

Vax-TyVi : Vacuna Cubana de Polisacárido Vi de Salmonella typhi

Luis Riverón Martínez, Daniel Cardoso y colaboradores

Instituto Finlay, AP 16017, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 2086075; E-mail: lriverson@finlay.edu.cu

RESUMEN

La vacuna de células enteras inactivadas por calor y fenol, que se venía utilizando en Cuba desde el año 1983, es altamente reactogénica y ha mostrado poco impacto epidemiológico. Para sustituir esta vacuna se desarrolló una tecnología de una vacuna de Polisacárido Vi de nueva generación competitiva con las existentes en el mercado internacional. La tecnología desarrollada se caracteriza por un nuevo medio de cultivo que maximiza los rendimientos de polisacárido y el método de purificación del mismo, que forman parte del conocimiento práctico de la tecnología propuesta. Se caracterizó el proceso a escala de laboratorio, así como la calidad del Polisacárido Vi obtenido y se escaló hasta nivel productivo. El Polisacárido Vi producido a escala productiva así como la vacuna final fueron estudiados, tanto en el Instituto Finlay como en colaboración con el National Institute for Biological Standards and Control del Reino Unido, donde se demostró que era similar al de referencia. Para la cuantificación del Polisacárido Vi se montó, estandarizó y validó un sistema ELISA de inhibición, no reportado para estos fines. Se obtuvo una vacuna de nueva generación adecuada para su aplicación en Cuba y su comercialización y se dejaron sentadas las bases para una nueva generación de vacunas combinadas antidiarreicas. El producto fue ensayado en un estudio clínico de homologación y no mostró diferencias con el de la compañía Aventis Pasteur, con estos resultados se obtuvo la aprobación del Registro Médico Sanitario. Se han producido un total de 900 000 dosis las cuales se están distribuyendo para la red nacional de vacunación.

Introducción

La fiebre tifoidea es una enfermedad distribuida mundialmente, que es mucho más frecuente en los países subdesarrollados. La Organización Mundial de la Salud estima que en todo el mundo existen aproximadamente 16 millones de casos de fiebre tifoidea clínica anualmente y muchas infecciones subclínicas. Esto causa aproximadamente 600,000 muertes cada año en todo el mundo (Tabla 1).

La OMS recomienda la inmunización de los niños en edad escolar y los adultos jóvenes en aquellas áreas donde la fiebre tifoidea suponga un problema de salud pública para estos grupos de edad, y en particular cuando sean prevalentes las cepas de *S. typhi* resistentes a los antibióticos. El Comité Consultor sobre Prácticas de Vacunación (ACIP), indica la vacunación contra la fiebre tifoidea para:

- Viajeros a áreas en donde exista un riesgo reconocido de exposición a *S. Typhi*.
- Personas con exposición cercana (ejemplo, contacto en casa) a portadores de *S. typhi* documentados.
- Técnicos en microbiología que trabajan frecuentemente con *S. typhi*.

Las vacunas antitifoídicas más modernas son las orales a partir de cepas vivas atenuadas (ej. Ty21a) y la parental químicamente definida de Polisacárido capsular Vi de la cepa *Salmonella typhi* Ty-2, que es

un homopolímero lineal del ácido 1-4 N- acetil- a-D galactosaminurónico, O-acetilado parcialmente en el carbono No 3, polisacárido que es un antígeno protectogénico y relevante de esta bacteria.

En Cuba, se ha venido aplicando en el Programa Nacional de Inmunizaciones una vacuna de células enteras inactivadas a escolares en 5°, 8° y 11 grados; a la población de riesgo y para el control de brotes epidémicos. Esta vacuna ha resultado altamente reactogénica y ha tenido poco impacto epidemiológico (Informe de Trabajo del Comité Asesor de Inmunizaciones, MINSAP).

La vacuna de Polisacárido Vi disponible en el mercado es producida por transnacionales (Aventis Pasteur y Glaxo-Smith Klein) y la información relevante de la tecnología de producción de dicha vacuna está protegida por secreto tecnológico no disponible en la literatura especializada, por otra parte el precio de cada dosis de esta vacuna esta actualmente a 5 y 8 USD. Para sustituir la vacuna inactivada actualmente en uso y evitar la dependencia de la compra de la de Aventis Pasteur de alto costo se hizo necesario el desarrollo de una tecnología que garantizara la obtención de una vacuna de Polisacárido Vi de nueva generación.

Sin dudas, la disponibilidad de una tecnología para la producción de una vacuna antitifoídica químicamente definida y altamente purificada representa, por un lado, un salto de calidad en el sistema de salud cubano y por otro se cuenta con un nuevo rubro exportable de gran demanda mundial.

