

Ensayo bactericida del suero para la evaluación de la respuesta inmune inducida por vacunas antimeningocócicas y anticoléricas

Bárbara Cedré,* Yaremis Hernández

Laboratorio de Bactericida, Vicepresidencia de Investigaciones. Instituto Finlay. Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, municipio Playa, La Habana, Cuba. AP 16017.

La susceptibilidad al sistema bactericida del suero es una característica de las bacterias gramnegativas. Existen muchos ejemplos en las enterobacterias, de hecho cualquier procariote que presente una membrana lipídica pudiera ser potencialmente susceptible a la lisis mediada por anticuerpos dependiente del complemento, aunque existen cepas que muestran resistencia al sistema bacteriolítico. Estas son frecuentemente aisladas como agente causal de infecciones que involucran daño tisular, lo que indica que la resistencia a la actividad lítica del suero es determinante de la virulencia en algunas infecciones debido a bacterias gramnegativas. Para algunas enfermedades causadas por estas bacterias la vacunación constituye la medida de prevención más efectiva, como es el caso del cólera y la enfermedad meningocócica. La inducción de anticuerpos con capacidad lítica, producto de la vacunación, se considera en muchos casos el mejor correlato con la protección y se estima que individuos que desarrollan anticuerpos bactericidas, ya sea por una infección clínica o por la vacunación, están protegidos contra la infección o la enfermedad. De ahí que el ensayo bactericida del suero sea la prueba de oro para evaluar la eficacia de muchas vacunas. Ensayos clínicos llevados a cabo con vacunas contra los serogrupos A, B, C, Y y W₁₃₅ de *N. meningitidis* y con vacunas de cólera, ya sean vivas atenuadas o inactivadas, han demostrado la inducción de anticuerpos con actividad lítica que luego han correlacionado con la protección en ensayos de eficacia o frente a un reto experimental. Por lo que resulta imprescindible la estandarización y validación de estos ensayos para su empleo como criterio de inmunogenicidad en el desarrollo de estas vacunas.

Palabras clave: Ensayo bactericida, vacunas, bacterias gramnegativas.

Introducción

La exposición de bacterias gramnegativas a concentraciones adecuadas de suero humano o de animales inmunizados conlleva a la pérdida de la viabilidad y a la disolución de las células bacterianas.

Existen muchos ejemplos bien documentados de que prácticamente todos los géneros de bacterias gramnegativas son susceptibles a la acción bacteriolítica de los anticuerpos y el complemento. Este fenómeno puede ser detectado *in vitro* mediante el ensayo bactericida del suero (EBS) (1).

La determinación de la actividad bactericida sérica involucra la exposición de una suspensión de organismos viables a una concentración adecuada de anticuerpos y complemento, la incubación a una temperatura óptima para la actividad del complemento y la determinación, después de un periodo de tiempo apropiado, de la concentración o el número de células sobrevivientes por algún método directo o indirecto.

El EBS ofrece una medida de la capacidad funcional de los anticuerpos, en conjunto con el complemento, para lisar bacterias. Un EBS exitoso se basa en crear las condiciones en las que el anticuerpo reconozca los antígenos expuestos en la superficie bacteriana y se una al complemento, lo que resulta en bacteriolisis y muerte del organismo diana.

El ensayo bactericida es una prueba serológica que puede ser usada en estudios epidemiológicos para confirmar casos sospechosos, en los que no es posible el aislamiento del germen y constituye una herramienta de uso obligado para evaluar la capacidad inmunogénica de algunas vacunas.

El propósito de este trabajo es realizar una compilación de datos relacionados con los ensayos bactericidas empleados para evaluar la respuesta inmune inducida por vacunas antimeningocócicas o vacunas contra el cólera que faciliten al lector el establecimiento, estandarización o validación de los mismos e, incluso, extrapolar estas consideraciones para el montaje de ensayos bactericidas, empleando como cepa blanco cualquier bacteria gramnegativa causante de enfermedades infecciosas para las cuales exista o se estén desarrollando vacunas.

Papel de los anticuerpos y el complemento

Las inmunoglobulinas son moléculas producidas por las células plasmáticas que derivan de los linfocitos B. Están estructuradas a partir de una unidad básica formada por dos cadenas pesadas y dos ligeras, unidas entre sí por enlaces disulfuro; tienen una región variable y una región constante. Esta dualidad estructural le confiere el carácter bifuncional que las caracteriza. Por la región variable, responsable de su especificidad, se combinan con el antígeno (Fab de "fragment

* Lic. en Microbiología, Dra. en Ciencias de la Salud, Investigador Auxiliar.

antigen binding”). La constante, denominada Fc, es la responsable de sus funciones biológicas, tales como unir componentes del sistema del complemento o facilitar la fagocitosis a través de la unión con receptores sobre este tipo de células (2).

Se considera que los isotipos IgG e IgM son los responsables de la actividad bactericida presente en el suero humano. Estos isotipos llevan a cabo su función activando la vía clásica del complemento que se inicia cuando el componente C1_q se une específicamente a la región constante (Fc) de un anticuerpo, unido a un antígeno de la superficie celular (3). Tanto por la vía clásica como por la alternativa, la activación del componente C3 inicia un sistema común con la formación de C5 convertasa y la progresiva activación de los factores C5, C6, C7, C8 y C9, hasta formar el complejo de ataque a la membrana (CAM), que tiene una estructura tubular transmembranal, lo que le permite anclarse a la membrana citoplasmática, produciéndole orificios que determinan el ingreso masivo de agua en la célula, la pérdida de los gradientes de concentración de iones y la salida de macromoléculas intracelulares, lo que trae como consecuencia la lisis celular (4).

Vibrio cholerae

V. cholerae es una bacteria gramnegativa, agente causal del cólera epidémico, enfermedad que se caracteriza por una diarrea acuosa incontrolada que puede llevar a la muerte en los casos no tratados y que se transmite por vía oral a través del agua y alimentos contaminados (5).

Se conocen más de 150 serogrupos de esta especie, en base a las características del polisacárido O del lipopolisacárido de la pared celular, siendo el O1 y el O139 los causantes de epidemias (6). Estos se clasifican a su vez en dos biotipos: Clásico y El Tor y cada uno de ellos en dos serotipos: Ogawa e Inaba. El biotipo El Tor, serotipo Ogawa, es el causante de la séptima y actual pandemia de cólera (7).

