

# Estudio serológico y de protección en ratones utilizando diferentes esquemas y dosis de VA-MENGOC-BC®

Juan F. Infante<sup>1</sup>, Jorge E. Mayo<sup>1</sup>, Sergio Sifontes<sup>2</sup>, Esle Pedroso<sup>1</sup>, Enrique Muñoz<sup>1</sup>, Mildrey Fariñas<sup>1</sup>, Mercedes Gutiérrez<sup>1</sup>, Rolando Ochoa<sup>1</sup>, Juan C. Martínez<sup>1</sup>, Aida Annet<sup>1</sup>, María A. Camaraza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: jinfante@finlay.edu.cu

<sup>2</sup> Centro de Bioactivos Químicos Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba.

La alta incidencia mundial de meningitis meningocócica por *Neisseria meningitidis* serogrupo B (*N. meningitidis*) movilizó los recursos de la ciencia hacia su enfrentamiento en un período corto de tiempo. Para el estudio de esta enfermedad fue imprescindible desarrollar modelos experimentales que posibilitaran caracterizar no sólo la capacidad inmunogénica y protectora de los candidatos vacunales, sino también la toxigenicidad del producto. El estudio basado en el modelo ratón Balb/c con la utilización de factores estimulantes de la virulencia, permitió el desarrollo experimental de la enfermedad. Consistió en la aplicación de diferentes esquemas de dosis y diluciones de la vacuna (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) en solución salina fisiológica 0,85%. Se conformaron 15 grupos de ocho animales cada uno que previamente recibieron Dextrana Férrica (IMEFA) y mucina gástrica de cerdo 8% en un volumen total de 0,4 mL, y un grupo control al que le fue administrada la vacuna pura. Se empleó para el reto la cepa 385 de *N. meningitidis* con una concentración del inóculo de  $10^7$  UFC/mL. El esquema de vacunación contempló grupos vacunados con 1, 2, y 3 dosis a los 0,15 y 30 días. Se administraron 0,2 mL del inóculo de *N. meningitidis* por vía intraperitoneal. Se determinó la dosis letal media (DL50), anticuerpos bactericidas, respuesta serológica por el método de ELISA y se calculó la protección conferida. Se aplicó el método de Log rank para la comparación de los tiempos de sobrevivencia y para el ensayo de ELISA se aplicó el método de superficie ajustada por SPLINE. Hemos demostrado la utilidad del biomodelo ratón Balb/c para comprobar la eficacia de la vacuna VA-MENGOC-BC®. Quedó demostrada la correlación entre los niveles de anticuerpos y la protección conferida por la vacuna, comprobándose además por los ensayos de reto. Se logró obtener una aproximación con respecto a los límites de eficacia de VA-MENGOC-BC® mediante diluciones consecutivas del producto en la línea de ratones Balb/c.

**Palabras claves:** *Neisseria meningitidis* B, VA-MENGOC-BC®, ratón, protección.

## Introducción

*Neisseria meningitidis* es uno de los microorganismos que causan meningitis y es capaz de generar grandes epidemias. La patogénesis de esta enfermedad permanece desconocida. Sin embargo, se sabe que el microorganismo coloniza la nasofaringe por adherencia a las células columnares no ciliadas. Luego alcanza las células subepiteliales y finalmente el torrente sanguíneo donde, si sobrevive, puede causar bacteriemia y síntomas clínicos diferentes en dependencia de la inmunidad del hospedero. Los serogrupos A, B y C son los responsables del 90% de los casos.

A pesar de los extensos estudios realizados en décadas pasadas, los mecanismos responsables de la inmunidad natural contra el meningococo no resultan claros. La protección se ha correlacionado con la presencia de anticuerpos bactericidas, aunque se piensa que la respuesta inmune celular y la muerte de las bacterias por

fagocitosis deben desempeñar un importante papel en la defensa del hospedero (1).

