

# Respuesta de anticuerpos inducidos por la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> frente a la cepa de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.19,15 en adolescentes después de 12 años de inmunizados

María A. Camaraza<sup>1</sup>, Isabel Martínez<sup>1</sup>, Rolando Ochoa<sup>1</sup>, Aida Arnet<sup>1</sup>, Franklin Sotolongo<sup>1</sup>, Dairis Hernández<sup>1</sup>, Iván Cuevas<sup>1</sup>, Antonio E. Pérez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P.11600. Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: camaraza@finlay.edu.cu

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK). Novia del Mediodía. Km. 6½. La Lisa. Ciudad de La Habana. Cuba

Se estudió la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> contra la cepa de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.19,15 mediante el Ensayo Bactericida del Suero (EBS) y ELISA de tipo indirecto, para medir anticuerpos contra vesículas de membrana externa (VME) de *N. meningitidis* B a 184 adolescentes de un politécnico de Ciego de Ávila que fueron inmunizados en campañas masivas 12 años antes. Se realizaron extracciones de sangre antes de aplicar la primera dosis (T<sub>0</sub>), 4 semanas después de ésta (T<sub>1</sub>) y 4 semanas después de la segunda dosis (T<sub>2</sub>). Transcurridos 12 años de esta vacunación el 42% de los adolescentes presentó títulos bactericidas  $\geq 1:4$  frente a la cepa homóloga (B:4:P1.19,15) y el 98% mostró anticuerpos detectables contra las VME. En el EBS; el porcentaje de seroconversión T<sub>1</sub>/T<sub>0</sub> fue del 57% y T<sub>2</sub>/T<sub>0</sub> del 60%. Mediante ELISA la seroconversión fue del 59% y 54%, respectivamente, por lo que se demostró que la aplicación de una sola dosis después de 12 años indujo una respuesta inmune importante que puede sugerir una respuesta anamnésica.

**Palabras clave:** *Neisseria meningitidis*, enfermedad meningocócica, ensayo bactericida del suero, ELISA, memoria inmunológica, vacunas

## Introducción

*Neisseria meningitidis*, microorganismo gramnegativo capaz de causar meningitis y septicemia, a veces con shock séptico, constituye el agente etiológico de la enfermedad meningocócica (EM), entidad que se reconoce aún como una importante causa de morbimortalidad elevada en diferentes regiones del mundo (1, 2, 3). Entre los serogrupos de *N. meningitidis* reconocidos el A, B y C son los responsables del mayor número de casos de EM notificados en el mundo. Sin embargo, en los últimos años se ha asistido a un aumento creciente de los serogrupos Y y W135, en determinadas zonas geográficas (2, 4).

La quimioprofilaxis e inmunoprofilaxis son las dos estrategias principales empleadas para evitar los casos clínicos de EM, constituyendo la última de ellas el medio por excelencia para lograr este propósito (5). Debido a la carencia de una vacuna eficaz contra *N. meningitidis* B en el mundo y constituir la EM el principal problema de salud en Cuba durante la década del 80, entre los años 1982-1988, se desarrolló en nuestro país una vacuna antimeningocócica contra los serogrupos de *N. meningitidis* B y C (VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>) (6). En 1989 se registró y comenzó su aplicación en Cuba en forma de campaña; en 1991 se incorporó al Programa Nacional de Inmunización (PNI) y a partir de ese momento se aplica a toda la población infantil al cumplir los tres meses de edad (primera dosis) y a los 5 meses (segunda dosis) (7).

Se han realizado varios estudios para evaluar la respuesta inmune en personas vacunadas con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> (8, 9, 10, 11, 12) a través de las técnicas convencionales establecidas para dicho propósito (13). Sin embargo, existen pocas investigaciones que reflejan la respuesta anamnésica a esta vacuna (14). El Ensayo

Bactericida del Suero (EBS) está considerado como la “prueba de oro” para realizar los estudios de eficacia de las vacunas antimeningocócicas (15, 16), teniendo en cuenta que la presencia de anticuerpos bactericidas en el suero está relacionada con la aparición de la EM (17).

Para estudiar la respuesta inmune a VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> para esta investigación se seleccionó a un grupo de adolescentes pertenecientes a un politécnico de oficios de la provincia de Ciego de Ávila, una de las de mayor incidencia durante la epidemia de la EM en Cuba. Los alumnos que participaron en este estudio fueron inmunizados 12 años antes.