La vacuna de polisacárido Vi de *S. typhi* presenta varias ventajas: provoca escasas reacciones adversas, muy similares a las producidas por otras vacunas de polisacáridos purificados, el empleo de una sola dosis logra tanta protección como dos de la vacuna celular inactivada y tres o cuatro de la vacuna oral de cepa atenuada Ty21a y la existencia de métodos fisicoquímicos verificados en otras vacunas

Tabla 1. Cifras estimadas de casos y muertes por fiebre tifoidea

| | Total de casos | Incidencia (por 10 ⁵ /año) | Muertes |
|----------------------|----------------|---------------------------------------|---------|
| África | 2,655,000 | 500 | 130,000 |
| Asia | 13,310,000 | 500 | 440,000 |
| Latinoamérica | 595,500 | 150 | 10,000 |
| Oceanía | 7,500 | 150 | 124 |
| Europa /Norteamérica | 22,620 | 2 | 74 |

polisacáridas que permiten su obtención y control de forma segura y estandarizada. Todo esto unido a su alta estabilidad a temperatura ambiente la convierten en una variable muy favorable para productores y consumidores.

El Instituto Finlay ha desarrollado una vacuna de polisacárido Vi de bajo costo. vax-TyVi, que demostró ser segura, eficaz y de elevada inmunogenicidad al ser comparada con TYPHIM ViTM, de Aventis Pasteur y que ha sido introducida en el Programa Nacional de Inmunización durante el año 2002. Hasta el momento se han producido 900 000 dosis de vacuna de *S. typhi* para la distribución en la red nacional de vacunación.

Objetivos Generales

- Desarrollar una vacuna antitifoídica de subunidades a partir del Polisacárido Vi de *S. typhi*, que sea de calidad, al menos similar a las que se encuentran en el mercado, cumpliendo con todas las exigencias reguladoras internacionales establecidas para este producto; para sustituir la vacuna de células enteras que se viene utilizando en el Programa Nacional de Inmunizaciones.
- Desarrollar una tecnología para la obtención del Polisacárido Vi a partir de un cultivo de *S. typhi*.
- Diseñar, estandarizar y validar un método inmunológico cuantitativo para la determinación de la concentración de polisacárido en la vacuna final.
- Desarrollar un modelo animal más sensible a *S. typhi* para ser empleado en la evaluación de éste u otros preparados vacunales anti *S. typhi*.
- Evaluar clínicamente el preparado vacunal obteniendo comparándolo con los existentes en el mercado.
- Obtener el Registro Médico Sanitario.
- Garantizar las cantidades de vacuna necesarias para el Programa Nacional de Inmunizaciones de nuestro país, así como necesidades de exportaciones.

Resultados de importancia

Etapa de investigación

Se obtuvo un medio de cultivo que maximiza la producción de Polisacárido Vi para la cepa vacunal. Además, se modificó el método de Fenol en frío para la purificación del polisacárido para obtener mayores rendimientos cumpliendo con las exigencias reguladoras establecidas.

Se montó toda la batería de análisis necesaria para la evaluación del producto final, así como se diseñó, montó un sistema de ELISA de inhibición para cuantificar el polisacárido Vi en la vacuna final, método no publicado antes por ningún investigador o productor.

También se desarrolló de un modelo animal más sensible y adecuado para evaluar preparados vacunales antitifoídicos.

Etapa de Desarrollo y Producción

Se realizaron los ajustes necesarios para la introducción de esta investigación como producción rutinaria que fundamentalmente fueron la simplificación de las etapas de microbiología y propagación, los procesos fermentativos se realizaron utilizando cultivo sumergido con tabiques en lugar de superficial,

se incluyó la microfiltración tangencial para la concentración y lavado de las células y se utilizó el secado al vacío como etapa final de procesamiento. La tecnología de producción del polisacárido se extracta en la Tabla 2. Durante esta etapa se evaluaron 16 fermentaciones a escala piloto (35 L), 7 fermentaciones a escala industrial (200 L) y 5 fermentaciones a escala de 500 L. Los rendimientos obtenidos para las mismas fueron de $7,11 \pm 3,1$; $7,59 \pm 3,02$ y $5,94 \pm 1,98$ mg polisacárido Vi/L de cultivo respectivamente, los cuales representan rendimientos superiores a los reportados en la literatura (1,6 mg/L). Los lotes obtenidos en las diferentes escalas pasaron satisfactoriamente los requerimientos de calidad planteados por la OMS para este producto y los mismos fueron avalados por el Instituto de Evaluación y Control de Estándares y Biológicos de Inglaterra (NIBSC). El producto fue ensayado en un ensayo clínico de homologación con el de la compañía Aventis Pasteur.