Existen vacunas basadas en el polisacárido capsular contra los serogrupos A, C, W135 y Y, que ofrecen una buena, aunque relativamente corta protección contra sus respectivos serogrupos, pero ofrecen protección cruzada contra el serogrupo B. Para lograrlo se han explorado varios enfoques alternativos, incluyendo polisacáridos capsulares mejorados y preparaciones de proteínas de membrana externa, de expresión constitutiva o reguladas por hierro (2). Cuba cuenta con una vacuna antimeningocócica contra los serogrupos B y C que se considera como la más efectiva de la segunda generación de vacunas obtenidas a partir de proteínas de membrana externa.

A pesar de que no existe un modelo animal universalmente aceptado, que permita la estimación de la

potencia de protección de candidatos vacunales, los mejores resultados se han obtenido en ratones de líneas isogénicas (C57BL/6, Balb/c, CBA, etc.) tratados con sustancias que por desplazar el equilibrio resistencia del hospedero-virulencia del germen, a favor de la última, se les ha llamado factores estimuladores de la virulencia (FEV). Varias sustancias han sido utilizadas como FEV. En los laboratorios del Instituto Finlay se han obtenido los mejores resultados con una combinación de mucina-dextrana férrica. Estos resultados fueron satisfactorios con la utilización del biomodelo ratón, tanto en estudios de protección activa con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, como de protección pasiva con la inmunoglobulina antimeningocócica BC, a través de retos efectuados con *Neisseria meningitidis* (3,4).

El presente trabajo tuvo el propósito de realizar la evaluación de la eficacia de la vacuna VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> en ratones según un esquema de inmunización que contempla varias diluciones y la aplicación de una a tres dosis por la vía intramuscular, para tratar de correlacionar los resultados de los estudios serológicos con la protección frente a retos con el germen.

## Materiales y Métodos

Se emplearon ratones de la línea Balb/c procedentes del CENPALAB, con un peso de 18-22 g vivos y de 6-10 semanas de edad. Recibieron pienso especializado para ratones y agua acidulada (pH 2,5-2,8) "a libre demanda". Se mantuvieron en un régimen de iluminación de 12 h luz y 12 h de oscuridad. La temperatura ambiental fue de  $22 \pm 2$  °C y la humedad relativa de  $60 \pm 10\%$ . Tanto los animales como los alimentos estuvieron acompañados de sus correspondientes certificados higiénicos sanitarios.

Se realizaron diluciones seriadas a la vacuna VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) en solución salina fisiológica, conformando grupos de ocho animales a los que se les administraron estas diluciones, además de un grupo que recibió la vacuna pura, la concentración del inóculo para la realización del reto fue de  $10^7$  unidades formadoras de colonias por mL que fueron administradas según el diseño del experimento. El esquema de inmunización contempló grupos de animales vacunados con una, dos y tres dosis administradas a los 0,15 y 30 días y a animales que no fueron inmunizados.

Se empleó la cepa 385 de *Neisseria meningitidis* B (Ceparío Instituto Finlay, Ciudad Habana, Cuba). El cultivo se realizó en placa a partir de la cepa liofilizada en

sacarosa gelatina a 37 °C, en 5% CO<sub>2</sub>, durante 18-24 h. Las colonias formadas fueron inoculadas en 100 mL de caldo Müeller-Hinton ajustando la densidad óptica a 0,2, se mantuvo el cultivo en zaranda orbital a 170 rpm, y a 37 °C durante 6 h. Transcurrido este tiempo se realizaron tinciones de Gram y centrifugación del cultivo a 7000 rpm durante 10 min a una temperatura de 20 °C. El sobrenadante fue eliminado. Se resuspendió el pellet en 25 mL de PBS más gelatina al 1%. Espectrofotométricamente se ajustó a la concentración de  $10^{10}$  UFC/mL según curva previamente calibrada. A partir de esta se hicieron diluciones seriadas hasta obtener las concentraciones deseadas. Se administraron 0,2 mL del inóculo para el reto por vía intraperitoneal (IP) con jeringuillas desechables de 1 mL y agujas 23 G x 1.

