vacuna de polisacárido Vi de *Salmonella typhi* en jóvenes cubanos

Dr. Rolando Felipe Ochoa Azze,¹ Dra. Idalia Morelia Baró Suárez,² Juan Carlos Martínez Rodríguez,³ Lic. Mayelin Mirabal Sosa,⁴ Ing. Marlene Isabel Armesto del Río⁵ y Dr Francisco Domínguez Álvarez⁶

RESUMEN

Se realizó un estudio aleatorizado, controlado y a doble ciegas, en adultos jóvenes de 18 a 20 años, con el objetivo de evaluar la reactogenicidad y la inmunogenicidad de vax-TyVi³, vacuna de polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. Se distribuyeron en 3 grupos; inmunizados con una dosis de vax-TyVi³ (Instituto Finlay), TYPHIM ViTM (Pasteur-Mérieux) o vax-TET³ (toxoides tetánico). Se tomaron muestras de suero antes y 21 d después de la inmunización. La inmunogenicidad se evaluó en 323 voluntarios mediante un ELISA indirecto. La seroconversión de los que recibieron vax-TyVi³ fue 81,97 % y de 65,05 % para TYPHIM ViTM. Los títulos medios geométricos posvacunales fueron 7,41 U/mL (5,92–9,27 U/mL) y 5,41 U/mL (4,35–6,72 U/mL) respectivamente. La seroconversión con vax-TET³ fue 0 %. La reactogenicidad de ambas vacunas polisacáridicas fue baja. Se concluyó que la inmunogenicidad de vax-TyVi³ no fue inferior a la de TYPHIM ViTM y su reactogenicidad resultó similar.

DeCS: FIEBRE TIFOIDEA; ENSAYOS CLINICOS; POLISACARIDOS; VACUNAS TIFOIDE-PARATIFOIDE; SALMONELLA TYPHI.

La fiebre tifoidea es una grave enfermedad que ocurre frecuentemente en muchos países en vías de desarrollo. Su control requiere la descontaminación de las aguas, un efectivo tratamiento de desechos junto al diagnóstico y tratamiento rápido de pacientes y portadores asintomáticos.¹⁻⁶ Esto no es posible en países donde la enfermedad es endémica y donde aún no ha sido controlada por vacunación debido a las limitantes de las vacunas existentes.¹⁻⁹

La historia de la vacunación contra esta enfermedad con vacunas del microorganismo completo inactivado con calor data de más de 100 años.^{2,7} Se han realizado varias mejoras a las vacunas inactivadas, pero persisten serios

problemas relacionados con reacciones locales y sistémicas.^{2,7,9} Con el empleo de una vacuna oral obtenida a partir de una cepa atenuada de *Salmonella typhi* (Ty21a) no se reportan estos problemas, pero se han informado cifras variables de eficacia. Esto, unido a la necesidad de múltiples dosis para lograr adecuados niveles de eficacia, pone en desventaja esta vacuna con respecto a otras.^{2,8,9}

La vacuna de polisacárido Vi de *Salmonella typhi* presenta varias ventajas; primero, la de provocar escasas reacciones adversas, muy similares a las producidas por otras de polisacáridos purificados.^{1,2,4,5,7,9} Segundo, el empleo de una sola dosis logra tanta protección como 2 de la vacuna

¹ Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Inmunología. Investigador Titular. Profesor Auxiliar.

² Médico Especialista de II Grado en Epidemiología.

³ Licenciado en Radioquímica. Investigador Agregado.

⁴ Licenciada en Matemática. Instructor.

⁵ Ingeniera en Telecomunicaciones. Analista de Sistema. Instructor.

⁶ Maestro en Ciencias Farmacéuticas. Licenciado en Ciencias Farmacéuticas.

celular inactivada y 3 ó 4 de la vacuna oral de cepa atenuada (Ty21a).^{2,7,8} Tercero, la existencia de métodos fisicoquímicos verificados en otras vacunas polisacarídicas que permiten su obtención y control de forma segura y estandarizada.^{10,11} Todo esto, unido a su alta estabilidad a temperatura ambiente, la convierten en una variante muy favorable para productores y consumidores.⁹⁻¹¹

Se han empleado diferentes inmunoensayos para la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas polisacarídicas, los sistemas inmunoenzimáticos, conocidos como ELISA presentan varias ventajas, son seguros, relativamente simples, específicos y su sensibilidad y detectabilidad son semejantes al radioinmunoanálisis, por lo que resultan técnicas apropiadas para la evaluación de la inmunogenicidad de vacunas de polisacárido Vi de *Salmonella typhi*.¹²

