

# Determinación del esquema de inmunización con VA-MENGOC-BC® para pruebas de reto en ratones

Juan Francisco Infante<sup>1</sup>, Pedro Pérez<sup>1</sup>, Sergio Sifontes<sup>2</sup>, Luis Izquierdo<sup>1</sup>, Mildrey Fariñas<sup>1</sup>, Gustavo Sierra<sup>1</sup>, Enrique Muñoz<sup>1</sup>, Antonio Malberty<sup>1</sup>, Eddy Caro A<sup>1</sup>, Mercedes Gutiérrez<sup>1</sup>, Reynaldo Oliva<sup>1</sup>

1. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.
2. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas, Villa Clara, Cuba.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el mejor esquema y vía para la aplicación de VA-MENGOC-BC® en ratones. Se inmunizaron 210 Balb/c con la referida vacuna por las vías intraperitoneal (IP-0,5 mL) e intramuscular (IM-0,05 mL) con una, dos o tres inoculaciones y las correspondientes combinaciones de número de dosis y vías de administración. Los animales recibieron un reto con la cepa B4P1.15 en concentración de  $10^9$  unidades formadoras de colonia por mL acompañadas de dextrana férrica (1 mg/mL, 0,5 mL, IP) como factor estimulante de la virulencia. Los resultados demostraron diferencias estadísticamente significativas entre la sobrevivencia de los grupos vacunados y el control ( $P < 0,05$ ); mientras que no se encontraron diferencias de supervivencia entre ellos. Las pruebas de confrontación indicaron que es más adecuado vacunar a los ratones por vía IM ya que se obtienen niveles similares de protección con un volumen de vacuna 10 veces menor al empleado por vía IP.

**Palabras claves:** VA-MENGOC-BC®, esquema de inmunización, ratón, confrontación.

## Introducción

El régimen racional y el tiempo secuencial de una vacuna son aspectos que deben ser estudiados correlacionándolos con los niveles de la respuesta inmune. Con ello se pueden establecer patrones en los animales de laboratorio que servirán para estudios sucesivos o para la validación de un medicamento, ya sea de origen químico o biológico (1).

Cuando se pretende hacer un programa de vacunación o poner en uso una nueva vacuna, la respuesta inmune es un aspecto que debe ser bien estudiado. Esta es de gran significación al utilizar un modelo animal para su futura extrapolación al humano, puesto que, según Cuba (2) no es posible hacerla en aquellos casos en que no se ha probado la identidad entre la enfermedad del hombre y la del animal experimental.

En el caso de las meningitis de origen bacteriano se conocen múltiples trabajos que se refieren a la eficacia de los biomodelos experimentales en la simulación de los procesos clínico-patológicos causados por los referidos gérmenes, siendo muy importante su utilidad en este sentido y en la demostración de los efectos terapéuticos de las vacunas y los sueros, como sucede con las ratas infantiles y los ratones (3-6) en los casos de meningitis por *Haemophilus influenzae* tipo b y *Neisseria meningitidis*

grupo B. No obstante, se impone la necesidad de optimizar los referidos modelos para de esta manera acercarnos cada día más a los deseados biomodelos ideales.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la dosis óptima de VA-MENGOC-BC® en el ratón, donde se aplica una, dos o tres dosis de la vacuna por vía intraperitoneal o intramuscular y se evalúa la capacidad de protección mediante prueba de confrontación.

## Materiales y métodos

Para el experimento se emplearon 210 ratones Balb/c de peso inicial entre 18 y 22 g, mantenidos en las condiciones reglamentadas para un vivario convencional. Como vacuna se empleó VA-MENGOC-BC® en dosis IP de 0,5 mL e IM de 0,05 mL. Para la prueba de confrontación se usó la cepa B4:P1.15 de *N. meningitidis* procedente del cepario del Instituto Finlay a concentración de  $10^9$  UFC (3,1  $DL_{50}$ ), inyectada por vía IP (0,2 mL), después de aplicar dextrana férrica (0,5 mg) por la misma vía como factor estimulador de la virulencia (FEV). Se formaron 14 grupos de 15 ratones cada uno, los cuales fueron vacunados con una, dos o tres dosis de vacuna con 21 días de intervalo (Tabla 1). A los 21 días de la última dosis los animales fueron confrontados a través de prueba de reto con la cepa de *N. meningitidis* antes referida.