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la respuesta inmune que incluyó la memoria inmunológica, inducida por VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> en estos adolescentes, luego de aplicarles dos dosis de la vacuna cubana, transcurridos 12 años de haber recibido la primovacuna.

## Materiales y Métodos

### Diseño del trabajo

Se realizó un estudio no controlado, prospectivo, abierto para la evaluación de la inmunogenicidad de VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>.

### Características de la población estudiada

De un universo total de 523 adolescentes que estudiaban en un politécnico de oficios de la provincia de Ciego de Ávila, se seleccionó al azar la tercera parte de los alumnos de cada grupo. Para esta selección se tomó en cuenta que estos pertenecieran a los

mismos dormitorios y como los grupos no tenían un tamaño homogéneo, la muestra seleccionada fue de 184 estudiantes sanos, con edades comprendidas entre 15-18 años, inmunizados con VA-MENGOC-BC® 12 años antes de realizar este estudio. Previo a su ejecución, se tuvieron en cuenta las exigencias bioéticas regulatorias nacionales e internacionales.

### Esquema de vacunación

Se aplicó la vacuna antimeningocócica cubana (VA-MENGOC-BC®), siguiendo el esquema de inmunización establecido para este producto: dos dosis de 0,5 mL por vía intramuscular, con un intervalo de ocho semanas entre ambas dosis (6,7).

### Secuencia de la toma de muestras de sangre

Mediante el uso de jeringuillas estériles desechables de 10 mL, se realizaron tres extracciones de sangre por vía intravenosa: antes de aplicar la primera dosis (T<sub>0</sub>), 4 semanas después de ésta (T<sub>1</sub>) y 4 semanas después de la segunda dosis (T<sub>2</sub>). Todas las muestras de sangre se centrifugaron para la obtención del suero y éste se conservó en el Instituto Finlay a -20 °C hasta la realización del EBS y el ELISA.

### Cepa de *N. meningitidis* utilizada en el EBS

Se empleó la cepa homóloga de *N. meningitidis* B:4:P1.19,15 (CU385/83), perteneciente a la colección de cultivos del Instituto Finlay.

### Determinación de la respuesta inmune

**EBS:** Se aplicó el procedimiento descrito por Sotolongo y colaboradores (13), siguiendo la metodología del Centro para el Control de Enfermedades (CDC), Atlanta, Estados Unidos (18).

### Determinación de anticuerpos contra vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* B (VME B)

Se realizó mediante un ELISA de tipo indirecto, según el método desarrollado por Ferriol y colaboradores (19). Los resultados se expresaron en unidades de IgG por mililitro (U/mL), usando como referencia sueros estándares de anticuerpos IgG contra la VME B. Las muestras con valores de concentración por debajo del límite de detección (700 U/mL) se reportaron como la mitad de este valor (350 U/mL).

### Análisis estadístico

Se calculó la media geométrica (MG) y los intervalos de confianza al 95% (IC 95%), después de la transformación logarítmica de los valores de anticuerpos obtenidos en los tiempos estudiados. Se empleó el análisis de varianza para comparar la MG entre los grupos y la prueba exacta de Fisher para evaluar la diferencia entre los porcentajes de seroconversión. La seroconversión se definió como el aumento del título inicial en 4 o más diluciones ( $\geq 1:4$ ) de la respuesta inducida por la vacunación con respecto a la basal existente antes de inmunizar. La significación estadística para la comprobación o no de la hipótesis fue una  $p < 0,05$ .

## Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados de la actividad bactericida del suero medida por EBS, contra la cepa homóloga de *N. meningitidis* B:4:P1.19,15 y la concentración de anticuerpos medidos por ELISA, frente a las VME. Doce años después de la inmunización con VA-MENGOC-BC®, el 42% de los adolescentes presentó títulos de anticuerpos bactericidas  $\geq 1:4$  frente a la cepa homóloga y el 98% mostró una concentración de anticuerpos detectables contra las VME.