MÉTODOS

Diseño del estudio: se realizó un estudio aleatorizado, controlado, a doble ciegas, en adultos jóvenes de 18 a 20 años, entre diciembre de 2001 y abril de 2002, reclutados en un Instituto Pedagógico de Ciudad de La Habana; para evaluar la seguridad y demostrar no inferioridad en cuanto a inmunogenicidad de vax-TyVi[®], vacuna de polisacárido Vi de *Salmonella typhi* producida en el Instituto Finlay, con respecto a su similar comercial TYPHIM Vi[™] (Pasteur-Mérieux) empleada como comparador activo. Como control se utilizó una vacuna de toxoide tetánico (vax-TET[®]). El protocolo se revisó y aprobó por el Comité de Ética del Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. y se obtuvo el consentimiento escrito de participación por los voluntarios.^{13,14} Como criterios de exclusión se establecieron el haber padecido fiebre tifoidea, presentar alguna enfermedad crónica o aguda, estar bajo tratamiento inmunosupresor o inmunopotenciador, haber recibido alguna vacuna contra la fiebre tifoidea en los 3 años anteriores, temperatura axilar mayor que 37,5 °C y embarazo o lactancia al inicio del estudio. Una vez obtenida la muestra, se distribuyeron los sujetos aleatoriamente en 3 grupos según la vacuna empleada y se inmunizaron con una dosis de

0,5 mL por vía intramuscular de vax-TyVi[®] Lote L111, 25 µg/dosis), TYPHIM Vi[™] (Lote T1120, 25 µg/dosis) o vax-TET[®] (Lote L0079, 10 Lf/dosis). Se tomaron muestras de suero antes y 21 d después de la inmunización y se almacenaron a - 20 °C hasta su procesamiento simultáneo por ELISA. La reactogenicidad se evaluó por vigilancia activa durante los primeros 7 d, mediante el registro de síntomas y signos esperados y no esperados en tarjetas diarias, así como vigilancia pasiva durante los 30 d siguientes a la vacunación. Los eventos adversos locales previstos en el estudio fueron el dolor, enrojecimiento e induración en el sitio de la inyección. Los generales incluyeron la fiebre, cefalea y el malestar general. Se recogieron los eventos adversos no esperados, así como los eventos graves, los cuales se definen como cualquier evento médico desfavorable que amenace la vida, ocasione alguna discapacidad, requiera de hospitalización, o produzca la muerte.

Evaluación de la inmunogenicidad: se empleó un ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos antipolisacárido Vi sobre placas de poliestireno (Costar 3590, EUA).¹² La sensibilización se llevó a cabo en 2 pasos, el primero de 30 min a 20 - 25 °C, con poli-L-lisina (3 µg/mL), empleada como molécula puente, y el segundo con polisacárido Vi a una concentración de 6 µg/mL y durante 16-20 h entre 2 - 8 °C.^{12,15,16} Tanto el estándar de 3,2 U/mL (U/mL) como las muestras y el conjugado se diluyeron en amortiguador fosfato salino 0,15 M pH 7,2 con tween 20 a 0,05 % (v/v) y leche desnatada 3 % (p/v). La curva de calibración se preparó de 6 puntos, en diluciones desde 1:20 hasta 1:640. Las muestras se diluyeron entre 1:20 y 1:800, de forma tal que quedaran ubicadas dentro de la curva de calibración. El conjugado anti-inmunoglobulinas humanas polivalente acopladas a la fosfatasa alcalina (Sigma A-5034, EUA) se utilizó a una dilución 1:2 000. Cada uno de los pasos de reacción se desarrolló durante 1 h a 37 °C. Los inmunorreagentes no fijados se eliminaron mediante lavados con amortiguador fosfato salino 0,15 M pH 7,2 con tween 20 a 0,05 % (v/v). El sustrato paranitrofenil fosfato se empleó a una concentración de 1 mg/mL en solución reguladora dietanolamina 0,92 M, pH 9,8. Después de 30 min de incubación entre 20 y 25 °C se midieron las absorbancias en un lector de

placas ELISA a 405 nm y se transformaron a valores de concentración con el paquete de programas ELISA desarrollado por los Centros para el Control de Enfermedades (CDC), Atlanta, GA.

