

Nivel de corte de los ELISAs para cuantificación de anticuerpos inducidos por la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC®

Rolando Ochoa, Xenia Ferriol, Ana M García, Eric Estrada, Franklin Sotolongo, María Amalia Camaraza, Teresita Leiva, Aida Arnet, Juan Carlos Martínez.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.
E-mail: ochoa@finlay.edu.cu

Para medir el grado de protección inducido por vacunas antimeningocócicas se ha establecido el Ensayo Bactericida en Suero (EBS) y se perfeccionan otros ensayos inmunobiológicos, sin embargo, es necesario contar con pruebas sencillas como el ELISA, capaz de evaluar un gran número de muestras. Se estimó el nivel de corte de los ELISAs para la cuantificación de IgG humana contra los antígenos de VA-MENGOC-BC®, vacuna antimeningocócica compuesta por vesículas proteicas de membrana externa de meningococo B y polisacárido capsular de meningococo C, con respecto a un panel de muestras de suero de lactantes, caracterizado por Ensayo Bactericida en Sangre Total (EBST). Los valores correspondientes a la máxima sensibilidad y especificidad fueron respectivamente; 2 µg/mL y 12 µg/mL para antipolisacárido C, y 1000 U/mL y 7000 U/mL para antiproteínas de membrana externa. La mayor coincidencia se obtuvo con 6 µg/mL y 2500 U/mL. Se evaluó otro panel de muestras de suero de adolescentes entre 14 y 18 años, por ELISA y EBS para *Neisseria meningitidis* serogrupos B y C, alcanzándose una buena concordancia. Doce años después de la inmunización con VA-MENGOC-BC® persiste una importante concentración de anticuerpos contra los antígenos vacunales en los sueros estudiados.

Palabras claves: Vacunas, *Neisseria meningitidis*, polisacárido C, proteínas de membrana externa, ELISA.

Introducción

La enfermedad meningocócica es una importante causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. Para su control existen vacunas de polisacáridos efectivas para los meningococos de los serogrupos A y C, no conjugadas para mayores de 2 años de edad y recientemente vacunas conjugadas para el meningococo C, efectivas por debajo de esa edad (1-6).

No ha sido posible desarrollar una vacuna de polisacárido contra el meningococo B, ya que éste es incapaz de inducir una adecuada respuesta humoral, dada su similitud estructural con carbohidratos presentes en glicoproteínas del sistema nervioso central. Se ha intentado conjugar el polisacárido químicamente modificado a una proteína portadora, sin embargo esto entraña el riesgo de reacciones autoinmunes (1, 2). Se han usado otros componentes de la bacteria, como las proteínas de membrana externa (1, 2), estrategia que fue seguida por el Instituto Finlay, que desarrolló y comercializa una vacuna antimeningocócica de reconocida eficacia -VA-MENGOC-BC® - compuesta por vesículas proteicas de membrana externa de la cepa B:4:P1.19,15 y polisacárido capsular de meningococo serogrupo C (7, 8).

Para medir el grado de protección inducido por vacunas antimeningocócicas se ha establecido el Ensayo Bactericida en Suero (EBS). Si bien sus resultados se correlacionan con vacunas de polisacáridos, tiende a subestimar en vacunas con otros constituyentes, como las proteínas de membrana externa (8). Por ello se han explorado otros ensayos inmunobiológicos (9-12). Entre ellos se destaca el Ensayo Bactericida en Sangre Total (EBST) o lisis en sangre total, considerada *ex vivo*, ya que reproduce en el laboratorio la bacteriemia y los mecanismos de defensa involucrados (10-12).

Aunque las pruebas funcionales son insustituibles, es importante contar con pruebas sencillas, capaces de evaluar un gran número de muestras, útiles para estudios seroepidemiológicos y de inmunogenicidad de vacunas. El ELISA es una técnica que cumple estos requisitos, sin embargo, no está bien establecido el nivel de anticuerpos antipolisacárido requerido para la protección, aunque se han estimado niveles que varían entre 0,5 y 2 µg/mL (3, 4, 6, 13). No existen reportes al respecto para proteínas de membrana externa, en parte debido a la carencia de sueros estándares de referencia con concentraciones definidas. El estándar para antipolisacárido C, CDC1992

(NIBSC, GB) ha sido caracterizado para las principales clases de inmunoglobulinas (13).