**Determinaciones realizadas:** Dosis letal media (DL 50), determinación de anticuerpos bactericidas, determinación de la respuesta serológica por el método del ELISA (5), cálculo de la protección utilizando la fórmula  $P=100(1-Mt/Mc)$ , donde: Mt: Mortalidad de los tratados. Mc: Mortalidad de los controles.

Los animales se mantuvieron en observación después de terminada la inoculación, las muertes sucedidas durante las primeras 6 h se consideraron debidas a la técnica operatoria. Después se observaron los animales cada 12 h por espacio de una semana.

El protocolo del experimento y las condiciones de sacrificio y condiciones de los animales fueron sometidos a la consideración de la Comisión de Ética de nuestro Departamento. Se aplicó el método de Log-rank para la comparación de los tiempos de sobrevivencia, luego del tratamiento con cada una de las dosis. La extracción de sangre para serología se realizó por punción del plexo retroorbital. Los animales se sacrificaron por el método de dislocación cervical.

Para el análisis estadístico de los resultados del ELISA, según dosis y dilución vacunal, se aplicó el método de superficie ajustada por SPLINE. Se calculó el coeficiente de correlación de SPEARMAN (rs) para evaluar si mayores títulos de anticuerpos se correspondían con niveles de protección más altos.

Cálculo de la dosis letal media: Se registraron las muertes ocurridas hasta 72 h postinoculación y se determinó la mortalidad acumulada para cada dosis de germen. Con los puntos de dosis-mortalidad acumulada se buscó la curva de mejor ajuste al modelo de Emax

sigmoidea  $[Mort(\%) = \frac{100 \text{ dosis}^n}{DL50^n + \text{dosis}^n}]$  para obtener la DL50 directamente a partir de la ecuación de regresión.

obtenidos por ELISA. Todos los controles murieron con la dosis de reto aplicada ( $10^7$  UFC/mL) que aproximadamente se corresponde con cien veces la DL<sub>50</sub> determinada en el momento del reto (Tabla 2).

## Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la sobrevivencia, protección y título de anticuerpos

**Tabla 1. Resultados de la prueba de confrontación, protección y respuesta humoral en los grupos experimentales vacunados con varias diluciones de VA-MENGOC-BC® con dosis única y repetidas**

Dilución	Nº de dosis	Inóculo	Título de Ac	Mortalidad		Protección (%)
				N	%	
Vacuna Pura	1	$10^7$	3024.	2	25	75,0
	2	$10^7$	4290.	1	12,5	87,5
1/2	3	$10^7$	3978	3	37,5	62,5
	1	$10^7$	1743.	1	12,5	87,5
	2	$10^7$	2556.	5	62,5	37,5
1/4	3	$10^7$	696.	5	62,5	37,5
	1	$10^7$	2683.	3	37,5	62,5
	2	$10^7$	3104.	2	25,0	75,0
1/8	3	$10^7$	1722.	7	87,5	12,5
	1	$10^7$	2024.	5	62,5	37,5
	2	$10^7$	2176.	2	25,0	75,0
1/16	3	$10^7$	1344.	5	62,5	37,5
	1	$10^7$	1343.	6	75,0	25,0
	2	$10^7$	2357.	4	50,0	50,0
	3	$10^7$	941.	5	62,5	37,5

**Tabla 2. Resultados de la DL<sub>50</sub>**

Concentración de reto	Nº de animales	Muertos	Mortalidad %
$10^5$	10	6	60
$10^6$	10	8	80
$10^7$	10	10	100