**Tabla 1. Actividad bactericida en el suero y concentración de anticuerpos contra *N. meningitidis* B:4:P1.19,15 en adolescentes vacunados con VA-MENGOC-BC® 12 años antes. Ciego de Ávila, 2000**

Ensayo	No	MG	IC	$\geq$ NC	%
EBS	184	4	3-5	78	42
ELISA	183	3158	2778-3590	179	98

**Leyenda:** MG = Media Geométrica; IC = Intervalo de Confianza al 95%; NC = Nivel de Corte. Para EBS títulos  $\geq 4$ . Para ELISA  $\geq 700$  U/mL

La Tabla 2 presenta los porcentajes de seroconversión mediante el EBS y ELISA, frente a la cepa B:4:P1.19,15. Por EBS, posterior a la primera dosis, el porcentaje de seroconversión fue del 57% y después de la segunda dosis de un 60%. Al evaluar los resultados de la muestra por ELISA la seroconversión correspondió a un 59% y 54% después de la primera y segunda dosis, respectivamente. Por ambos métodos no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los porcentajes de seroconversión obtenidos después de las dos dosis. Se demostró que la aplicación de una sola dosis de refuerzo después de 12 años indujo una respuesta inmune importante en este grupo de edad y puso en evidencia una respuesta anamnésica. En esta Tabla el número de muestras investigadas fue menor, pues en el momento de realizar los EBS y ELISA hubo sueros correspondientes a T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> que no pudieron ser evaluados.

**Tabla 2. Seroconversión frente a *N. meningitidis* B:4:P1.19,15 inducida por dos dosis de VA-MENGOC-BC® en adolescentes. Ciego de Ávila, 2000**

Ensayo	No	Relación			
		T <sub>1</sub> /T <sub>0</sub> ( $\geq 4$ )		T <sub>2</sub> /T <sub>0</sub> ( $\geq 4$ )	
		No.	%	No.	%
EBS	116	67*	57	71*	60
ELISA	114	67*	59	62*	54

**Leyenda:** T<sub>1</sub>/T<sub>0</sub>: Incremento en cuatro o más del título en el T<sub>1</sub>. Con respecto a T<sub>0</sub>; T<sub>2</sub>/T<sub>0</sub>: Incremento en cuatro o más del título en el T<sub>2</sub> Con respecto a T<sub>0</sub>

\*  $p > 0,05$

La Tabla 3 refleja la MG y los IC al 95% de la actividad bactericida sérica frente a la cepa B:4: P1.19,15 y de la concentración de anticuerpos contra las VME. Por ambos métodos no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>. Sin embargo, se observó diferencias ( $p < 0,05$ ) entre estos dos tiempos

con respecto a T<sub>0</sub>, resultante de la inmunización con VA-MENGOC-BC®.

**Tabla 3. Media geométrica e intervalos de confianza de la actividad bactericida contra la cepa B y del ELISA contra las VME, inducida por dos dosis de VA-MENGOC-BC® en adolescentes. Ciego de Ávila, 2000**

Tiempo	EBS B:4:P1.19,15			ELISA VME		
	No.	MG	IC	No.	MG	IC
T <sub>0</sub>	116	4	3 - 5	114	2824	2394 - 3331
T <sub>1</sub>	116	15	11 - 21	114	16064	13741 - 18780
T <sub>2</sub>	116	15	11 - 20	114	14387	12353 - 16755

**Leyenda:** MG = Media Geométrica; IC = Intervalo de Confianza al 95% para EBS

## Discusión

El haber encontrado un número elevado de adolescentes con actividad bactericida en el suero y una concentración de anticuerpos aceptable contra la cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.19,15, 12 años después de la inmunización con VA-MENGOC-BC®, pudiera atribuirse a que esta vacuna indujo una respuesta inmune de larga duración. Sin descartar que la inmunidad pudo reforzarse por el contacto con algunas bacterias que tienen alguna o ninguna relación taxonómica con *N. meningitidis*, pero por poseer en su estructura antigénica epítopes semejantes, pudieran inducir anticuerpos con reactividad cruzada contra este microorganismo (20).

El posible establecimiento de la memoria inmunológica por efecto de la vacunación con VA-MENGOC-BC® pudiera considerarse un elemento de protección, si tenemos en cuenta que los anticuerpos bactericidas estimulados en la respuesta inmune secundaria forman parte de los mecanismos de defensa contra la septicemia y meningocelitis causadas por *N. meningitidis* (21).