No todas las naciones con extensas comunidades rurales pueden lograr la infraestructura requerida o cambio en el comportamiento de los individuos para prevenir las epidemias de cólera. Para algunas comunidades, una simple dosis de vacuna que proteja contra el riesgo es el medio más eficaz para reducir la morbilidad y mortalidad (8).

Las vacunas modernas para prevenir el cólera, ya sean cepas inactivadas o vivas, son administradas por vía oral para estimular de manera óptima la respuesta inmune intestinal que es crítica para mediar la protección. Sin embargo, el mejor correlato de protección es el nivel de anticuerpos vibriocidas séricos (9).

Por muchos años la determinación de estos anticuerpos ha sido la medida estándar mediante la cual se ha comparado

la inmunogenicidad de diferentes candidatos vacunales, formulaciones, dosis y esquemas de inmunización.

Respuesta inmune contra *V. cholerae*

Estudios epidemiológicos en áreas endémicas indican que la infección por cólera produce una inmunidad protectora de larga duración contra un eventual ataque de esta enfermedad, caracterizada por altos niveles de IgA secretora antibacteriana, lo que se traduce en una efectiva respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal (10).

La medida directa de los anticuerpos en heces puede ser problemática debido a la degradación proteolítica de los mismos. La medición de IgA en los lavados intestinales, o por endoscopia pudiera ser más segura, pero estos métodos no son prácticos. Frecuentemente se miden marcadores sustitutos de la respuesta intestinal mediante el ensayo de células secretoras de anticuerpos o el ensayo de anticuerpos en sobrenadante de linfocitos, entre otros, los cuales tienen la ventaja de la presencia transitoria en la sangre periférica de linfocitos de mucosa activados, que se encuentran aproximadamente a la semana de la presentación del antígeno a nivel intestinal antes de retornar a las superficies mucosas (9, 10).

Sin embargo, estos ensayos tienen el inconveniente de que se requiere equipamiento costoso y un mayor tiempo para la lectura de los resultados, así como un mayor volumen de sangre, lo cual resulta inadecuado desde el punto de vista ético, fundamentalmente en ensayos con niños.

En las superficies mucosas predominan anticuerpos de clase IgA, probablemente formados localmente, pero también se detectan anticuerpos de clase IgG que quizás lleguen de forma pasiva desde el plasma (11). Aunque la IgA es la clase de inmunoglobulina predominante en la respuesta inmune mucosal, pudiera haber una significativa contribución a la exclusión inmune por parte de la IgG producida localmente o derivada del suero y transferida pasivamente al lumen. Los anticuerpos de clase IgG activan el complemento de forma eficiente, por lo que su contribución a la defensa es potencialmente proinflamatoria (12) y se ha demostrado en las heces de niños y adultos infectados con *V. cholerae* marcadores de la inflamación como la lactoferrina y otros (11, 13, 14).

Otro mecanismo de inducción de respuesta de gran importancia consiste en la migración de las células presentadoras de antígeno, especialmente las células dendríticas, hacia los nódulos linfáticos regionales donde pueden activar la respuesta inmune sistémica contra antígenos capturados en las mucosas. La respuesta inducida por esta vía, puede incluir la producción de anticuerpos IgG como resultado de la cooperación de los linfocitos Th con los linfocitos B en la periferia (15).

La respuesta vibriocida sérica ha sido bien estudiada y se ha demostrado que correlaciona con la protección. Esta respuesta de anticuerpos sistémica pudiera ser un marcador sustituto para la respuesta inmune mucosal a factores de colonización claves de este organismo, tal como el pili corregulado con la toxina (TCP) (5, 9).

Anticuerpos vibriocidas

La respuesta inmune antibacteriana inducida por la infección clínica o experimental con *V. cholerae* mejor caracterizada es la respuesta de anticuerpos vibriocidas, dirigida principalmente contra el antígeno O del LPS (16, 17). La determinación del título de anticuerpos vibriocidas mide la muerte de células de *V. cholerae* en presencia del suero inmune y complemento (acción bactericida) (18).

Aunque existen discrepancias acerca del papel de los anticuerpos vibriocidas séricos, también hay un consenso de que tales anticuerpos constituyen un marcador sustituto de la presencia de anticuerpos IgAs intestinales, teniendo en cuenta la no invasividad de este microorganismo y que por lo tanto la estimulación del sistema inmune ocurre a nivel de mucosa (9, 19).

Se ha demostrado que los anticuerpos vibriocidas correlacionan con la protección e interfieren con la colonización del *V. cholerae*; a medida que aumenta la respuesta vibriocida se obtiene una respuesta mucosal mayor (20-23).

Prueba vibriocida

La prueba realizada con mayor frecuencia para la determinación de anticuerpos contra *V. cholerae* es el ensayo vibriocida por medio de una microtécnica, ya que se puede realizar con una mínima cantidad de suero y tiene alta sensibilidad (24). La presencia de estos anticuerpos sirve como marcador de la secreción de anticuerpos IgA intestinales (22) y se considera la medida de la inmunogenicidad de las vacunas orales contra el cólera cualquiera que sea su variante (25).

Este ensayo se fundamenta en que al enfrentar una suspensión de vibrios vivos con anticuerpos específicos generados por una infección experimental o clínica y en presencia de una fuente de complemento exógeno, se produce la lisis celular, la cual puede ser detectada por diferentes métodos.

Las pruebas de anticuerpos vibriocidas pueden ser particularmente valiosas para identificar personas que no han tenido infección reciente por *V. cholerae*, con el fin de usarlas como testigos en los estudios epidemiológicos; determinar en las zonas sin cólera confirmado si los casos presuntivos que no tienen aislamiento del germen fueron de hecho infecciones por *V. cholerae*; determinar la proporción

de personas que han tenido infecciones por *V. cholerae* en las zonas recién afectadas y utilizar las muestras de suero almacenadas para determinar si el cólera ha pasado inadvertido en una zona en años anteriores (24).

El primer ensayo vibriocida fue realizado por Finkelstein, en 1962, en placas de agar, pero se discontinuó su uso debido a la intensa labor requerida y al tiempo que consumía este proceso. Después se desarrolló un ensayo en tubos, pero desafortunadamente este solo era capaz de evaluar un número muy limitado de muestras a la vez. Más tarde, Benenson, et al, 1968, introdujeron el ensayo en placas de microtitulación y este fue muy usado en la evaluación de la eficacia de las vacunas contra el cólera por constituir un marcador sustituto estándar debido a su buena correlación con la protección; además, es fácil de realizar: requiere de una mínima cantidad de suero, la lectura se realiza por observación visual y tiene una aceptable reproducibilidad y especificidad.