Se realizó el análisis estadístico del tiempo de sobrevivencia mediante el test de Log-Rank, el cual no arrojó diferencias significativas para el caso de la vacuna pura aplicada en 1, 2 y 3 dosis ( $p > 0,1$ ). Una sola dosis de la vacuna diluida (1/2) difiere significativamente de la aplicada en dos y tres dosis ( $p < 0,05$ ), registrándose para una dosis el mayor tiempo de sobrevivencia (86 h). No se observaron diferencias significativas entre una y dos dosis de la vacuna diluida (1/4), aunque sí se observó diferencia significativa aplicando esta misma dilución, entre los esquemas de tres dosis y los de 1 y 2 dosis ( $p < 0,01$ ) a favor de los últimos. De esta forma se alcanzaron los mayores valores de tiempo de sobrevivencia en estos grupos: 69 horas con una dosis y 76 horas con dos dosis.

Para la vacuna diluida ocho veces el mayor valor del tiempo de sobrevivencia se obtuvo con la aplicación de dos dosis (76 h). Esta variante difiere de una forma moderadamente significativa ( $P=0,05$ ) del esquema de una y tres dosis (46 y 49 h, respectivamente).

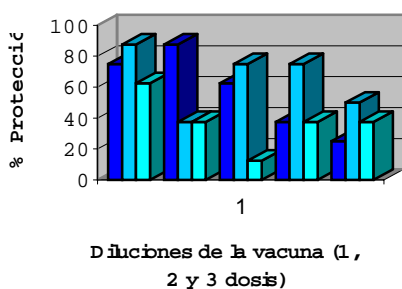
Para la mayor dilución vacunal, no se apreciaron diferencias significativas entre las dosis aplicadas. Los valores del tiempo de sobrevivencia, en general, fueron los más bajos que se registraron, correspondiendo con el principio dosis-respuesta. Analizando los resultados por dosis, se apreció que con una sola no se encuentran diferencias significativas en el tiempo de sobrevivencia de los animales inmunizados con la vacuna pura, en relación con los inmunizados con la vacuna 1/2 y 1/4 ( $p > 0,1$ ); sin embargo, sí se encontraron diferencias con las mayores diluciones (1/8 y 1/16). Los inmunizados con la vacuna 1/2 y con la vacuna 1/4 no difirieron estadísticamente entre ellos, pero sí de las diluciones subsiguientes. Entre las mayores diluciones (1/8 y 1/16) no se encontraron diferencias significativas.

Los animales inmunizados con dos dosis fueron los que registraron de forma general un mayor tiempo de sobrevivencia. La vacuna diluida 1/2 rindió un tiempo de sobrevivencia de 49 h y difirió estadísticamente de los valores alcanzados con la vacuna pura y con la vacuna 1/4. No se encontraron diferencias significativas entre la vacuna pura y las diluciones 1/4 y 1/8.

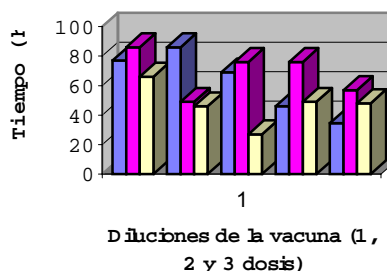
Los tiempos de sobrevivencia de los animales inmunizados con tres dosis evidenciaron que la vacuna

pura con esta dosificación produjo el valor más alto (66 h). Este valor no difirió significativamente del resto de las diluciones vacunales, excepto el de 1/4, ( $p < 0,05$ ). El tiempo de sobrevivencia de los animales está directamente relacionado con la protección conferida y de esta forma los niveles de protección se corresponden con el promedio de los valores individuales del tiempo de sobrevivencia alcanzados (Gráfico 1 y 2).

**Gráfico 1. Com portamiento de la protección**



**Gráfico 2. Comportamiento del tiempo de sobrevivencia**



Con los resultados del ELISA se ajustó una superficie de respuesta cuadrática en función del número de dosis empleada y el  $\log_2$  del inverso de la dilución vacunal. El ajuste obtenido fue moderadamente significativo ( $p < 0,08$ ). Del análisis puede apreciarse que la máxima respuesta se obtuvo con la vacuna sin diluir y con dos dosis. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman ( $r_s$ ) para evaluar si mayores títulos de anticuerpos se correspondían con niveles de protección más altos. La correlación observada fue positiva ( $r_s = 0,66015$ ), siendo este un valor estadísticamente muy significativo ( $p = 0,0074$ ).