En el estudio que describimos determinamos por primera vez el nivel de corte de los ELISAs para la cuantificación de anticuerpos contra los antígenos vacunales de VA-MENGOC-BC®, tomando como referencia un panel de muestras de suero de lactantes evaluado mediante EBST.

Materiales y Métodos

Panel de muestras

Panel 1: Para el cálculo del nivel de corte de ambos ELISAs se usó un panel de 86 muestras de suero de lactantes, tomadas inmediatamente antes de inmunizar con VA-MENGOC-BC® (3,5 meses de edad) y a los 3 meses de la segunda dosis (8 a 9 meses de edad). Este panel fue previamente caracterizado por EBST para *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) serogrupos B y C (11, 12).

Panel 2: Para comparar los EBS para *N. meningitidis* serogrupos B y C y los ELISAs respectivos, se usó un panel de muestras de suero de adolescentes entre 14 y 18 años, vacunados con VA-MENGOC-BC®, 12 años antes. Se estudiaron 183 muestras para meningococo B y 177 para meningococo C.

Ensayos inmunoenzimáticos

Los procedimientos técnicos de los ELISAs indirectos para la cuantificación de anticuerpos contra polisacárido C y proteínas vacunales de VA-MENGOC-BC®, se ejecutaron tal y como describen Nerey y colaboradores (14) y Ferriol y colaboradores (15), excepto que en el ELISA antipolisacárido C, se empleó un suero estándar secundario, calibrado contra el suero estándar CDC1992 y que los resultados se expresan en µg/mL en lugar de unidades arbitrarias por mL (U/mL). Los valores de absorbancia se transforman a U/mL o µg/mL respectivamente para antiproteínas vacunales y antipolisacárido C, con un programa desarrollado por el Centro para el Control de Enfermedades, Atlanta, GA. Se usó la función logistic-log de 4 parámetros para construir la curva de referencia. La validación y determinación cuantitativa se hicieron con el paquete de programas ELISA (16, 17).

Ensayo Bactericida en Sangre Total (EBST) para *N. meningitidis* serogrupos B y C

Este ensayo es un modelo *ex vivo* de bacteriemia, basado en la evaluación de la interacción de la sangre con un cultivo de bacterias en fase exponencial de crecimiento.

Se distribuyeron alícuotas de 1 mL de sangre en tubos plásticos bijoux que se inocularon con las suspensiones bacterianas a una concentración de 10^7 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL. Se colocaron los tubos en una plataforma rotatoria, a 37 °C. Se tomaron 10 µL de cada mezcla en los tiempos 0, 45 y 90 min, se realizaron 4 diluciones en RPMI (Gibco, GB) (1:10) y se sembraron 10 µL de cada dilución en placas de agar base GC (Difco, USA). Se incubaron todas las placas a 37 °C con 6% de CO₂ a una humedad > 90% durante 24 horas. Al día siguiente se realizó el conteo de colonias en cada placa. El resultado se expresó como el porcentaje de lisis a los 45 y 90 min con respecto al conteo en tiempo 0. Las muestras con un 50% de lisis se clasificaron como positivas (10, 11, 12).

Ensayo Bactericida en Suero (EBS) para *N. meningitidis* serogrupos B y C

Se realiza en placas estériles de microtitulación de 96 pocillos, con fondo plano y tapa. Se añaden 25 µL de solución Hanks a los pocillos. Se agrega 50 µL de los sueros a probar en el primer pocillo de cada hilera y luego se hacen diluciones seriadas al doble. Se agrega 12,5 µL de la suspensión bacteriana previamente titulada a todos los pocillos de la placa. Se adicionan 12,5 µL de la fuente de complemento a todos los pocillos, exceptuando la fila 12 (control de la suspensión). La fuente de complemento es plasma humano fresco para *N. meningitidis* serogrupo B y una mezcla de sueros de gazapos para el serogrupo C. Se incuba la placa durante 30 min a 37 °C sin CO₂. Se añaden 150 µL de caldo Soya Trypticase (Difco, USA) con 1% de agar noble que se funde y enfría hasta 50 °C más suero de ternera al 10%. Después de solidificado el agar, se incuba 18-24 horas a 37 °C en atmósfera de CO₂ (5-10%) y pasado este tiempo se procede al conteo de las colonias en las diferentes diluciones del suero. Se considera como indicativo de actividad bactericida en los sueros, la obtención de un conteo de colonias igual o menor al 50% respecto al promedio de colonias del control de suspensión. El resultado se reporta en título de anticuerpos con respecto a la dilución del suero (18). Las muestras con un título mayor o igual a 1:4 para el serogrupo B y mayor o igual a 1:8 para el serogrupo C se clasifican como positivas (3, 4, 13).

