

Evaluación de la eficacia de VA-MENGOC-BC® en ratón Balb/c retados frente a los serogrupos A, B y C

Juan Francisco Infante, Sergio Sifontes, Eddy Caro, Mildrey Fariñas, Armando Cádiz, Armando Acosta, Marielena Sarmiento.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana. Cuba.

E-mail: jinfante@finlay.edu.cu

Hasta la fecha se han desarrollado varios modelos experimentales para la reproducción experimental de la enfermedad meningocócica humana, cuya utilidad en la evaluación de la eficacia de medios de inmunización y terapia, así como en el estudio de la patogenia de la enfermedad es incuestionable. En el presente trabajo se describe la evaluación de la eficacia de VA-MENGOC-BC® y la Inmunoglobulina Humana Antimeningocócica BC frente a *Neisseria meningitidis* de los serogrupos A, B y C, empleando el ratón Balb/c tratado con mucina y dextrana férrica como estimulantes de la virulencia. Los ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal con una, dos o tres dosis de 0,5 mL de VA-MENGOC-BC®. El intervalo entre dosis fue de tres semanas entre la primera y segunda dosis y de 15 días entre la segunda y la tercera. El reto se realizó con dosis letales (1-3 x DL₅₀) de *N. meningitidis* A, B ó C a los 15 ó 21 días después de aplicada la última dosis de vacuna. Para evaluar la actividad de la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC como medio de inmunización pasiva, se trató otro grupo de ratones, 30 min, 2 y 6 h después habérseles inoculado los gérmenes. Se administraron en cada caso 5 mg de la inmunoglobulina por vía intraperitoneal o intravenosa en un volumen de 0,1 mL. Los resultados demostraron que tanto VA-MENGOC-BC® como la Globulina Antimeningocócica BC confieren protección significativa contra un reto letal con *N. meningitidis* en el modelo de ratón tratado con factores estimulantes de la virulencia

Palabras claves: VA-MENGOC-BC®, Inmunoglobulina Humana Antimeningocócica BC, ratón, mucina, dextrana férrica, reto, protección.

Introducción

Los estudios epidemiológicos revelan que el mayor número de infecciones en niños por debajo de cuatro años de edad se debe a *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* (1). Una vez establecidos los biomodelos rata y ratón para la enfermedad producida por *N. meningitidis* A, B y C en estas especies Infante (2000), se impuso la necesidad de comprobar su eficacia para demostrar el potencial protector de VA-MENGOC-BC® frente a cepas homólogas y heterólogas, así como conocer el alcance de la protección conferida por la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC.

Se han empleado diversos modelos experimentales para demostrar la eficacia de productos inmunoterapéuticos o los mecanismos de protección de los mamíferos frente a

N. meningitidis. Tal es el caso de los ratones knocked out utilizados para conocer los efectos del IFN gamma sobre esta infección (2). Por otra parte, el modelo ratón fue utilizado en la comprobación de la eficacia de vacunas contra *N. meningitidis* elaboradas a partir de componentes de la membrana externa de este germen, mostrando una fuerte inmunogenicidad cuando estos fueron administrados por la vía intranasal (3). En tanto (4) han empleado las ratas recién nacidas para confirmar la importancia de los lipooligosacáridos en la virulencia de *N. meningitidis*. Asimismo, se han realizado estudios en ratones Balb/c para demostrar la biodistribución de VA-MENGOC-BC®, observando la cinética de la radioactividad en órganos como bazo, timo y músculos (5).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la protección conferida por la vacuna VA-MENGOC-BC® y la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC

en ratones frente a la infección experimental con *N. meningitidis* de los serogrupos A, B y C.

Materiales y métodos

1. Animales: Todos los ratones empleados pertenecieron a la categoría sanitaria convencional, fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) junto a sus correspondientes certificados de calidad higiénico-sanitaria y genética. Se usaron ratones machos de la línea Balb/c, de 18-22 g y 6-10 semanas de edad. Estos fueron alojados en cajas T₂ en grupos de cinco animales.

2. Procedimientos de tenencia y manejo: Se mantuvo un régimen de iluminación de 10 h luz y 14 h de oscuridad. La temperatura ambiental fue de 22 ± 2 °C y la humedad relativa de $60 \pm 10\%$. El alimento, suministrado por el CENPALAB, consistió en pienso especializado para ratas y ratones, con sus correspondientes certificados de calidad bromatológica e higiénico-sanitaria. Tanto el alimento como el agua acidulada con ácido clorhídrico a un pH de 2,7-2,9 fueron suministrados *ad libitum*.