Tabla 1. Descripción estadística de supervivencia de los ratones vacunados con VA-MENGOC-BC® según grupos de estudio

Grupo	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	N	Mediana (h)	Media (h)	Desviación Estándar (h)
A		CONTROL		12	8	8.3	2.1
B	IP	-	-	10	72	61.8	21.5
C	IM	-	-	10	72	51.2	26.9
D	IP	IP	-	12	56.5	47.3	26.5
E	IM	IM	-	12	18	30.8	21.2
F	IP	IM	-	11	17	36.7	26.7
G	IM	IP	-	10	21	32	22.2
H	IP	IP	IP	10	23	35.5	25.4
I	IM	IM	IM	10	17	26.8	21.2
J	IP	IM	IM	12	17	27.7	22
K	IM	IP	IP	11	72	52.2	27.5
L	IP	IP	IM	10	17	22.7	17.3
M	IM	IM	IP	11	17	32	25.7
N	IP	IM	IP	10	20	32	22.5
O	IM	IP	IM	12	17	26.3	21.3

Los datos experimentales fueron procesados mediante la prueba Log-Rank para comparar cada grupo con el control (A). Se consideró como supervivencia el tiempo que sobrevivieron los animales que murieron durante el período que duró el experimento y sobrevivencia los porcentajes de animales que no murieron durante el ensayo.

## Resultados y Discusión

Al realizar un análisis estadístico del tiempo de supervivencia se observó que con una dosis de la vacuna (Figura 1) por vía IP el tiempo medio fue de 21 horas con un 81,8% de sobrevivencia; mientras que en la vía IM tuvo

20 horas la supervivencia con sobrevivencia de 66,6%. Estos valores no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ), lo cual hace pensar en el hecho de que la vía IM resulta más apropiada si tenemos en cuenta que la dosis utilizada por esta vía fue 10 veces menor que por la IP. Ello confirma los resultados obtenidos en ensayos previos donde se lograron elevados títulos de anticuerpos contra *N. meningitidis* B utilizando esta misma vía y dosis (7). No existen diferencias estadísticas con respecto a la vía IP, aunque todos difieren respecto al control retado sin inmunizar cuando se usa una sola dosis; coincidiendo con los resultados obtenidos por (8) cuando usó VA-MENGOC-BC® por vías S/C e I/P en ratas libres de patógenos específicos (SPF).