Análisis estadístico de los resultados

Se calcularon con el Panel 1 la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, coincidencia e índice Kappa (19) y se determinaron los valores de corte correspondientes a la mejor sensibilidad, especificidad, así como aquel valor en que se encontró mayor coincidencia entre ELISA y EBST.

Con el Panel 2 se compararon los resultados alcanzados por ELISA con respecto a EBS. Se calculó para ambos ELISAs la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, coincidencia e índice Kappa (19), así como el porcentaje de muestras mayores que los valores de corte.

Resultados y Discusión

Los ensayos inmunoenzimáticos pueden ser herramientas valiosas para estudios seroepidemiológicos, siempre y cuando puedan establecerse los estudios de correlatos de protección. Para anticuerpos antipolisacárido C se han usado concentraciones entre 0,5 y 2 µg/mL (3-6) como valor de corte; preferentemente este último. Para su determinación se han tenido en cuenta estudios poblacionales y ensayos bactericidas en suero, aunque no siempre se ha demostrado una adecuada correlación entre esta última técnica y el ELISA (3, 4).

Para el cálculo de los niveles de corte antipolisacárido C empleamos un suero estándar secundario calibrado contra el suero estándar CDC1992, cuantificando la IgG en lugar de los anticuerpos totales (3, 4, 6), teniendo en cuenta nuestro interés de explorar la respuesta inmune de larga duración y que en las vacunas de polisacáridos, incluso las no conjugadas, ocurre el cambio de isotipo de IgM a IgG, aunque no podamos hablar de respuesta secundaria en estas últimas (3-6). Por otra parte quisimos evitar la posible interferencia de anticuerpos IgA (3, 5), limitándonos a explorar la IgG, que tiene una alta capacidad lítica y opsonizante, lo que nos facilitó alcanzar una mayor concordancia con el ensayo biológico.

No existen estándares internacionales para anticuerpos antiproteínas de membrana externa de meningococo B, por ello usamos un estándar al que le fueron asignados 20000 U/mL. Al igual que para antipolisacárido C, cuantificamos la IgG específica (15).

En ambos casos analizamos los niveles de corte usando como referencia el EBST, ya que no se ha encontrado una buena correlación entre el EBS para *N. meningitidis* serogrupo B y el ELISA correspondiente. Esta correlación ha sido discreta para la evaluación de la respuesta contra el polisacárido C (3, 4). Preferimos emplear el EBST, modelo *ex vivo* de bacteriemia que evalúa las interacciones entre la bacteria y el hospedero que, aunque muy laborioso, es una medida sensible de actividad bactericida. Este ensayo tiene como virtud el usar complemento autólogo y explorar no sólo la lisis mediada por anticuerpo y complemento, sino también la

capacidad opsonizante de los anticuerpos y las opsoninas generadas de la activación del complemento, mecanismo importante en bacterias extracelulares y particularmente para *N. meningitidis* serogrupo B. Mientras los anticuerpos contra el polisacárido capsular son capaces de activar de forma efectiva el sistema del complemento para lisar meningococo C, los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polisacáridicos pueden actuar mediante opsonización y activación de los neutrófilos, de esta forma esperábamos lograr una mejor coincidencia con el ELISA (10-12).

Describimos distintos valores de corte acorde con la máxima sensibilidad y especificidad y por ende los mejores valores predictivos negativos y positivos y la mayor coincidencia, que se obtuvo en 6 µg/mL para antipolisacárido C (Tabla 1), mucho mayor que los 2 µg/mL usados como valor de corte en otros estudios (3, 4, 6, 13). Si empleáramos este último valor, aunque se alcanzaría una sensibilidad del 100%, la especificidad sería sólo del 62% y la coincidencia de 71%, con un índice Kappa de 0,43, indicativo de baja correlación entre ambas técnicas.