Métodos estadísticos: se calculó un tamaño muestral de al menos 320 adultos, considerando 70 % de seroconversión inducida por TYPHIM Vi™, una diferencia máxima entre los porcentajes de seroconversión de las vacunas polisacáridicas de 15 %, una potencia de 80 % y un nivel de significación de 0,05. Se aumentó el tamaño de la muestra para compensar las pérdidas del estudio. Se calcularon los títulos medios geométricos (TMG), los intervalos de confianza a 95 % (IC 95 %) y se estimó la seroconversión, definida como un aumento de los títulos igual o mayor que 4. Se empleó el análisis de varianza para comparar los TMG y la prueba exacta de Fisher para evaluar la diferencia entre los porcentajes de seroconversión y la reactogenicidad.¹⁷ La no inferioridad de la vacuna en estudio con respecto a la referencia (TYPHIM Vi™) se evaluó además con una prueba unilateral.^{18,19} En todos los casos se empleó como criterio $\mu = 0,05$.

RESULTADOS

La seguridad y reactogenicidad se estudiaron en 397 adultos jóvenes. Se observó un comportamiento similar entre vax-TyVi[®] y TYPHIM Vi™ ($p > 0,05$), así como una mayor reactogenicidad en el grupo al que se aplicó vax-TET[®]. Los síntomas y signos, con independencia de su intensidad, aparecieron en su totalidad durante las 48 h que siguieron a la vacunación. En los grupos que recibieron las vacunas de polisacárido Vi, los síntomas desaparecieron durante ese período, no así para los vacunados con vax-TET[®] en que se mantuvieron en algunos casos por más de 72 h, fundamentalmente el dolor en el sitio de la inyección, el síntoma local que con mayor frecuencia apareció. Los síntomas y signos generales esperados fueron moderados, predominó el malestar general y la cefalea (tabla 1). Los síntomas y signos no esperados fueron escasos, los más frecuentes correspondieron a desórdenes del sistema gastrointestinal e infecciones respiratorias agudas, en ningún caso relacionados con las vacunas polisacáridicas. No se reportaron eventos adversos graves.

TABLA 1. Incidencia de los síntomas locales y generales esperados en adultos jóvenes entre 18 y 20 años, vacunados con vax-TyVi[®], TYPHIM Vi™ y vax-TET[®]

Síntomas y signos	vax-TyVi [®] (N = 145)		TYPHIM Vi™ (N = 129)		vax-TET [®] (N = 123)	
	n	%	n	%	n	%
Enrojecimiento	17	11,72	12	9,30	13	10,57
Induración	21	14,48	19	14,73	31	25,20
Dolor	100	68,97	90	69,77	98	79,67
Malestar general	38	26,21	30	23,26	35	28,46
Cefalea	32	22,07	24	18,60	30	24,39
Fiebre ³ 38 °C	3	2,07	2	1,55	2	1,63

N: número total de sujetos con registro diario, n: número de sujetos con el síntoma reportado, %: porcentaje de sujetos con el síntoma reportado.

TABLA 2. Media geométrica, intervalos de confianza 95 % y seroconversión en adultos jóvenes entre 18 y 20 años, vacunados con vax-TyVi[®], TYPHIM Vi™ y vax-TET[®]

Grupo	n	TMG (IC 95 %) U/mL		% Seroconversión (IC 95 %)
		T0	T1	
vax-TyVi [®]	122	0,64 (0,52 – 0,79)	7,41 (5,92 – 9,27)	81,97 (74,20 – 87,78)
TYPHIM Vi™	103	0,90 (0,72 – 1,13)	5,41 (4,35 – 6,72)	65,05 (55,45 – 73,56)
vax-TET [®]	98	0,97 (0,79 – 1,18)	0,95 (0,78 – 1,16)	0,00 (0,00 – 3,77)

TMG: títulos medios geométricos de anticuerpos antipolisacárido Vi, IC 95 %: intervalos de confianza 95 %, T0: muestra prevacunación, T1: muestra a 21 d posvacunación.

Se evaluó la inmunogenicidad en aquellas muestras útiles para el laboratorio, correspondientes a 323. A pesar de la aleatorización de los grupos, estos no fueron homogéneos, porque el grupo asignado para la vacuna vax-TyVi^â presentó niveles menores de anticuerpos ($p = 0,0280$).