Este ensayo, a pesar de que ha sido ampliamente usado para evaluar la respuesta inmune contra la infección clínica o experimental con *V. cholerae*, presenta el inconveniente de que para su lectura es necesario un espejo invertido con una lámpara de luz externa y para una mayor confirmación de los resultados se requiere de la incubación de las placas a 4 °C toda la noche, para poder distinguir entre los pozos positivos y negativos (26).

Una modificación de este ensayo consiste en que al medio de cultivo que se añade para detener la reacción dependiente del complemento se le adiciona glucosa y un indicador de pH, el púrpura de bromocresol. Las bacterias sobrevivientes utilizan la glucosa en su metabolismo, producen ácido y tornan el indicador de pH de púrpura a amarillo, definiéndose el título como la mayor dilución del suero que causa inhibición completa del crecimiento bacteriano, dado por la invariabilidad del color del medio de cultivo (27).

Este ensayo puede ser leído en el mismo día por especialistas menos entrenados y se analizan un mayor número de muestras simultáneamente y con equipamiento mínimo. Por tanto, permite su aplicación en países del tercer mundo, principalmente en áreas rurales donde existe una alta prevalencia de la enfermedad.

Liang, et al, 2003, evaluaron la inmunogenicidad de la cepa atenuada IEM108 en ensayos en conejos inmunizados añadiendo cloruro de tetrazolium al 0,01% al medio LB, con incubación de las placas por 4-6 h. En este ensayo se demostró que la cepa fue capaz de inducir una fuerte respuesta vibriocida y una inmunidad protectora (23).

En ese mismo año, Boutonier publicó un trabajo semejante, donde introduce una modificación que hace la prueba más rápida y simple, añadiendo un cromógeno, cuya lectura se realiza por observación visual. Las sales de tetrazolium han

sido ampliamente usadas como indicador de la viabilidad de las células, incluyendo muchas especies bacterianas. Las bacterias con un sistema de transporte de electrones activos reducen este colorante de sales solubles en agua a un producto insoluble, donde la reducción es esencialmente irreversible (18).

La adición de determinados sustratos, como el succinato, estimula la actividad respiratoria, particularmente en sistemas donde el oxígeno está limitado, lo que ayuda a optimizar la reducción del tetrazolium. Un color violeta indica la presencia de bacterias vivas y la ausencia de coloración es indicativo de que los vibrios han sido lisados. Para una mayor confirmación las placas se leen a 570 nm, definiendo el título como la mayor dilución del suero que causa un 50% de la reducción de la DO, comparado con el control sin suero (28). Para determinar la relación precisa entre estos dos procedimientos de lectura (observación visual y espectrofotométrica) se plotearon los resultados de 32 muestras de suero humano y hubo una muy buena correlación entre ambas lecturas ($r = 0,99$). Este método simple y rápido permite evaluar múltiples muestras de suero simultáneamente (18).

Yang, et al, 2007, en Corea desarrollaron un ensayo en placas de agar acoplado a un sistema de conteo de colonias automatizado. Los autores plantean que se requiere un esfuerzo mínimo, pero requiere equipamiento costoso teniendo en cuenta la enfermedad de que se trata que afecta principalmente a países de extrema pobreza.

Este es un método que combina el ensayo en microplacas con otro basado en placas de agar acoplado a un sistema semiautomatizado de conteo de colonias que ha sido usado en el ensayo de opsonofagocitosis para la evaluación de vacunas de neumococo y también para la evaluación de vacunas contra *Neisseria meningitidis* en países del primer mundo.

Este sistema contiene dos componentes claves que son: el agar de recubrimiento que contiene el colorante cloruro de trifeníl tetrazolium, para teñir las colonias, y un contador de colonias automatizado para enumerar las colonias de manera eficiente. Después de la reacción antígeno-anticuerpo-complemento las placas se incuban 4 h y se lee la DO en un lector de microplacas a 600 nm.

Las diluciones se realizan en amortiguador fosfato salino (PBS) que contiene suero fetal bovino. Al final de la incubación se extraen 5 uL de cada pozo con una pipeta de ocho canales y se siembran en una placa cuadrada de agar infusión cerebro corazón (BHI). Una vez que la mezcla es absorbida en el agar la placa se cubre con otro agar que contiene el colorante y se incuban toda la noche a 37 °C. El título se define como la mayor dilución del suero que causa 50% de lisis bacteriana. Este método se usó para evaluar sueros de vietnamitas que habían sido inmunizados con la vacuna bivalente de los

serogrupos O1/O139, compuesta por células enteras muertas, en un ensayo clínico llevado a cabo en mayo-junio del 2005, con el objetivo de evaluar la eficacia contra el serogrupo O139 del que se conoce su resistencia a la actividad vibriocida, dado principalmente porque posee una cápsula polisacáridica que la protege de la acción del complemento. Por este motivo se ha venido trabajando en modificaciones que permitan evaluar la inmunogenicidad de vacunas de este serogrupo. Ambos ensayos (microplaca y semiautomatizado) produjeron similares resultados con alta correlación. Los títulos entre los dos métodos tuvieron una correlación de $r = 0,97$ y el coeficiente de regresión entre los métodos fue de $\beta = 1,266$. En cuanto a la seroconversión se obtuvo un 72% para el ensayo en microplaca y un 80% para el ensayo semiautomatizado, sin diferencias significativas (21).

Se conoce que no todos los laboratorios pueden tener acceso al sistema de conteo de colonias, por lo que el ensayo en microplacas, desarrollado por Benenson, ha sido el más ampliamente usado para la evaluación clínica de candidatos vacunales por sus múltiples ventajas.

Un uso importante que se ha dado a esta técnica es el referente a la evaluación de la respuesta inmune en animales de laboratorio inoculados con cepas de *V. cholerae* o inyectados con preparados vacunales y en sueros humanos de individuos vacunados, con el propósito de determinar la eficacia de la respuesta inmune. Los anticuerpos vibriocidas son el principal marcador de inmunidad descrito que es utilizado rutinariamente en estudios pilotos para evaluar la eficacia de una vacuna contra el cólera (29).