Tabla 1. Valores de corte del ELISA antipolisacárido C, estimados con un panel de 86 sueros de lactantes caracterizado por el Ensayo Bactericida en Sangre Total

	Valores de corte		
	2 µg/mL	6 µg/mL	12 µg/mL
IK	0,43	0,80	0,45
S	100	85	35
E	62	95	100
VPP	44	85	100
VPN	100	95	84
C	71	93	85

IK = Índice Kappa. S = Sensibilidad. E = Especificidad.

VPP = Valor predictivo positivo. VPN = Valor predictivo negativo.

C = Coincidencia

La mayor coincidencia para antiproteína vacunal se alcanzó con 2500 U/mL, concentración a la que corresponde un buen índice Kappa de 0,75 (Tabla 2). No reflejamos el valor correspondiente al 100% de sensibilidad, pues coincidió con una muestra positiva por el EBST con concentraciones de anticuerpos muy bajas, (por debajo del límite de detección del ensayo), para el cual no tenemos una explicación, aunque pudiera deberse a mecanismos naturales de defensa. Como era de esperar la sensibilidad y especificidad son inversamente proporcionales según se aumente el valor

de corte. A una mayor densidad de anticuerpos debe corresponder una mayor actividad lítica. En el caso de las vesículas proteicas de membrana externa es más difícil de precisar, ya que probablemente algunos de sus componentes son más inmunogénicos y capaces de inducir anticuerpos con capacidad bactericida mediada por complemento o por los fagocitos, de ahí que los cambios de especificidad sean menos marcados a medida que se eleva el valor de corte, aunque siempre en sentido ascendente (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de corte del ELISA antiproteínas de membrana externa, estimados con un panel de 86 sueros de lactantes caracterizado por el Ensayo Bactericida en Sangre Total

	Valores de corte		
	1000 U/mL	2500 U/mL	7000 U/mL
IK	0,67	0,75	0,37
S	96	88	29
E	81	90	100
VPP	66	78	100
VPN	98	95	78
C	85	90	80

IK = Índice Kappa. S=Sensibilidad. E=Especificidad.
VPP=Valor predictivo positivo. VPN=Valor predictivo negativo.
C=Coincidencia

Los valores de corte pudieran variar si estudiáramos otras poblaciones de más edad con un grado mayor de madurez del sistema inmune. Preferimos utilizar muestras de suero de lactantes por ser el principal grupo susceptible y por lo tanto receptores de vacunas antimeningocócicas. El empleo de muestras de lactantes, con un sistema inmune menos maduro sobre todo en su vertiente humoral, pudiera explicar los niveles superiores de corte para polisacárido C (3, 4, 6,13). También pudieran modificarse si se ajustara el inóculo bacteriano buscando una mejor sensibilidad del EBST, para lo cual habría que realizar nuevos estudios (10).

Se obtuvo un aceptable índice Kappa (> 0,50) y por ende la concordancia entre los EBS para *N. meningitidis* serogrupos B, C y los ELISAs respectivos (Tablas 3 y 4), en los valores de corte correspondientes a 2500 U/mL de antiproteínas vacunales y 6 µg/mL de antipolisacárido C, aunque inferior a lo alcanzado con el EBST en el Panel 1.

Tabla 3. Evaluación del ELISA antipolisacárido C, con respecto al Ensayo Bactericida en Suero en un panel de 177 muestras de adolescentes entre 14 y 18 años

	Valores de corte		
	2 µg/mL	6 µg/mL	12 µg/mL
IK	0,27	0,51	0,42
S	95	69	43
E	40	82	94
VPP	44	66	78
VPN	94	84	77
C	58	78	77

IK=Índice Kappa. S=Sensibilidad. E=Especificidad.
VPP=Valor predictivo positivo. VPN=Valor Predictivo negativo.
C=Coincidencia.

Tabla 4. Evaluación del ELISA antiproteínas de membrana externa, con respecto al Ensayo Bactericida en Suero en un panel de 183 muestras de adolescentes entre 14 y 18 años

	Valores de corte		
	1000 U/mL	2500 U/mL	7000 U/mL
IK	0,11	0,51	0,42
S	99	87	44
E	14	66	95
VPP	46	65	87
VPN	94	88	70
C	50	75	74

IK = Índice Kappa. S=Sensibilidad. E=Especificidad.
VPP = Valor predictivo positivo. VPN=Valor predictivo negativo.
C = Coincidencia.