La reinmunización con una dosis de VA-MENGOC-BC® indujo una respuesta de anticuerpos significativa frente a la cepa vacunal, la cual no se modificó apreciablemente con la aplicación de la segunda dosis y pudiera sugerir una respuesta anamnésica. Costa y colaboradores (14) realizaron entre 1994 y 1995 un estudio de la respuesta anamnésica a VA-MENGOC-BC® en el Estado de Río de Janeiro, Brasil. En su investigación incluyeron niños de tres grupos de edades, vacunados cuatro años antes con esta vacuna. Mediante el EBS, después de la primera y segunda dosis, los porcentajes de seroconversión frente a la cepa B:4:P1.19,15 fueron del 59% y 65%, en los niños de 5-7 años respectivamente, del 64% y 75% en los de 8-10 años y del 63% y 86% en los de 11-13 años de edad. Mientras que por ELISA, los porcentajes de seroconversión obtenidos frente a esta cepa fueron: después de la primera y segunda dosis 82% y 95% en los niños de 5-7 años, 80% y 95% en los de 8-10 años y 68% y 81% en los de 11-13 años, respectivamente.

En 1994 Fernández y colaboradores (22) evaluaron la cinética de la respuesta de anticuerpos bactericidas frente a la cepa homóloga B:4:P1.19,15 y de la IgG específica contra la VME, en 220 adultos jóvenes pertenecientes a una escuela militar vacunados con VA-

MENGOC-BC®. El incremento en la actividad bactericida sérica y de la IgG anti VME se observó después de aplicar la segunda dosis. Los resultados obtenidos por Fernández y colaboradores son lógicos, pues en esa investigación, la primera dosis aplicada constituyó una primovacunación.

Respecto a otros estudios, el menor porcentaje de seroconversión alcanzado por ELISA en nuestra investigación (14, 23), pudiera deberse a los altos títulos iniciales, lo que incide en un menor incremento relativo de la respuesta.

Los niveles basales de anticuerpos funcionales detectados 12 años después de la vacunación con VA-MENGOC-BC® y la respuesta observada con la revacunación, indicio de memoria inmunológica, son característicos de los inmunógenos timodependientes, lo que avala positivamente esta vacuna.

## Referencias

- Janda WM, Knapp JS. *Neisseria* and *Moraxella catharralis*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 2003. Washington: ASM Press;2003:585-608.
- Manchanda V, Gupta S, Bhalla P. Meningococcal disease: History, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian J Med Microbiol* 2006;24:7-19.
- Trotter C, Samuelsson S, Perrocheau A, de Greeff S, de Melker H, Heuberger S et al. Ascertainment of meningococcal disease in Europe. *Euro Surveill* 2005;10:247-50.
- Vázquez JA. Situación actual de la epidemiología de la enfermedad meningocócica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24:14-18.
- Girard MP, Preziosi MP, Aguado MT, Kieny MP. A review of vaccine research and development: meningococcal disease. *Vaccine* 2006;24:4692-700.
- Sierra GV, Campa HC, Valcarcel NM, García IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: Protection trial and mass vaccination in Cuba. *NIPH Ann* 1991;14:195-10.
- Pérez A, Dickinson F. Resultados del Programa Nacional de inmunización antimeningocócica BC en menores de 1 año en Cuba. *Rev Cub Pediatría* 1998;70:133-40.
- Malberty JA, Sotolongo PF, Izquierdo L, Blanco R, Martínez OM, Galguera MA et al. Humoral immune response against C polysaccharide of *Neisseria meningitidis* elicited by VA-MENGOC-BC®. Preliminary results comparing children and adults from South American village. In: Conde Glez CJ, Morse SP, Rice, F, Sparling, Calderon E. *Pathobiology and Immunology of Neisseriaceae*. International Pathogenic *Neisseria* Conference. Cuernavaca, México; 1994:860-61.
- Requeira M, Palmeiro S, Gutiérrez M, Malberty A, Sotolongo F, García AM. Estudio de cepas de *Neisseria meningitidis* circulantes en la