Factores que afectan el ensayo

Aunque existen diversos métodos para evaluar la actividad bactericida sérica, todos incluyen los tres componentes de la reacción: antígeno, anticuerpos y complemento.

El ensayo vibriocida puede fallar por varios elementos cruciales de la técnica. El control de calidad cuidadoso y el apego estricto al protocolo son esenciales para obtener resultados reproducibles. Con frecuencia se presentan problemas con la prueba en relación con los aspectos siguientes:

1. Carencia de cepas estándar de *V. cholerae* O1

En el caso de cólera, el principal antígeno involucrado en la actividad bactericida es el lipopolisacárido (LPS). En relación con este, *V. cholerae* se clasifica en los serotipos Inaba y Ogawa, atendiendo a la presencia de los determinantes antigénicos A y B presentes en el PS de la pared celular. Como antígeno en los ensayos vibriocidas se puede usar cualquier cepa de *V. cholerae* bien caracterizada, pero el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) recomienda usar las cepas VC12 Clásico Ogawa y VC13 Clásico Inaba,

con el fin de poder estandarizar los resultados de los diferentes laboratorios (24).

2. Procedencia, almacenamiento o dilución del complemento

Cualquier fuente de complemento es recomendable para este ensayo, siempre que no presenten propiedades bacteriolíticas intrínsecas. Algunos autores recomiendan que se use como fuente de complemento suero proveniente de la misma especie de las muestras que se evalúan, pero esto no es una condición determinante (24).

En el ensayo bactericida se usa un exceso de complemento que se añade a la reacción. Generalmente, se utiliza en este sistema una dilución del complemento de 1:5, ya que *V. cholerae* del serogrupo O1 resulta normalmente sensible a la acción lítica del complemento por no presentar cápsula en su pared celular.

Algunos autores recomiendan descomplementar las muestras de suero a evaluar para lograr una homogeneidad en cuanto a la cantidad de complemento presente y que solo participe en la reacción el complemento proveniente de vía exógena (21).

3. Preparación de la suspensión del antígeno

Otro parámetro que pudiera influir en los títulos de anticuerpos vibriocidas es la solución en la que se realizan las diluciones del suero y la preparación de la suspensión celular. Algunos autores han evaluado el impacto de variar el diluyente usado en el ensayo bactericida y han utilizado: medio de cultivo, PBS o solución salina al 0,85%, a la que se le ha adicionado iones de magnesio y suspensiones preparadas con cada una de estas soluciones, las que fueron igualmente sensibles a la lisis mediada por el complemento. Este aspecto no parece ser muy relevante en la reacción. Neoh y Rowley en 1970 utilizaron complemento de curiel diluido en peptona salina al 0,1% y Gangarosa, et al. en ese mismo año prepararon las diluciones del suero en tampón veronal salino con un pH 7,2, mientras que Benenson, Saad y Mosley en 1968, las realizaron en agua destilada estéril (26).

Neisseria meningitidis

Neisseria meningitidis es un diplococo encapsulado gramnegativo, perteneciente al género *Neisseria*. Es una bacteria extracelular, ya que es capaz de dividirse fuera de las células del hospedero. Su constitución antigénica es compleja, se clasifica en al menos 13 serogrupos diferentes de acuerdo con las diferencias estructurales, por lo tanto antigénicas, de sus polisacáridos capsulares, pero se consideran patógenos solo seis de ellos: A, B, C, Y, W₁₃₅ y X.

Los meningococos se clasifican también en serotipos y subtipos, según la reactividad inmunológica de las proteínas de membrana externa PorA y PorB; estas son porinas que

permiten el paso de iones a través de la membrana celular. Las proteínas de clase 5 (Opa y Opc) tienen un papel importante en la adhesión e invasión a las células del hospedero, al igual que los pili. Entre otras proteínas importantes en su patogenia se destacan varias relacionadas con la obtención del hierro del hospedero, lo que facilita su crecimiento. Las endotoxinas (lipopolisacáridos) de la membrana externa participan en la adherencia y colonización, así como en la patogénesis de la sepsis fulminante y de la meningitis (30).

Respuesta inmune contra *N. meningitidis*

La inmunidad humoral es la principal respuesta protectora contra *N. meningitidis*. La exposición a este agente infeccioso da por resultado la producción de anticuerpos dirigidos contra sus componentes inmunogénicos; también puede iniciar otras respuestas mediadas por linfocitos y macrófagos.

Los anticuerpos protectores incluyen los que facilitan la fagocitosis y la digestión intracelular de los microorganismos (opsoninas), fijan el complemento sérico para dañar cápsulas y membranas (lisinas) y previenen la adhesión a las superficies mucosas (antiadhesinas).

Los polisacáridos capsulares de las paredes celulares de *N. meningitidis* son prototipos de inmunógenos timoindependientes (Ti). Estos estimulan directamente las células B y la producción de anticuerpos de la clase IgM. Sin embargo, se producen otros isotipos de inmunoglobulinas, probablemente como resultado de la liberación de citocinas que promueven el cambio entre isotipos de cadenas pesadas. De ahí que la producción de anticuerpos IgG de la subclase IgG₂ caracterice la respuesta contra esos polisacáridos.

Estos inmunógenos se han denominado Ti-2 y se ha demostrado en modelos animales que la depleción completa de las células T afecta la respuesta de anticuerpos, por lo que no puede hablarse de timoindependencia absoluta, como si caracteriza a la respuesta contra los lipopolisacáridos.

Para los componentes timodependientes, tales como las proteínas estructurales, es característica la respuesta de células Th, estimuladas por antígenos peptídicos en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, previa fagocitosis de la bacteria y su procesamiento por las células presentadoras de antígeno (CPA).

La presentación antigénica de las células B a las células Th y la liberación de citocinas estimula varios mecanismos efectores, como la producción de anticuerpos de clase IgG, isotipo característico de la respuesta secundaria que opsonizan las bacterias y favorecen la fagocitosis; anticuerpos IgM e IgG que activan el complemento y llevan a la producción del CAM, de acción microbicida y a la liberación

de productos que son mediadores en la inflamación aguda y de opsoninas que promueven la fagocitosis.

La función lítica del CAM es muy importante en las infecciones por *Neisseria*. Por ejemplo, las deficiencias en los últimos componentes del complemento C5 al C8, están asociadas con una alta susceptibilidad a las infecciones por este microorganismo, pero menos con otras infecciones bacterianas.