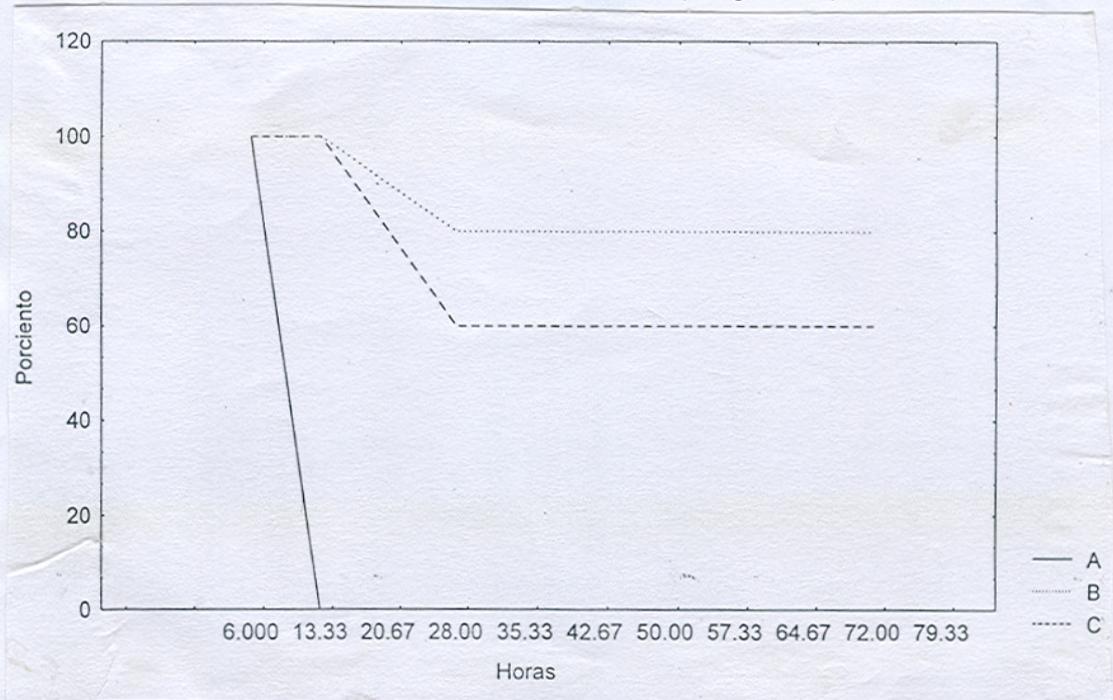
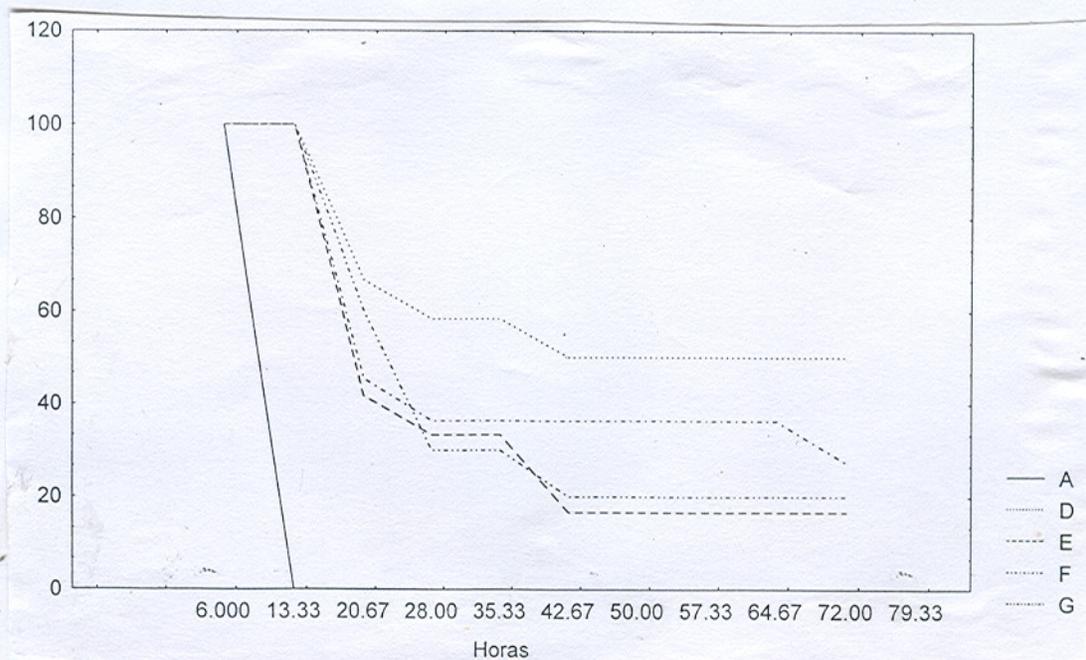


Figura 1 Resultados de la supervivencia en ratones Balb/c vacunados con una dosis de VA-MENGOC-BC®, por dos vías de inoculación (IP - IM).