- Argentina 1991-1993 y ensayo de sueros de vacunados con una vacuna antimeningocócica de origen cubano contra cepas de los diferentes serotipos y subtipos causantes de enfermedad. *Rev Hosp Niños Buenos Aires* 1994; XXXVI (158/159):242-46.
10. Sotolongo PF, Martínez OM, Camaraza MA, Gutiérrez M, Galguera MA, Izquierdo L et al. Bactericidal activity in sera from recipients vaccinated with VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> against strains of different serotypes and subtypes. In: Conde Glez CJ, Morse SP, Rice, F, Sparling, Calderon E. Pathobiology and Immunology of *Neisseriaceae*. International Pathogenic *Neisseria* Conference. Cuernavaca, México; 1994:916-20.
  11. Camaraza MA, Sotolongo PF, Arnet A, Izquierdo L, Campa HC, Leiva T et al. Respuesta de anticuerpos bactericidas a la vacunación con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> en niños afectados por el accidente nuclear de Chernobil. *Rev Chilena Pediatría* 1995;66:31.
  12. Echeverry ML, Malberty JA, Galeano ML, Sotolongo PF, Galguera MA, Montoya BC et al. Respuesta inmune humoral al polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C en un ensayo de vacunación antimeningocócica BC en Antioquia, Colombia. *Bol Oficina Sanit Panam* 1995;118:295-01
  13. Sotolongo PF. *Neisseria meningitidis*: Aspectos Teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. Serie Monográfica. Ciudad Habana, Ediciones Finlay, 1995.
  14. Costa E, Clein C, Malberty JA, Sotolongo PF, Casanueva V, Froes P et al. Respuesta anamnésica a VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> en niños vacunados en Río de Janeiro, Brasil. Congreso Internacional de Ciencias Básicas, Cuba; 1997.
  15. Aaberge IS, Oster P, Helland OS, Kristoffersen AC, Ypma E, Høiby EA et al. Serum bactericidal activity correlates with the vaccine efficacy of outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Clin Diag Laboratory Immunol*. 2005;12: 599-05.
  16. Borrow R, Balmer P, Millar E. Meningococcal surrogates of protection-serum bactericidal antibody activity. *Vaccine* 2005;23:2222-7.
  17. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 1969;129:1307-26.
  18. Kapezynski DR, Williams Db, Harakeh HS, Carlone GM. *Neisseria meningitidis* serogroup B. Bactericidal assay. Childhood and vaccine-preventable disease immunology section. Centre for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA, 1997.
  19. Ferriol X, García AM, Ochoa R, Bravo I, Blanco R, Estrada E et al. Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG humana anti proteína de la *Neisseria meningitidis* serogrupo B. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 1999;51(2):99-105
  20. Kasper DL, Winkelhale JL, Zollinger WD, Brant BL, Artenstein MS. Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* 07: K1(L):NM and group B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol*. 1973;110:262-8.
  21. Calain P. Serological study of meningococcal isolates in Switzerland and France, 1980-1986. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:788-91.
  22. Fernández JA, Malberty JA, Sotolongo PF, Bacallao GF, Camaraza MA, Nerey OM et al. Cinética de la respuesta de anticuerpos bactericidas y de la Igg específica en individuos vacunados con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1997;13:38-45.

## Response of antibodies induced by the Cuban meningococcal vaccine VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> against the strain of *Neisseria meningitidis* B:4:P1.19,15, in teenagers after 12 years of being immunized

### Abstract

The response of antibodies induced by the Cuban meningococcal vaccine VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> against the strain of *Neisseria meningitidis* B:4:P1.19,15 was studied by the Serum Bactericidal Assay (SBA) and indirect ELISA, to measure antibodies against outer membrane vesicles (OMV) of *N. meningitidis* B in 184 teenagers of a polytechnical school of Ciego de Ávila who were immunized in massive campaigns 12 years before. Blood extractions were carried out before applying the first dose (T<sub>0</sub>), 4 weeks after the first dose (T<sub>1</sub>) and 4 weeks after the second dose (T<sub>2</sub>). After 12 years of this vaccination, 42% of teenagers presented bactericidal titers  $\geq 1:4$  against the homologous strain (B:4:P1.19,15) and 98% showed detectable antibodies against the OMVs. In the SBA, seroconversion percentage T<sub>1</sub>/T<sub>0</sub> was 57% and T<sub>2</sub>/T<sub>0</sub> was 60%. By ELISA, seroconversion was 59% and 54%, respectively. It was demonstrated that application of only one dose after 12 years induced an important immune response which can suggest an anamnestic response.

**Keywords:** *Neisseria meningitidis*, meningococcal disease, serum bactericidal assay, ELISA, immunological memory, vaccines.