Está demostrado que la presencia de anticuerpos bactericidas en el suero se relaciona con la protección contra la enfermedad meningocócica. Los anticuerpos IgA, presentes en el tracto respiratorio son muy importantes para prevenir la colonización de *N. meningitidis*. La IgA tiene poca importancia en la inmunidad humoral sistémica, pero desempeña un papel clave en la inmunidad de mucosa, debido a que puede ser selectivamente transportada a través de las mucosas, donde es capaz de inhibir la adhesión.

La función efectora de los linfocitos Th está mediada por citocinas que estimulan la secreción de anticuerpos, inducen inflamación local e incrementan la actividad fagocítica y microbicida. El interferón gamma y el factor de necrosis tumoral son las principales citocinas responsables de la activación de macrófagos y del proceso inflamatorio. Otras citocinas son importantes para la secreción y el cambio de clase de anticuerpos (30).

Anticuerpos bactericidas

La actividad bactericida del suero (ABS) se correlaciona en gran medida con la inmunidad contra la enfermedad meningocócica. Los anticuerpos circulantes y el complemento son los mecanismos de defensa más importantes del huésped. La gran susceptibilidad a las infecciones por meningococo de los individuos con defectos del complemento ilustra su importancia en la defensa del huésped contra este microorganismo. Las personas con estas alteraciones tienen un riesgo de cinco a diez mil veces mayor de padecer la enfermedad.

La función lítica del CAM es muy importante en las infecciones por *Neisseria*. Por ejemplo, las deficiencias en los últimos componentes del complemento, C5 al C8, están asociadas con una alta susceptibilidad a las infecciones por este microorganismo (31).

Ensayo bactericida del suero (EBS)

El ensayo bactericida en suero es considerado como la "prueba de oro" para evaluar la inmunogenicidad y la eficacia serológica de las vacunas contra *N. meningitidis*.

Numerosos procedimientos se han usado para evaluar la actividad bactericida sérica.

Los ensayos usados actualmente para la detección de anticuerpos bactericidas son trabajosos y la mayoría no están estandarizados. Sus dificultades radican, fundamentalmente, en lo engorroso del plaqueo y conteo de viables para la titulación. Estos factores, además de limitar el número de muestras a evaluar en un ensayo, le aportan un alto nivel de subjetividad a los resultados, ya que estos dependen completamente de la apreciación humana (32).

Con la intención de facilitar y optimizar la realización de este ensayo se han desarrollado nuevos protocolos. Por ejemplo, Kriz, et al. describieron en 1999 una modificación del microensayo bactericida tradicional usando cloruro de trifeniltetrazolio en solución, como indicador para visualizar los resultados. Mountzouros y Howell, 2000, describieron un EBS para el serogrupo B de *N. meningitidis*, basado en fluorescencia (33).

La introducción de un EBS que elimine las dificultades de los ensayos tradicionales y permita disminuir las diferencias entre laboratorios continúa siendo un problema a resolver para la investigación de vacunas contra *N. meningitidis*. Un EBS colorimétrico (EBSc) basado en la capacidad de *N. meningitidis* para consumir glucosa y producir ácido, tal como se describió anteriormente en el caso del ensayo vibriocida para *V. cholerae*, cuya lectura se realiza por observación visual, es otra opción para evadir el engorroso procedimiento de contar colonias, característico de los EBS tradicionales (34).

Factores que afectan el ensayo

Para evaluar la actividad funcional de los anticuerpos producidos en respuesta a las vacunas se requiere de un ensayo estandarizado, pues existen diversos factores que pueden afectar la reacción bactericida, como son:

1. La selección de la cepa blanco

Las cepas escogidas como blanco de la reacción del ensayo bactericida no deben tener múltiples pasos, con el fin de evitar la pérdida de la expresión de los antígenos más importantes involucrados en la reacción bactericida. Debe presentar homología con la cepa usada en la vacuna o circulante durante una epidemia. En este caso, se recomienda el uso de cepas específicas para la evaluación de vacunas a base de polisacáridos planos o conjugadas, como las que se relacionan a continuación: la cepa F8238 de serogrupo A, la cepa C11 de serogrupo C (35) y la cepa S4383 de serogrupo W₁₃₅ (36).

2. El medio y las condiciones de crecimiento

El cultivo del meningococo en caldo o en agar puede afectar la producción de cápsula o la expresión de diferentes proteínas de superficies, las cuales pueden afectar la susceptibilidad de las bacterias a la bacteriólisis mediada

por el anticuerpo dependiente de complemento. La naturaleza del medio y la fase de crecimiento en que son recogidas las bacterias pudieran influir en la respuesta del suero. Se ha observado en *E. coli* y en otras bacterias gramnegativas que son más susceptibles a la lisis cuando son recogidas en fase logarítmica que cuando son usadas en fase estacionaria. También existen evidencias de que *E. coli* es más susceptible en fase log cuando es cultivada en un medio simple de sales que en un medio más complejo. Las células cultivadas en un medio que contiene glicerol o acetato como fuente de carbono y energía son menos susceptibles que las crecidas en glucosa o succinato. Se plantea que esto puede pasar debido a la habilidad de las células para reparar la membrana celular dañada (32).

3. Número de células

Uno de los factores críticos en este ensayo es el número de células usadas como antígeno en la reacción, ya la sensibilidad de esta prueba depende de la densidad bacteriana (37). El ensayo bactericida se basa en una reacción antígeno-anticuerpo dependiente del complemento, por lo que debe haber una equivalencia entre el número de células que participan en la reacción y la cantidad de anticuerpos presentes en el suero.

Previamente se debe realizar un estudio para determinar la concentración óptima de trabajo para preparar la suspensión celular. Esto depende del tipo de microorganismo fundamentalmente. En el caso de bacterias que presentan cápsula en su pared celular, el número de células deberá ser menor que en el caso de las bacterias que no la presentan, debido al conocido efecto protector de la misma frente a la respuesta inmunitaria, específicamente, al complemento.

4. Naturaleza del diluyente

La naturaleza del diluyente puede afectar grandemente el punto final de la reacción, por lo que este es también un determinante crítico, ya que influye en la eficiencia de la fijación del complemento. Suspensiones preparadas en tampón fosfato salino o solución salina fisiológica a la que se le ha adicionado iones de magnesio resultaron igualmente sensibles a la lisis mediada por el complemento (38).