En los grupos que recibieron la vacuna en dos ocasiones por ambas vías y sus combinaciones (Figura 2) todos difirieron estadísticamente respecto al control retado sin inmunizar. Sin embargo, hubo diferencias estadísticas en el tiempo medio de supervivencia (rango: 22-23,5 horas; Tabla 1) entre los grupos vacunados, aunque el mayor

porcentaje de supervivencia fue del 50% en el grupo D (Tabla 2, IP-IP). Esta razón nos hace pensar en la posibilidad de que exista una dosis óptima hasta ahora desconocida por nosotros, al menos en cuanto a los estudios de reto, cuando se usan dos dosis y las combinaciones de las vías con esta vacuna.



**Figura 2.** Resultados de la supervivencia en ratones Balb/c vacunados con dos dosis VA-MENGOC-BC® por dos vías de inoculación y sus combinaciones (IP e IM).

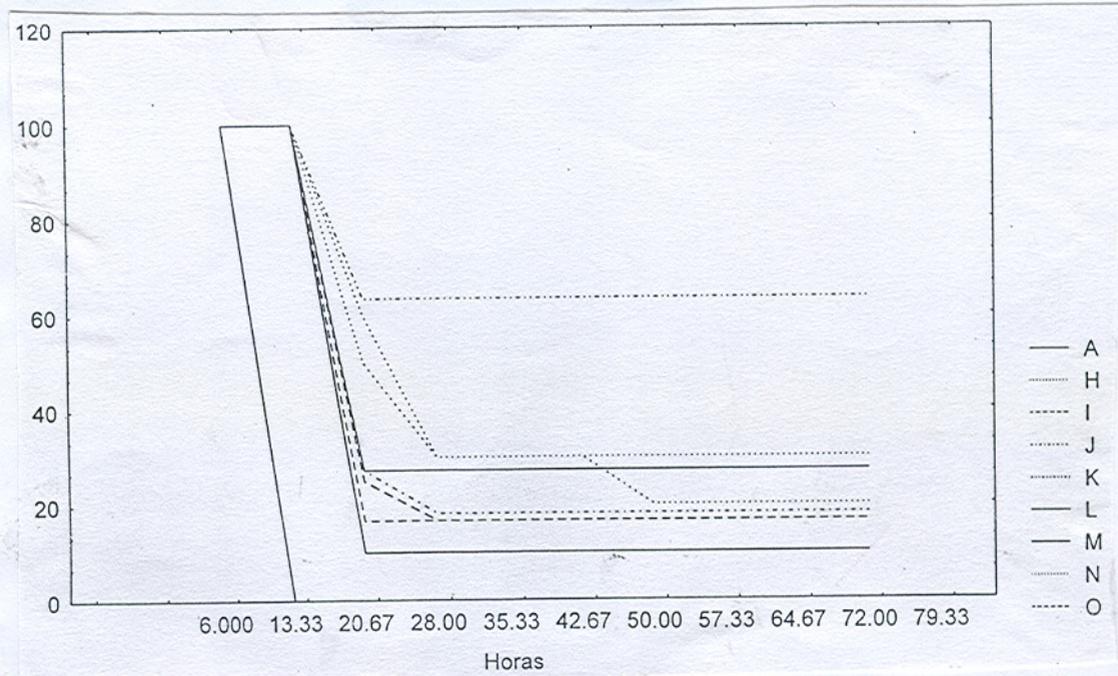
**Tabla 2: Supervivencia de los ratones vacunados con VA-MENGOC-BC® según grupo de estudio. Resultados de la prueba Log-Rank (Comparación de cada grupo con el control -A)**

Grupo	Supervivencia (%)	Sig (p)
A	0.0	
B	80.0	0.00002
C	60.0	0.00005
D	50.0	0.00006
E	16.7	0.00009
F	27,3	0.00007
G	20,0	0,00020
H	30,0	0,00011
I	16,7	0,00004
J	18,2	0,00003
K	63,6	0,00003
L	10,0	0,00003
M	27,3	0,00002
N	20,0	0,00013
O	16,7	0,00002