Los títulos de anticuerpos obtenidos con la aplicación de la vacuna pura en una, dos y tres dosis fueron mayores que 3000, siendo los más altos en comparación con el resto de las combinaciones ensayadas. Los resultados del ensayo bactericida (Tabla 5) mostraron que en los animales inmunizados con la vacuna pura en una, dos y tres dosis se detectó la presencia de anticuerpos bactericidas. De los inmunizados con la vacuna 1/2 sólo aquellos a los que se les aplicó una sola dosis evidenciaron la presencia de estos anticuerpos. En los inmunizados con vacuna 1/4 aplicada en una y dos dosis se registró título y en el caso de la vacuna diluida ocho veces sólo se detectó respuesta en aquellos animales a los que se les aplicaron dos dosis. No se registró actividad bactericida, con independencia del número de dosis, en la mayor dilución vacunal.

La vacuna protegió en todas las variantes y combinaciones evaluadas, obteniendo un máximo de 87,5% y un mínimo de 12,5%; mientras que todos los controles murieron. Estos resultados demuestran el margen de protección que es capaz de conferir la vacuna VA-MENGOC-BC®, si se tiene en cuenta la alta dosis de reto y las diluciones empleadas de la vacuna. En los grupos inmunizados con la vacuna pura (5  $\mu\text{g}$  de proteínas + 5  $\mu\text{g}$  de polisacárido C), a pesar de no registrar diferencias significativas entre las dosis, desde el punto de vista biológico los animales tratados con dos dosis tuvieron un porcentaje de protección mayor. Estos resultados se corresponden con los experimentos llevados a cabo para la determinación de la eficacia de la vacuna frente a diferentes cepas del serogrupo B aisladas en América Latina, incluyendo una cepa circulante en Cuba (6).

La aplicación de dos dosis condujo a valores más altos de protección si se comparan con los obtenidos con una y tres dosis, incluso para la dilución más alta ensayada, lo que está de acuerdo con el principio de que las células B de memoria responden a concentraciones antigénicas bajas y que la formación de anticuerpos depende, no sólo de la dosis sino también del número de aplicaciones (7).

Los resultados de la protección conferida por la aplicación de tres dosis de las diferentes diluciones

vacunales, reflejan de forma general una disminución con relación a la aplicación de una y dos dosis. La tolerancia en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> puede resultar en una inhibición de la respuesta inmune humoral y mediada por células, debido a que estas células son elementos de control crítico en ambos tipos de respuesta a antígenos proteicos (8). En este sentido cuando se inmunizan monos varias veces por vía intramuscular con vesículas de la membrana externa de *N. meningitidis* se observa un aumento de los niveles de anticuerpos directamente proporcional al número de inmunizaciones (9).

Similares resultados han sido obtenidos empleando vacunas conjugadas de *N. meningitidis* serogrupo A, observándose incrementos de IgG en ratones y conejos (10). De igual modo empleando vacunas conjugadas que contienen proteínas de la membrana externa del microorganismo se ha obtenido respuesta de anticuerpos en ratones y monos verdes recién nacidos (11).

Aunque no hay diferencias significativas entre la vacuna pura, vacuna 1/2 y vacuna 1/4, la tendencia es a la disminución de la protección con la menor concentración antigénica; por otra parte, aunque se necesitan más estudios relacionados con la respuesta inmune celular y humoral, los resultados coinciden con el incremento de células formadoras de anticuerpos (12). En lo referente a la inmunidad mediada por células y teniendo en cuenta el ciclo vital de la especie ratón, se pudiera considerar que estos resultados fueron satisfactorios 21 días después de la última vacunación con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, comparables con los resultados obtenidos al estudiar la inmunidad celular en recién nacidos y niños después de una segunda dosis de esta vacuna (13).