Neoh y Rowley, 1970, utilizaron complemento de curiel diluido en peptona salina al 0,1% y Gangarosa, et al, en ese mismo año prepararon las diluciones del suero en tampón veronal salino pH 7,2, mientras que Benenson, Saad y Mosley, 1968, las realizaron en agua destilada estéril, con buenos resultados (26).

En la actualidad en los ensayos vibriocidas se emplea solución salina fisiológica y en el caso de *N. meningitidis* solución salina balanceada de Hank con o sin rojo fenol con iguales resultados.

5. La fuente de complemento exógeno

La fuente de complemento ideal es un suero de un paciente agammaglobulinémico y con actividad del complemento normal, el que, por otra parte, es de difícil adquisición. Los estudios originales llevados a cabo en los años de 1960, que demostraron la correlación entre la actividad bactericida y la protección en la enfermedad meningocócica, usaron suero de individuos sanos como fuente de complemento carente de actividad bactericida (39).

Esta opción ha sido descartada por la imposibilidad de los diferentes laboratorios de encontrar y estandarizar fuentes de complementos adecuadas en un suero humano normal. Por otro lado, se ha argumentado que el complemento de conejo muestra resultados comparables con los obtenidos por complemento humano. Este puede ser preparado comercialmente y proporcionado a los diferentes laboratorios de manera uniforme y reproducible. El complemento de conejo tiende a dar títulos más elevados que con complemento humano, sin embargo, el suero humano puede resultar insensible en algunos casos y su estandarización puede resultar difícil debido a la variabilidad entre donantes (40).

En los ensayos llevados a cabo para la evaluación de vacunas, donde se usa suero de conejo estéril como fuente de complemento, este se añade sin diluir para una concentración del 25% en el volumen final de la reacción, puesto que *N. meningitidis* posee una cápsula polisacáridica que le confiere resistencia a los mecanismos de defensa inmune, entre ellos a la acción del complemento.

En una reunión llevada a cabo por el Departamento de Vacunas y Biológicos de la OMS, en Ginebra en 1999, sobre la estandarización y validación de ensayos serológicos para la evaluación de la respuesta inmune de las vacunas contra *Neisseria meningitidis* de los serogrupos A y C, se llegó a la conclusión de que el procedimiento estándar debía estar basado en el descrito por el CDC, pero que este podría ser modificado para adoptar la automatización del plaqueo y el conteo de colonias, en el cual fue aprobado como metodología óptima que el suero de conejo pudiera ser utilizado como fuente de complemento exógeno, que los laboratorios deberían usar un suero de referencia producido por el CDC desde 1992 como control positivo (41) y se recomendó adherirse a las guías del Comité Internacional de Armonización (ICH) para la validación de los métodos de ensayo (42).

Validación

La validación de ensayos analíticos es la metodología establecida para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un proceso de fabricación o método, es lo suficientemente fiable para

producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos (43).

Los métodos fisicoquímicos tienen límites definidos aceptados para estos parámetros de prueba, pero los bioensayos tienen resultados mucho más variables y a menudo utilizan animales y células que por sí mismos son variables y pueden tener límites de aceptación amplios.

Las pruebas con células son aquellas en las que el producto provoca una respuesta cuantificable en determinadas células como aglomeración de células, lisis celular, fusión celular o generación de una sustancia química específica y detectable. Estas pruebas pueden presentar más variabilidad que las valoraciones por fijación y se deben efectuar cuidadosamente para lograr resultados consistentes.

La validación es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico, así como también en la calidad de los resultados. Esto lógicamente se traduce en la disminución del número de fallos y repeticiones con el consiguiente ahorro de los costos asociados y en la optimización del método para mejorar la realización del ensayo y las posibilidades de automatización. La validación del proceso consiste en establecer evidencia documentada que proporcione un alto grado de confianza de que un proceso específico consistentemente genera un producto que cumple con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados.

Según las directivas de la Unión Europea referentes a las Normas de Correcta Fabricación y Control de la Calidad de Medicamentos (75/319, 89/381 y 91/356), la validación debe aplicarse no solo a los procesos de fabricación, sino también a los métodos de análisis y control, ya que la validación es parte integral de un sistema de control de calidad, es un requisito para la presentación del registro sanitario del producto y es un requerimiento de las regulaciones de buenas prácticas de fabricación (43).

El elemento más importante en un proceso es el operador. La calificación del operador mediante entrenamiento es absolutamente necesaria para el éxito del programa de validación. Un operador no calificado puede invalidar el trabajo hecho para calificar los componentes del proceso. El operador calificado está entrenado en cuanto a su trabajo técnico, BPF y al conocimiento de la importancia de no hacer cambios en un proceso establecido.

Para seleccionar un protocolo de validación, es importante considerar los aspectos siguientes: revisión de la literatura, experiencia del personal, equipos disponibles, tiempo de análisis, exactitud y precisión requeridos.

Los ensayos bactericidas tienen una aplicación bastante específica en el campo de las vacunas, por lo que existe escasa bibliografía acerca de los parámetros que deben

evaluarse durante su validación. Teniendo en cuenta que esta prueba se utiliza para evaluar la potencia de una vacuna se recomienda determinar la precisión, especificidad, exactitud y robustez del mismo, considerando la selección del método de ensayo (27, 44).

En el Instituto Finlay se investigan o producen vacunas contra la meningitis meningocócica y contra el cólera. Para evaluar la inmunogenicidad de ambas vacunas en ensayos preclínicos y clínicos se han usado ensayos bactericidas validados en nuestro laboratorio.

Para conocer la precisión de los mismos se seleccionaron tres sueros de individuos vacunados que mostraron diferentes niveles de anticuerpos bactericidas, los que se titularon seis veces, cada uno en días diferentes y por diferentes analistas y se comprobó la coincidencia entre las determinaciones, definiéndose como criterio de aceptación una coincidencia $\geq 50\%$. Se determinó la especificidad de los ensayos usando otra cepa blanco no relacionada al ensayo en cuestión o suero de individuos no inmunizados con las referidas vacunas. En cada placa se colocó un suero control positivo y se comparó el título obtenido con el reportado previamente para el mismo para precisar la exactitud del ensayo y se evaluaron variables alternativas para determinar la robustez de estos ensayos (27, 45).

En general no hay un método único para validar los métodos analíticos, ya que no existe un acuerdo universal acerca de la definición de algunos parámetros. El mismo puede ser determinado por diferentes métodos de cálculo y algunos métodos analíticos requieren esquemas particulares de validación (42). No obstante, otros autores han realizado ensayos de validación usando los mismos procedimientos empleados por nuestro laboratorio con resultados comparables (18, 32).