El rango de supervivencia en los grupos vacunados con tres dosis y las combinaciones de las dos vías (Figura 3) se situó entre 17,2 y 22 horas. Se obtuvo mayor supervivencia (63,6%) al vacunar con la combinación del grupo K (IM-IP-IP), no existiendo diferencias estadísticas entre los grupos H, I, J, K, L, M, N, y O, pero todos difieren con respecto al control no inmunizado y retado según los estudios estadísticos realizados por el método de Log Rank. En la comparación de las medias de supervivencia no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos, pudiéndose establecer una relación de equilibrio entre los niveles de protección de los animales y la dosis de confrontación que ocasionan de esta forma la no existencia de diferencias estadísticas desde el punto de vista de la supervivencia, a pesar de que el esquema de vacunación del grupo K obtuvo un alto nivel de supervivencia, lo que pudiera deberse a la posible existencia de una mayor concentración de anticuerpos específicos efectivos en este caso. Similares resultados fueron obtenidos por Jessouroun *et al* (9), cuando estudió

preparados vacunales hechos a partir de vesículas de la membrana externa de *N. meningitidis*, inoculados en el modelo de ratón y por Sifontes *et al* (10) en esta especie animal previa vacunación con VA-MENGOC-BC®, utilizando la vía intraperitoneal y del mismo modo que otros autores (11-13) al inmunizar humanos utilizando diferentes tipos de vacunas contra *N. meningitidis*. Se observa que cuando los

animales, a través de sus mecanismos de defensa son capaces de sobrevivir por un período mayor de aproximadamente 24 h, entonces la mortalidad prácticamente tiende a desaparecer. Por otra parte, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tiempos medios de supervivencia de los animales fallecidos de todos los grupos.



**Figura 3.** Resultados de la supervivencia en ratones Balb/c vacunados con tres dosis de VA-MENGOC-BC® por dos días de inoculación y sus combinaciones (IP e IM)

También se han obtenido resultados de protección algo superiores (14) con la misma vacuna, esquema de reto y cepa utilizada en este ensayo, aunque empleando un F.E.V. diferente. En el presente experimento, al combinar las dos vías con tres dosis de vacuna, la mejor protección fue del 63.6% en el grupo K (Figura 3) los cuales pudieran considerarse adecuados ante un cruento reto como el empleado en este ensayo.

Aunque se necesitan más estudios relacionados con la respuesta inmune celular y humoral, los resultados coinciden con el incremento de células formadoras de anticuerpos referidas por Lastre *et al* (15) en los primeros días posteriores a la inmunización con VA-MENGOC-BC®. 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 son satisfactorios 21 días después de la última vacunación con VA-MENGOC-BC® y en cierto sentido comparables con los obtenidos por Pérez *et al* (16) cuando estudió la inmunidad celular en recién nacidos y niños después de una segunda dosis de esta vacuna.

Finalmente estos resultados indican que quizás resultaría mejor vacunar con una dosis IM, ya que esta confiere niveles de protección similares a los obtenidos con una dosis 10 veces mayor por vía IP, lo que quedó demostrado a través de las pruebas de confrontación a que fueron sometidos los ratones con las consiguientes ventajas respecto a un menor consumo de vacuna por esta vía y la optimización de la respuesta inmune.