Se detectó una seroconversión superior con vax-TyVi[®] (81,97 %), con respecto a la alcanzada con TYPHIM ViTM (65,05 %) ($p = 0,0040$). Al analizar la actividad de anticuerpos antipolisacáridos Vi inducida por la vacunación, se observó que la respuesta inducida por vax-TyVi^â fue ligeramente superior; 7,41 U/mL vs. 5,41 U/mL ($p = 0,0490$) (tabla 2). Tanto la seroconversión como los niveles de anticuerpos inducidos por ambas vacunas polisacáridicas, fueron significativamente superiores con respecto al grupo control inmunizado con toxoide tetánico ($p = 0,0000$).

DISCUSIÓN

El uso de vacunas de células completas inactivadas de *Salmonella typhi*, se ha mantenido como la principal alternativa para los países en desarrollo, a pesar de las nuevas vacunas desarrolladas en los últimos años, entre ellas las constituidas por polisacárido Vi purificado, cuya seguridad, inmunogenicidad y eficacia, han sido bien establecidas en diferentes estudios.^{1,2,4-7,9} Esta limitación se debe principalmente a su mayor costo, las producciones locales de las vacunas de células completas y la resistencia inherente al cambio.^{2,7} El Instituto Finlay ha desarrollado una vacuna de polisacárido Vi de bajo costo, que se introdujo en el Programa Nacional de Inmunización del año 2002. A pesar de ser una vacuna de molécula definida, se desarrollaron los estudios clínicos pertinentes para establecer su seguridad e inmunogenicidad con respecto a la vacuna de referencia TYPHIM ViTM (Pasteur-Mérieux).

Los resultados de este estudio han demostrado que la reactogenicidad de vax-TyVi^â y TYPHIM ViTM fue similar, tal y como era de esperar, e inferior con respecto a la vacuna control de toxoide tetánico, resultados que concuerdan con reportes previos sobre las pequeñas tasas de reacciones sistémicas y locales después de la inmunización con polisacárido Vi de *Salmonella typhi*^{1,2,4,5,7,9}.

La seroconversión, así como los TMG, fueron superiores en el grupo vacunado con vax-TyVi^â, lo que pudiera interpretarse como una mayor inmunogenicidad de la vacuna en estudio. Se observó, no obstante, que no existió homogeneidad entre la inmunidad prevacunal, y resultó inferior en el grupo que fue inmunizado con vax-TyVi^â. En las condiciones en que fue diseñado y conducido el ensayo este hecho solo puede ser atribuido al azar. Esta circunstancia pudiera explicar la aparente mejor respuesta, porque en estas condiciones se evidencia con mayor claridad el incremento de los títulos, sin embargo, no explica satisfactoriamente los superiores TMG, pues los títulos prevacunales no son lo suficientemente altos como para explicar la reducción de la inmunogenicidad mediante neutralización; por otra parte, existen reportes de respuesta anamnésica en aquellos casos con elevados niveles de anticuerpos antipolisacárido Vi iniciales.⁷ Contrastando con estos resultados, otro estudio similar llevado a cabo en niños (Ochoa y otros, Vaccine, en prensa) demostró que tanto la seroconversión, así como los TMG fueron similares en ambas vacunas polisacáridicas.

Con la vacuna utilizada como comparador activo (TYPHIM ViTM) y empleando los mismos criterios, se han desarrollado diferentes ensayos clínicos, los cuales muestran valores que abarcan entre 62,5 y 96,3 %, ^{1-5,7,9} por ello los autores de este trabajo consideran que TYPHIM ViTM se comportó de forma similar a como lo hace cuando ha sido aplicada en áreas endémicas de fiebre tifoidea.

La inmunización contra la fiebre tifoidea es el elemento clave para el control de esta enfermedad, sobre todo en los países en vías de desarrollo con deficiencias en su infraestructura sanitaria. Los ensayos clínicos desarrollados con vax-TyVi^â demuestran que es segura, poco reactogénica y de elevada inmunogenicidad.

SUMMARY

A randomized, controlled and double-blind study was conducted in young adults aged 18-20 aimed at evaluating the reactogenicity and immunogenicity of vax-TyVi[®], a vaccine of polysaccharide Vi from *Salmonella typhi*. They were distributed into 3 groups: immunized with a dose of Vax-TyVi[®] (Finlay Institute), TYPHIM ViTM (Pasteur-Mérieux) or vax-TET[®] (tetanic toxoid). Serum samples were taken before and 21 days after immunization. The

immunogenicity was evaluated in 323 volunteers by an indirect ELISA. The seroconversion of those receiving vax-TyVi® was 81.97 % and 65.05 % for TYPHIM Vi™. The postvaccine mean geometric titers were 7.41 U/mL (5.92-9.27 U/mL) and 5.41 U/mL (4.35-6.72 U/mL), respectively. The seroconversion with vax-TET® was 0 %. The reactogenicity of both polysaccharide vaccines was low. It was concluded that the immunogenicity of vax-TyVi® was not lower than that of TYPHIM Vi™ and that its reactogenicity was similar.