Los próximos años serán extremadamente importantes para el desarrollo y licenciamiento de nuevas vacunas de meningococos. Los ensayos clínicos de eficacia pueden basarse en estudios de inmunogenicidad, sin la necesidad de estudios de campo, basado en que los anticuerpos bactericidas correlacionan con la protección contra la enfermedad meningocócica. Es decir, la eficacia de las vacunas puede ser inferida de los datos de la inmunogenicidad y su efectividad confirmada en los posteriores estudios de poslicenciamiento. De ahí la necesidad de contar con ensayos bactericidas validados que brinden resultados reproducibles y confiables.

Los ensayos bactericidas para la evaluación de la respuesta inmune inducida por una vacuna contra bacterias gramnegativas son utilizados también como ensayos de caracterización del producto en alguna de sus etapas o como prueba de liberación de los lotes vacunales. Es por ello la importancia de verificar todos sus parámetros y de contar con un ensayo validado que ofrezca resultados confiables.

Referencias

- Taylor PW. Bactericidal and Bacteriolytic Activity of Serum Against Gram-Negative Bacteria. *Microbiol Rev* 1983;47:46-83.
- Abbas A, Lichtman A, Pober J. Mecanismos efectores de la inmunidad humoral. En: Abbas A, Lichtman A, Pober J, editores. *Inmunología celular y molecular*. 4ta ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002 p. 322-47.
- Chatterjee S, Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. Biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006;1762(1):16-29.
- Rus H, Niculescu F, Shin M. Role of C5b-9 complement complex in cell cycle and apoptosis. *Immunol Rev* 2001;180:49-55.
- Harris JB, LaRocque RC, Chowdhury F, Khan AI, Logvinenko T, Faruque AG, et al. Susceptibility to *Vibrio cholera* infection in a cohort of household contacts of patients with cholera in Bangladesh. *Plos Negl Trop Dis* 2008;2(4):1-8.
- Xu G, Wang S, Zhuang L, Hackett A, Gu L, Zhang L, et al. Intramuscular delivery of a cholera DNA vaccine primes both systemic and mucosal protective antibody responses against cholera. *Vaccine* 2009;27:3821-30.
- Ravichandran M, Ali SA, Rashid NH, Kurunathan S, Yean CY, Ting LC, et al. Construction and evaluation of a O139 *Vibrio cholerae* vaccine candidate based on a *hemA* gene mutation. *Vaccine* 2006;24:3750-61.
- López AL, Clemens JD, Deen J, Jodar L. Cholera vaccine for the developing world. *Hum Vaccin* 2008; 4(2):165-9.
- Asaduzzaman M, Ryan ET, John M, Hang L, Khan AI, Faruque AS, et al. The major subunit of the toxin coregulated pilus TcpA induces mucosal and systemic immunoglobulin A immune responses in patients with cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Infect Immun*. 2004; 72:4448-54.
- Qadri F, Ryan ET, Faruque AS, Ahmed F, Khan AI, Islam MM, et al. Antigen-specific immunoglobulin A antibodies secreted from circulating B cells are an effective marker for recent local immune responses in patients with cholera: comparison to antibody-secreting cell responses and other immunological markers. *Infect Immun* 2003;71:4808-14.
- Provenzano D, Kovac P, Wase WF. The ABCs (antibody, B cells, and carbohydrate epitopes) of cholera immunity: considerations for an improved vaccine. *Microbiol Immunol* 2006;50:899-927.
- Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 2007;25:5467-84.
- Qadri F, Bhuiyan TR, Raqib R, Alam MS, Alam NH, Svennerholm AM, et al. Acute dehydrating caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 induce increases in innate cells and inflammatory mediators at the mucosal surface of the gut. *Gut* 2004; 53:62-69.
- Flach CF, Qadri F, Bhuiyan TR, Alam NH, Jenninsche E, Lonroth I, et al. Broad up-regulation of innate factors during acute cholera. *Infect Immun* 2007;75:2343-50.
- Bouvet J, Fischetti V. Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infect Immun* 1999;67:2687-91.
- Meeke MD, Saksena R, Ma X, Wade TK, Taylor RK, Kovac P, et al. Synthetic fragments of *Vibrio cholerae* O1 Inaba O-specific polysaccharide bound to a protein carrier are immunogenic in mice but do not induce protective antibodies. *Infect Immun* 2004;72:4090-101.
- Paulovicova E, Machova E, Hostacka A, Bystricky S. Immunological properties of complex conjugates based on *Vibrio cholerae* O1 Ogawa lipopolysaccharide antigen. *Clin Exp Immunol* 2006;144:521-7.
- Boutonier A, Dassay B, Duménil R, Guénoles A, Ratsitorahina M, Migliani R, et al. A simple and convenient microtiter plate assay for the detection of bactericidal antibodies to *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio cholerae* O139. *J Microbiol Methods* 2003;55:745-53.
- Ryan ET, Calderwood SB, Qadri F. Live attenuated oral cholera vaccines. *Expert Rev Vacc* 2006;5:483-94.
- Ryan ET, Calderwood SB. Cholera vaccines. *Clin Infect Dis* 2000;31:561-5.
- Yang JS, Kim HJ, Yun CH, Kang SS, Im J, Kim HS, et al. A semi-automated vibriocidal assay for improved measurement of cholera vaccine-induced immune responses. *J Microbiol Meth* 2007;71:141-46.
- Crean TI, John M, Calderwood SB, Ryan E. Optimizing the germfree mouse model for *in vivo* evaluation of oral *Vibrio cholerae* vaccine in vector strains. *Infect Immun* 2000;68:977-81.
- Liang W, Wang S, Fenggang Y, Zhang L, Guoming Q, Liu Y, et al. Construction and evaluation of a safe, live, oral *Vibrio cholerae* vaccine candidate, IEM108. *Infect Immun* 2003;71:5498-504.
- OPS. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. En: Programa Especial de Publicaciones. Washington, DC: OPS; 1994.
- Richie E, Punjab N, Sidharta Y, Peetosutan K, Sukandar M, Wasserman S, et al. Efficacy trial of a single-dose live oral cholera vaccine CVD103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. *Vaccine* 2000;18:2399-410.
- Benenson AS, Saad A, Mosley WH. Serological studies in cholera. *Bull Wild Hlth Org* 1968;38:277-85.
- Cedré B, Viel Y, Rodríguez T, Año G, Pino Y, García H, et al. Validación del ensayo vibriocida colorimétrico para determinar anticuerpos séricos contra cepas candidatas vacunales de *V. cholerae*. *VacciMonitor* 2003;12(1):1-4.
- Qadri F, Chowdhury MI, Faruque SM, Salam MA, Ahmed T, Begum YA, et al. Breast milk reduces the risk of illness in children of mothers with cholera: observations from an epidemic of cholera in Guinea-Bissau. *J Pediatr Infect Dis* 2006;25:1163-6.
- Harris JB, Khan AI, LaRoque RC, Dorer DJ, Chowdhury F, Faruque AG, et al. Blood group, immunity and risk of infection with *Vibrio cholerae* in an area of endemicity. *Infect Immun* 2005;73:7422-7.
- Ochoa R. Respuesta inmune contra inmunógenos vacunales. Capítulo 1. En: Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas. Ciudad de la Habana: Finlay Ediciones; 2004.
- Hellerud BC, Aase A, Herstad TK, Næss LM, Kristiansen LH, Trøseid AM, et al. Critical Roles of Complement and Antibodies in Host Defense Mechanisms against *Neisseria meningitidis* as Revealed by Human Complement Genetic Deficiencies. *Infect Immun* 2010;78:802-9.
- Borrow R, Aaberge IS, Santos GF, Eudey TL, Oster P, Glennie A, et al. Interlaboratory Standardization of the Measurement of