## Referencias

1. Infante BJB, Pérez RP, Sifontes RS. *Neisseria meningitidis: Resultados experimentales sobre biomodelos de ratón y rata*. La Habana: Ediciones Finlay; 1996.
2. Cuba, AC. *Manual de Patología de Animales de Laboratorio*. Organización Panamericana de la Salud. 1982, IX-X.
3. Infante BJB, Sifontes RS, Marrero ChO, et al. A mouse model of meningitis caused by *Neisseria meningitidis* group B and *Haemophilus influenzae* type b. *Arch. Med. Res.* 1996; 24(1):353.
4. Wiedermann BL, Hawkins EP et al. Pathogenesis of labyrinthitis associated with *Haemophilus influenzae* type b meningitis in infant rats. *J. Infect. Dis.* 1986; 153(1).
5. Moxon ER, Smith AL et al. *Haemophilus influenzae* meningitis in infant rats after intranasal inoculation. *J. Infect. Dis.* 1974; 129(2).
6. Infante BJB, Marrero ChO, Sifontes RS et al. Evaluation of the efficacy of the Human Antimeningococcal Immunoglobulin G in infant rats experimentally infected with *Neisseria meningitidis* group B. *Arch. Med. Res.* 1994; 25(4):455-61.
7. Infante BJB, Sierra GG, Campa HC et al: Evaluación anatomopatológica y serológica en ratones vacunados con VA-MENGOC-BC® por vía intramuscular. *Vaccinmonitor.* 1997; 9:10-13.
8. Infante JF, Sierra GG, Campa HC et al: Las ratas SPF como modelo experimental para la enfermedad meningocócica y evaluación de la efectividad de VA-MENGOC-BC®. I. Estudio clínico anatomopatológico. *Vaccinmonitor.* 1997; 2:1-3.
9. Jessouroun E, Silveira AF, et al. Immune response of mice to *Neisseria meningitidis* serogroup B protein antigens. Abstracts of the Tenth International Pathogenic *Neisseria* Conference, Baltimore, Maryland, U.S.A; 1996:149.
10. Sifontes RS, Infante BJB, Pérez RP et al. The hyperferremic mouse model for the evaluation of the effectiveness of VA-MENGOC-BC® against clinical isolates. *Arch. Med. Res.* 1997; 28(1): in press.
11. Sierra GG, Campa HC, García IL. et al. Efficacy evaluation of the Cuban Vaccine VA-MENGOC-BC® against disease caused by sergroup B *Neisseria meningitidis*. In: Achtman M, Kohl P, Marchal C, Morelli G, Seiler A, Thiesen B, ed. *Neisseriae 1990*. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Pathogenic *Neisseria* Conference. Berlin, Germany: Walter de Gruyter, 1991:129-134.
12. Echeverría ML, Malberty JA, et al. Respuesta inmune humoral a las proteínas de una vacuna antimeningocócica BC en un ensayo realizado en Antioquia, Colombia. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 1995;118(4):295-301.
13. Rappuoli R, Gianozzi, A. The development of new meningococcal vaccines. *Neisseria.* 1994, 426.
14. Infante BJB, et al: Resultados de retos con *Neisseria meningitidis* grupo B en ratones utilizando como factores estimulantes de la virulencia la mucina y la dextrana férrica. (en prensa).
15. Lastre M, Batista A, Sierra GG, Pérez MO. Cuantificación de células formadoras de IgG totales y específicas por ELISPOT en Balb/c durante la respuesta primaria de VA-MENGOC-BC®. *Vaccinmonitor.* 1995;4(7).
16. Pérez MO, Lastre M, et al. Inducent and duration of celular response to VA-MENGOC-BC® en babies and children. Abstracts of the Tenth International Pathogenic *Neisseria* Conference. 1996:156.

## Determination of immunization scheme with VA-MENGOC-BC® for challenge test in mice

## Abstract

The aim of the present work was finding the best schedule and route for the administration of VA-MENGOC-BC® to mice for challenge studies. 210 Balb/c mice were immunized with VA-MENGOC-BC® through intraperitoneal (IP, 0.5 mL) or intramuscular (IM, 0.05 mL) routes, with several combinations of routes and number of doses (1, 2 or 3). Animals were challenged with *Neisseria meningitidis* B4P1.15 (10<sup>9</sup> colony forming units/mL, 0.2 mL, IP) and iron dextran (1 mg/mL, 0.5 mL, IP) as virulence enhancement factor. Results showed significant statistical differences (P<0.05) among vaccinated and control groups in terms of time of survival but not in relation to the proportion of animals that survived. Challenge tests suggest that vaccination through IM route was more suitable since similar levels of protection were achieved with 10 times less volume of vaccine.

**Key words:** VA-MENGOC-BC®, immunized of schedule, mice, challenge.

Recibido: 21-9/1997

Aprobado: 12-2/1998