Los niveles de protección se han correlacionado con la presencia de anticuerpos bactericidas (14). Los ensayos bactericidas se han establecido como la mejor prueba para determinar la capacidad protectora de antisueros específicos obtenidos frente a candidatos vacunales (15, 16, 17). Sin embargo, no se tiene certeza de hasta qué punto las condiciones experimentales *in vitro* reflejan los eventos que ocurren *in vivo*, ni si lo reportado por estos autores es aplicable a todos los serogrupos. La mayoría de los estudios se han focalizado en el papel que desempeña la actividad bactericida en la defensa del hospedero contra la enfermedad meningocócica y se hace necesario tener en cuenta el importante papel que pueden desempeñar los mecanismos de la respuesta inmune celular, así como los mecanismos fagocíticos que median la muerte del meningococo.

De acuerdo con los resultados de este experimento, existe correlación entre los anticuerpos y los niveles de protección alcanzados. En los animales inmunizados con

dos dosis de la vacuna pura, vacuna 1/4 y vacuna 1/8, se detectaron anticuerpos bactericidas y, al mismo tiempo, estos grupos tuvieron los niveles de protección más altos frente a la prueba de confrontación; lo que acentúa la importancia de la utilización de dos dosis en el esquema de vacunación.

## Referencias

1. Dlawer A, Ala`Aldeen A. Vaccines against *Neisseria meningitidis*: A post, present and future. *Biotecnología Aplicada*. 1996; 13:1-7.
2. Frasch C E, Tsai C M, Mocca L F. Outer membrane proteins of *Neisseria Meningitidis*: Structure and importance in meningococcal disease: *Clin Invest Med*. 1986; (9):101-107.
3. Infante JF, Sierra GV, Campa HC, Acosta A, Azahares E, Pérez V, Muñoz E, et al. Las Ratas SPF como modelo experimental para la enfermedad meningocócica y la evaluación de la efectividad de VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>. II. Estudio microbiológico e inmunológico. *VacciMonitor*. 1997; 6 (7):2-6.
4. Sifontes, R,S, Infante,BJ F, Capó V, Marrero O, Azahares E, Muñoz E, Sierra G, Campa C: Experimental infection by *Haemophilus influenzae* type b in inbred mice. *Arch Med Res*. 1996; 27(2):133-8.
5. Sotolongo P.F. *Aspectos teórico-Prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune*. Ciudad de la Habana: Ediones Finlay; 1995.
6. Sifontes RS, Infante BJJ, Pérez RP, Caro AE, Sierra GG, Campa HC. The hyperferremic mouse model for the evaluation of the effectiveness of VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> against *Neisseria meningitidis* B clinical isolates. *Arch Med Res*. 1997; 28(1):55-60.
7. Aleksakhnina N, Basnak`ian IA, Kolenko VM, Borovkova VM, Saraeva LV, Stukalova NV, et al. The antibody response of animals to a corpuscular meningococcal group B preparation with different methods of immunization. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 1992; (7-8):30-4.
8. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunidad frente a los microorganismos. En: *Inmunología Celular y Molecular*. 2<sup>da</sup> ed. España, Madrid: Interamericana Mc Graw Hill; 1995; 369-376.
9. Devi Sj, Zollinger WD, Snoy PJ, Tsai JY Costantini P, Norelli F, Rappuoli R, Frasch CE. Preclinical evaluation of group B *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli* K92 capsular polysaccharide- protein conjugate vaccines in juvenile rhesus monkey. *Infect. Immun*. 1997; 65(3):1045-52.
10. Gu XX, Tsai CM. Preparation, characterization, and immunogenicity of meningococcal lipooligosaccharide-derived oligosaccharide-protein conjugate. *Infect Immun*. 1993;61(5):1873-80.