El empleo de niveles de corte que no requieren muestras pareadas permite el análisis seroepidemiológico. Aplicando este principio a las muestras del Panel 2, podemos observar una buena respuesta contra proteínas vacunales (Tabla 5), incluso para el valor de corte correspondiente al mayor valor predictivo positivo (19).

Tabla 5. Distribución de muestras de suero de adolescentes para IgG antiproteínas de membrana externa según los niveles de corte empleados

Nivel de corte	Muestras	
	No.	%
> 1000 U/mL	165	90,16
> 2500 U/mL	104	56,83
> 7000 U/mL	39	21,31

Si asumimos esta respuesta como inducida por VA-MENGOC-BC®, podríamos concluir que 12 años después de la inmunización, persiste una elevada protección. Parte de esta respuesta pudiera ser también atribuida a la reestimulación natural por contacto con cepas circulantes de varios serotipos del serogrupo B, lo que impediría, al parecer, la ocupación del nicho ecológico por otros patógenos. El hecho cierto es que existe un nivel elevado de anticuerpos IgG contra proteínas vacunales.

En el caso de antipolisacárido C (Tabla 6), aunque en menor grado, encontramos también una respuesta importante, máxime teniendo en cuenta que esta vacuna no está conjugada covalentemente a una proteína portadora, aunque su interacción con la vesícula pudiera explicar una respuesta que resulta intermedia entre las vacunas no conjugadas y las conjugadas.

Tabla 6. Distribución de muestras de suero de adolescentes para IgG antipolisacárido C según los niveles de corte empleados

Nivel de corte	Muestras	
	No.	%
> 2 µg/mL	134	73,22
> 6 µg/mL	65	35,22
> 12 µg/mL	31	16,94

La respuesta contra polisacárido C no puede explicarse por el estado de portador, teniendo en cuenta que no se ha aislado meningococo C en nuestro país en los últimos años (20, 21). Pudiera explicarse por reactividad cruzada con el polisacárido capsular de *Escherichia coli* K92, pero este patógeno se encuentra raramente en personas sanas (1, 2, 22); tampoco pudiéramos descartar la posibilidad de cierto grado de respuesta contra trazas proteicas no detectables en el polisacárido vacunal.

Por supuesto que se requieren en ambos casos estudios más exhaustivos para arribar a conclusiones más precisas, que por otra parte no constituían objetivos primarios de este trabajo.

Resulta totalmente inédito para estos ELISAs la determinación de los niveles de corte tomando como referencia pruebas funcionales *ex vivo* que correlacionan con protección. De este modo, la aplicación de estos inmunoensayos enzimáticos cobra mayor importancia en estudios seroepidemiológicos y de evaluación clínica de vacunas.

Referencias

- 1- Ala'Aldeen DA. Vaccine against *Neisseria meningitidis*: Past, Present and Future. *Biotechnología Aplicada* 1996; 13:1-7.
- 2- Poolman JT. Development of a meningococcal vaccine. *Infect Ag Dis.* 1995; 4(1):13-28.
- 3- Maslanka SE, Tappero JW, Plikaytis BD, Brumberg RS, Dykes JK, Gheesling LL, *et al.* Age-dependent *Neisseria meningitidis* serogroup C class-specific antibody concentrations and bactericidal titers in sera from young children from Montana immunized with a licensed polysaccharide vaccine. *Infect Immun.* 1998; 66:2453-2459.
- 4- Law BJ, Rosenberg T, MacDonald NE, Ashton FE, Huang JC, King WJ *et al.* Age-related immunogenicity of meningococcal polysaccharide vaccine in aboriginal children and adolescents living in a Northern Manitoba reserve community. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17:860-864.
- 5- MacDonald NE, Halperin SA, Law BJ, Forrest B, Danzig LE, Granoff DM. Induction of immunologic memory by conjugated vs plain meningococcal C polysaccharide vaccine in toddlers: a randomized controlled trial. *JAMA* 1998; 280:1685-1689.
- 6- Lieberman JM, Chiu SS, Wong VK, Partidge S, Chang SJ, Chiu CY *et al.* Safety and immunogenicity of a serogroup A/C *Neisseria meningitidis* oligosaccharide-protein conjugate vaccine in young children. A randomized controlled trial. *JAMA.* 1996; 275:1499-1503.
- 7- Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, García IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF *et al.* Vaccine against group B *Neisseria meningitidis* protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Annals.* 1991;14(2):195-207.
- 8- Tappero J, Lagos R, Maldonado A, Plikaytis B, Williams D, Dykes J *et al.* Immunogenicity of 2 serogroup B Outer Membrane Protein Meningococcal Vaccines. *JAMA.* 1999; 281:1520-1527.
- 9- Acanda ME, Leiva T, Bolaños G, Quintero R, Sotolongo F, Martínez I *et al.* Adherencia de *Neisseria meningitidis* a células epiteliales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología.* 1997; 17(6):149-152.
- 10- Amalia M, Anwar N, Leiva T, Arnet A, Sotolongo F, Ison C. Resultados preliminares de la evaluación de diferentes concentraciones de la suspensión bacteriana empleada como inóculo en el Ensayo Bactericida de Sangre Total. *VacchiMonitor.* 2000; 9(2):14-18.
- 11- Ison CA, Anwar N, Cole MJ, Galassini R, Heyderman RS, Klein NJ *et al.* Assessment of immune response to meningococcal disease: comparison of a whole-blood assay and the serum bactericidal assay. *Microb Pathog.* 1999; 27:207-214.