Subject headings: TYPHOID; CLINICAL TRIALS; POLYSACCHARIDES; TYPHOID-PARATYPHOID VACCINES; SALMONELLA TYPHI.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fanning WL. Typhim Vi™ Vaccine J Travel Med 1997;4:32-7.
- Plotkin SA, Bouveret-Le Cam N. A new typhoid vaccine composed of the Vi capsular Polysaccharide. Arch Intern Med 1995;155:2293-99.
- Keddy KH, Klugman KP, Hansford FC, Blondeau C, Bouveret-Le Cam N. Persistence of antibodies to the *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine in South African school children ten years after immunization. Vaccine 1999;17:110-3.
- Acharya IL, Lowe CH, Thapa R, Gurubacharya VL, Shrestha MB, Cadoz M, et al. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. N Engl J Med 1987;317:1101-4.
- Mirza NB, Wamola IA, Estambale BA, Mbithi E, Poillet M. Typhim Vi vaccine against typhoid fever: a clinical trial in Kenya. East Afr Med J 1995;72:162-4.
- Yang HH, Wu CG, Xie GZ, Gu QW, Wang BR, Wang LY, et al. Efficacy trial of Vi polysaccharide vaccine against typhoid fever in south western China. Bull World Health Organ 2001;79:625-31.
- Panchanatan V, Kumar S, Yeap W, Devi S, Ismail R, Sarijan S, et al. Comparison of safety and immunogenicity of a Vi polysaccharide typhoid vaccine with a whole-cell-killed vaccine in Malaysian Air Forces recruits. Bull World Health Organ 2001;79:811-7.
- Cryz SJ, Que JU, Levine MM, Wiedermann G, Kollaritsch H. Safety and immunogenicity of a live oral bivalent typhoid fever (*Salmonella typhi* Ty21a)-Cholera (*Vibrio cholerae* CVD 103-HgR) vaccine in healthy adults. Infect Immun 1995;63:1336-9.
- Hessel L, Debois H, Fletcher M, Dumas R. Experience with *Salmonella typhi* capsular polysaccharide vaccine. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:609-20.
- Martínez I, Muñoz Y, Riverón L, Duarte M, Jones C, Lemercinier X, et al. Caracterización físico química del polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. VaccinMonitor 1999;8(5):6-12.
- Riverón L, Miranda A, Oramas J, Fernández A, Muñoz E, Gil P, et al. Escalado de producción de la vacuna cubana antitifoídica de polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. VaccinMonitor 1999;8(5):2-5.
- Martínez JC, Ochoa R, Estrada E, Riverón L, González M, Ferriol X et al. Validación de un ELISA para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas humanas antipolisacárido capsular de *Salmonella typhi*. VaccinMonitor 1999;8(8):7-10.
- Pérez A, Menéndez J, Baró M. Algunas consideraciones sobre la realización de ensayos clínicos de vacunas en humanos. VaccinMonitor 1999;8(4):9-12.
- World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Bull World Health Organ 2001;79:373-4.
- Ochoa R, Nerey M, Martínez JC. Use of poly-L-lysine precoating in an ELISA for the detection of antibodies against serogroup C *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide. Biotechnol Aplic 1999;16:173-5.
- Ochoa R. Sistemas ELISA para ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos. Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana: Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, Instituto Finlay; 2002.
- Blackwelder WC. Proving the Null Hypothesis in Clinical Trials. Controll Clin Trials 1982;3:345-53.
- Blackwelder WC. Showing a treatment is good because it is not bad: when does noninferiority imply effectiveness. Controll Clin Trials 2002;23:52-4.
- Wiens BL. Choosing an equivalence limit for noninferiority or equivalence studies. Controll Clin Trials 2002;23:2-14.

Recibido: 27 de marzo de 2003. Aprobado: 5 de mayo de 2003.
Dr. Rolando Felipe Ochoa Azze. Instituto Finlay. Avenida 212 No 3112 entre 31 y 37. La Coronela, municipio La Lisa. Ciudad de La Habana. Cuba. AP 16017. CP 11600. Teléf.: 2711046. Correo electrónico: ochoa@finlay.edu.cu