11. Vella PP, Marburg S, Staub JM, Kniskern PJ, Miller W, Hagopian A *et al.* Immunogenicity of conjugate vaccines consisting of pneumococcal capsular polysaccharide types 6B, 14, 19F, and 23F and a meningococcal outer membrane protein complex *Infect Immun.* 1992; 60(12):4977-83.
12. Lastre M, Batista A, Sierra G, Pérez O. Cuantificación de células formadoras de IgG totales y específicas por ELISPOT en Balb/c durante la respuesta primaria a VA-MENGOC-BC. *VaccciMonitor.* 1995; 4(7):2-3.
13. Pérez O, Lastre M, Lapinet J, Pérez S, A Díaz O, M. Zayas VC, Batista A, Quintero P, Aguiar R F, Sánchez AJ, Sierra G. Inducement and duration of cellular response to VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> in babies and children. IV Latin American Congress of Immunology XII Mexican Congress of Immunology, 1996 March 3-7; Zacatecas, México.
14. Goldschneider I, Gotschlich E C. and Artenstein M S: Human Immunity to the meningococcus II. Developmen of natural immunity. *J. Exp. Med.* 1969; 129:1327-1348.
15. Lissolo L, Maitre Wilmotte C, Dumas P, Mignon M, Danve B, Quentin Millet MJ: Evaluation of Transferrin-binding protein 2 within the transferrin-binding protein complex as a potential antigen for future meningococcal vaccines. *Infect Immun.* 1995; 63(3):884-90.
16. Devi SJ, Karpas AB, Frasch CE: Binding diversity of monoclonal antibodies to alpha (2—8) polysialic acid conjugated to outer membrane vesicle via adipic acid dihydrazide: *FEMS. Immunol Med Microbiol.* 1996;14(4):211-20.
17. Zollinger WD, Moran EE, Devi SJ, Frasch CE. Bactericidal antibody responses of juvenile rherus monkeys immunized with group B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide-protein conjugate Vaccines. *Infect. Immun.* 1997;65(3):1053-60.

## Serological and Protection Study in Mice using different vaccination schemes and Doses of VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> Vaccine

### Abstract

The elevated world incidence of meningococcal meningitis due to *Neisseria meningitidis* B (*N. meningitidis*) has mobilized scientists in the search for a speedy solution to this problem. In order to study this disease, it is indispensable to develop experimental models which will enable the characterization of, not only the immunogenic and protective capability of vaccine candidates, but also the possible toxicity of the preparation. Consequently, a Balb/c mouse model was used, together with virulence stimulating factors, in order to achieve the experimental development of the disease. Different vaccine dose schedules and dilutions were used (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) in 0,85% physiologic saline solution. Fifteen groups of 8 animals each, which had previously received Ferric Dextran (IMEFA) and swine gastric mucin (8%) in a total volume of 0,4 mL and a control group which received the pure vaccine were formed. *N. meningitidis* Strain 385, was used for the challenge, with an inoculum concentration of 10<sup>7</sup> UFC/mL. The following vaccination schedule was observed: the groups of animals were vaccinated with 1, 2 and 3 doses on days: 0, 15 and 30. A total of 0,2 mL of the *N. meningitidis* inoculum was administered intraperitoneally. The half lethal dose (LD 50), bactericidal antibodies and serological response using an ELISA assay were determined and the protection conferred by the preparations were calculated. The Log rank method was used for comparing survival time. The SPLINE surface adjustment method was used in the case of the ELISA assay. The usefulness of the Balb/c mouse biomodel for comparing the efficacy of the VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> vaccine was demonstrated. The correlation between the different levels of antibodies and the protection conferred by the vaccine was demonstrated and verified by challenge assays. An approximation of the efficacy limit of VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> was obtained by means of consecutive dilutions of the product in the Balb/c mouse line.

**Keywords:** *Neisseria meningitidis* B, VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, mouse, protection.