- Serum Bactericidal Activity by Using Human Complement against Meningococcal Serogroup B, Strain 44/76-SL, before and after Vaccination with the Norwegian MenBvac Outer Membrane Vesicle Vaccine. *Clin and Diag Lab Immun* 2005;12:970-6.
33. Mountzourous KT, Howell AP. Detection of Complement-Mediated Antibody-Dependent Bactericidal Activity in a Fluorescence-Based Serum Bactericidal Assay for Group B *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microb* 2000;38:2878-84.
 34. Rodríguez T, Lastre M, Cedré B, Fajardo EM, del Campo J, Delgado I, et al. Validation of colorimetric assay to detect complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity against serogroups B and C *Neisseria meningitidis*. *Biological Journal of the International Association of Biological Standardization*. 2003;31:209-12.
 35. Jokhdar H, Borrow R, Sultan A, Adi M, Riley C, Fuller E, et al. Immunologic Hyporesponsiveness to Serogroup C but Not Serogroup A following Repeated Meningococcal A/C Polysaccharide Vaccination in Saudi Arabia. *Clin and Diag Lab Immun*. 2004;11:83-8.
 36. Balmer P, Borrow R. Issues surrounding standardization of meningococcal group W₁₃₅ serology. *Vaccine* 2007;25:63-8.
 37. Occhionero M, Usai G, Di Martino M, Le Moli S, Stroffolini T, Mastrantonio P. Serum antibodies to capsular polysaccharide vaccine of group A and C *Neisseria meningitidis* in military recruits in Italy. *Immunol Clin* 1990;9:159-64.
 38. Mandrell, RE, Azmi FH, Granoff DM. Complement-mediated bactericidal activity of human antibodies to poly a238 N-acetyl neuraminic acid, the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Infect. Dis.* 1995;172:1279-89.
 39. Santos GF, Deck RR, Donnelly J, Blackwelder W, Granoff DM. Importance of Complement Source in Measuring Meningococcal Bactericidal Titers. *Clin and Diag Lab Immun* 2001;8:616-23.
 40. Gill CJ, Ram S, Welsch JA, Detora L, Anemona A. Correlation between serum bactericidal activity against *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W135 and Y measuring using human versus rabbit serum as the complement source. *Vaccine* 2011;30:29-34.
 41. Joseph H, Balmer P, Bybel M, Papa T, Ryall R, Borrow R. Assignment of *Neisseria meningitidis* Serogroups A, C, W135, and Y Anticapsular Total Immunoglobulin G (IgG), IgG1, and IgG2 Concentrations to Reference Sera. *Clin and Diag Lab Immun*. 2004;11:1-5.
 42. WHO. Standardization and validation of serological assays for the evaluation of immune responses to *Neisseria meningitidis* serogroup A/C vaccines. Geneva: WHO; 1999. Disponible en: <http://www.who.int/gpv-documents>.
 43. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Ministerio de Salud Pública. República de Cuba. Regulación No. 41-2007. Validación de métodos analíticos. La Habana: CECMED; 2007.
 44. Martin D, McCallum L, Glennie A, Ruijne N, Blatchford P, O'Hallahan J, et al. Validation of the serum bactericidal assay for measurement of functional antibodies against group B meningococci associated with vaccine trials. *Vaccine* 2005;23:2218-21.
 45. Cedré B, Hernández Y, Delgado I, Izquierdo L, García L. Validación del ensayo bactericida en suero para los serogrupos A, C y W₁₃₅ de *Neisseria meningitidis*. *VacchiMonitor* 2012;21(2):31-4.

Bactericide serum assay to assess the immune response induced by meningococcal and cholera vaccines

Abstract

The susceptibility to the serum bactericidal system is a characteristic of gram-negative bacteria. There are many well-documented instances of enterobacterial susceptibility to complement. In fact, any prokaryote that presents a lipid bilayer membrane would appear to be potentially susceptible to complement killing, although there are gram-negative bacteria that appear refractory to the serum bactericidal and bacteriolytic systems; these resistant strains are frequently isolated as causative agents of infections involving tissue damage. It has therefore been suggested that serum resistance is an important determinant of virulence in at least some infections due to gram-negative bacteria. In some diseases caused for these bacteria, vaccination constitutes the more effective way, such as cholera and meningococci meningitis. Antibodies with lytic capacity induced for vaccination protect against infection and/or disease, that is why serum bactericidal assay is the gold test for evaluating the efficacy of many vaccines. Clinical trials conducted with *N. meningitidis* A, B, C, Y and W₁₃₅ vaccines and with live attenuated or inactivated cholera vaccines have shown the induction of antibodies with lytic activity which have correlated with protection in efficacy trials or in a experimental challenge, for that reason is important the standardization and validation of these assays for its application as immunogenicity rule in the vaccines development.

Keywords: Bactericidal assay, vaccines, gramnegative bacteria.