Formulación de la vacuna final y evaluación clínica

Se formuló un producto conteniendo 25 mg de polisacárido Vi / dosis de 0,5 mL. Los excipientes empleados incluyeron una solución tampón isotónica que garantizó condiciones fisiológicas adecuadas, con respecto a pH un valor de 6,5 – 7,5 en el producto final y la literatura refiere la gran estabilidad de esta vacuna a pH entre 6,0 – 7,8 y contenido iónico. Como agente antimicrobiano se usó Fenol (€) 1,250 mg/ dosis.

Este preparado se evaluó en voluntarios demostrando la seguridad de la misma, la ausencia de reacciones adversas serias a la concentración estudiada e inmunogenicidad. El estudio mostró equivalencia entre esta vacuna y la vacuna comercial de Aventis Pasteur tanto para el parámetro inmunogenicidad como reactogenicidad, lo cual indica la calidad de la preparación. La inmunogenicidad se evaluó en 335 niños y 323 adultos. La seroconversión de los niños que recibieron vax-TyVi fue 85,61 % y 78,36 % para TYPHIM ViTM. En adultos fue 81,97 % y 65,05 % en cada caso. Los TMG posvacunales en niños fueron 4,18 U/mL y 3,98 U/mL. En adultos, 7,41 U/mL y 5,41 U/mL. El IC 95 % en los niños abarcó de 3,60–4,92 U/mL con vax-TyVi y de 3,34–4,73 U/mL con TYPHIM ViTM. En adultos de 5,92–9,27 U/mL y de 4,35–6,72 U/mL respectivamente. En contraste, la seroconversión con vax-TET fue 0 %. La inmunogenicidad de vax-TyVi no fue inferior a la de TYPHIM ViTM y su reactogenicidad resultó similar.

Tabla 2. Tecnología de producción de polisacárido Vi de *S. typhi*.

| Tecnología |
|-------------------------------|
| Obtención del lote de trabajo |
| Microbiología |
| Fermentación |
| Semi-purificación |
| Purificación |

Como etapa final de trabajo a escala productiva (200 L) se produjeron un total de 900 000 dosis de este componente que se esta distribuyendo para la red nacional.

Aspectos novedosos

Esta investigación surgió como un interés especial del Ministerio de Salud Pública, por recomendación del Comité Asesor en Prácticas de Inmunización del MINSAP, y como un pedido al Instituto Finlay al comprobarse la relativamente alta reactogenicidad y bajo impacto de la vacuna antitifoídica de células enteras inactivadas actualmente en uso y lo inaccesible de los costos de las vacunas comerciables reconocidas. También quedó claro la necesidad epidemiológica del empleo y uso continuado de esta vacuna en Cuba y en amplias regiones del planeta.

La novedad científica de esta investigación – desarrollo se sustenta en que es la primera vez que se logra en el país y en la Región una tecnología para obtener una vacuna antitifoídica químicamente definida y de subunidades, eficaz, segura y que dicha tecnología contiene elementos novedosos que la diferencian del estado del arte especialmente en lo concerniente a:

- Medio de cultivo del microorganismo.
- Método de purificación del Polisacárido Vi.
- Métodos de evaluación del producto final.
- Desarrollo de un modelo animal más sensible y adecuado para evaluar preparados vacunales antitifoídicos.

- Otro mérito y a la vez novedad científico-tecnológica es el haber logrado llevar los resultados de esta investigación hasta la escala de planta industrial de vacunas y obtener resultados satisfactorios.

Conclusiones

- Se desarrolló una vacuna antitifoídica de subunidades a partir del Polisacárido Vi de *S. typhi* con una tecnología con características propias.
- Se diseñó e introdujo toda la batería de pruebas analíticas para el Control de la Calidad de la vacuna y el proceso tecnológico incluyendo un método inmunoquímico cuantitativo para la determinación de la concentración de polisacárido en la vacuna final.
- Se desarrolló un modelo animal más sensible a *S. typhi* para ser empleado en la evaluación de éste u otros preparados vacunales anti *S. typhi*.
- Se evaluó clínicamente el preparado vacunal obtenido comparándolo con el mejor existente en el mercado obteniéndose resultados satisfactorios.
- Se obtuvo el Registro Médico Sanitario. Registro No. 1773.
- Se garantizaron las cantidades de vacuna necesarias para el Programa Ampliado de Inmunizaciones de nuestro país, así como necesidades de exportaciones.