- 12- Ison CA, Heyderman RS, Klein NJ, Peakman M, Levin M. Whole blood model of meningococcal bacteraemia –a method for exploring host-bacterial interactions. *Microb Pathog.* 1995; 18:97-107.
- 13- Holder PK, Maslanka SE, Pais LB, Dykes J, Plikaytis BD, Carlone GM. Assignment of *Neisseria meningitidis* Serogroup A and C Class Specific Anticapsular Antibody Concentrations to the New Standard Reference Serum CDC1992. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995; 2(2):132-137.
- 14- Nerey M, Ochoa R, Martínez JC, Licea T, Ferriol X, García AM *et al.* Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG humana anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C. *Bioteología Aplicada.* 1999; 16:113-115.
- 15- 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. *Rev Cubana Med Trop.* 1999; 51(2):99-105.
- 16- Plikaytis B D, Carlone G M, Turner S H, Gheesling L L, Holder P F. *Program ELISA user's manual.* Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1993.
- 17- Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:1439-1446.
- 18- Sotolongo F. *Neisseria meningitidis: Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune.* 3ra ed. Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay; 1995.
- 19- Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R, Sotolongo F. Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor.* 2000;9(1):17-20.
- 20- Martínez I, García D, Sotolongo F, Gutiérrez M, Matute I, Núñez N *et al.* Susceptibilidad a agentes microbianos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores. *VacciMonitor.* 2000; 9(2):7-13.
- 21- Zamora L. Marcadores epidemiológicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores. Cuba (1998-1999). Trabajo de Diploma. Ciudad de La Habana: Universidad de La Habana, Facultad de Biología; 2000.
- 22- Devi SJN, Robbins JB, Schneerson R. Antibodies to poly [(2-8)- α -N-acetylneuraminic acid] and poly [(2-9)- α -N-acetylneuraminic acid] are elicited by immunization of mice with *Escherichia coli* K92 conjugates: Potential vaccines for groups B and C meningococci and *E. coli* K1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:7175-7179.

ELISA Cut off Level for Quantitation of Antibodies Elicited by the Meningococcal Vaccine VA-MENGOC-BC®

Abstract

The Serum Bactericidal Assay (SBA) has been used to measure the protection elicited by meningococcal vaccines. Other immunobiological assays are being improved, however simple assays as ELISA, which are useful to test many samples are necessary. The cut off levels in the ELISAs for quantitation of human IgG against the antigens in VA-MENGOC-BC® vaccine, prepared from outer membrane proteins of meningococcus B and capsular polysaccharide of meningococcus C, were assessed with a panel of serum samples from infants, previously characterized by Whole-Blood Assay (WBA). The cut off levels corresponding with the greatest sensitivity and specificity were respectively 2 μ g/mL and 12 μ g/mL for polysaccharide C antibodies, and 1000 U/mL and 7000 U/mL for outer membrane protein antibodies. The highest coincidence was obtained with 6 μ g/mL, and 2500 U/mL. Another panel of serum samples from teenagers between 14 and 18 years old was tested by ELISA and SBA against *Neisseria meningitidis* serogroups B and C; a good concordance was reached. A high concentration of specific antibodies persists twelve years after vaccination with VA-MENGOC-BC®.

Keywords: Vaccine, *Neisseria meningitidis*, polysaccharide C, outer membrane proteins, ELISA.