El encamado consistió en bagazo del desmeollado de la caña de azúcar, previamente autoclaveado a 121 °C y 1,5 atm de presión. Los cambios se realizaron en días alternos. Los animales fueron sometidos a un período de adaptación nunca menor de siete días, en los locales donde posteriormente serían realizados los ensayos.

3. Ética. Todos los protocolos del ensayo, incluyendo los métodos de eutanasia, estuvieron sometidos a la consideración, análisis y aprobación de la comisión de ética en el ámbito institucional observando además lo establecido por las regulaciones de seguridad biológica.

4. Características químicas de la vacuna VA-MENGOC-BC®. La vacuna VA-MENGOC-BC® está compuesta por proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* del serogrupo B y polisacáridos de *N. meningitidis* del serogrupo C. Cada dosis de 0,5 mL contiene:

Proteínas purificadas de la membrana externa:	50 µg
Polisacárido purificado:	50 µg
Gel de Hidróxido de Aluminio:	2 mg
Tiomersal:	0,05 mg

Cloruro de Sodio:	4,25 mg
Fosfatos:	0,05 mg
Agua para inyección: c.s.p	0,5 mL

5. Características de la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC. Se empleó una Inmunoglobulina Antimeningocócica específica hiperinmune, elaborada por el Instituto Finlay (Ciudad de La Habana, Cuba), cuyo objetivo es comprobar de manera indirecta la eficacia de VA-MENGOC-BC®. Esta tiene las características siguientes:

- Fuente: plasma de donantes voluntarios inmunizados con VA-MENGOC-BC®
- Composición: 50 mg/mL de Inmunoglobulina Antimeningocócica BC estabilizada con albúmina humana
- Título bactericida medio: 1/264
- Actividad específica media: 21 678 U/mL
- Pureza electroforética: Más del 90% de IgG monomérica
- Controles de VIH y del VHB: negativos
- Controles de esterilidad y seguridad: satisfactorios
- Pirogenicidad: apirogénica

6. Germen y preparación de los inóculos: Se realizaron retos con *N. meningitidis* A (NmA, Nigeria A₄ P₁ 9), *N. meningitidis* B (NmB, cepa B385) y *N. meningitidis* C (NmC, ATCC). Se sembraron placas de Agar Mueller-Hinton con las cepas liofilizadas y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ durante 18-24 h. Las colonias formadas fueron inoculadas en 100 mL de caldo Mueller-Hinton ajustado a una densidad óptica inicial de 0,2 y se incubaron en zaranda a 170 rpm y 37 °C durante 6 horas. Transcurrido este tiempo se realizó tinción de Gram y centrifugación del cultivo a 7000 rpm, durante 10 min a una temperatura de 20 °C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet se resuspendió en 25 mL de PBS + Gelatina al 1%, procediéndose a centrifugar nuevamente en las mismas condiciones. Esta vez se resuspendió el pellet en la mitad del volumen, ajustando finalmente la suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^{10} UFC/mL según curva de absorbancia vs. viables previamente estandarizada. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta obtener las concentraciones deseadas (Sotolongo, 1995). La inoculación de las bacterias se realizó por vía intraperitoneal (0,2 mL por animal) simultáneamente a la

administración de factores estimulantes de la virulencia.

7. Factores estimulantes de la virulencia: Para hacer los ratones susceptibles a *N. meningitidis* se administró, intraperitonealmente, en el momento de la inoculación de las bacterias, dextrana férrica (Hierro dextrana, ENSUMEFA, 2 mg de hierro/mL, 0,25 mL) y mucina (Mucina gástrica de cerdo, SIGMA, 8%, 0,4 mL).

8. Observación clínica: Los animales fueron mantenidos en observación después de terminada la inoculación, teniendo en cuenta que las muertes sucedidas durante las primeras 4 h se consideraron debidas a la técnica operatoria. Después, se observaron cada 12 h por espacio de una semana, registrando el número de muertes.

9. Vacunación y reto: Para el estudio de protección con la vacuna se emplearon 240 ratones en total, 80 por serogrupo. De los usados por cada serogrupo, 60 fueron inmunizados: 20 con una dosis de VA-MENGOC-BC® (0,5 mL, intraperitonealmente) e igual cantidad con dos o tres dosis iguales por la misma vía de administración. El intervalo entre la primera y la segunda dosis fue de 21 días, mientras que entre la segunda y la tercera fue de 15 días. Los 20 animales restantes se emplearon como controles no inmunizados. La mitad de los animales fueron retados a los 15 días posteriores a la última inmunización y la otra mitad a los 21 días. En la Tabla siguiente se resume el diseño aplicado para cada serogrupo:

Tratamiento	Número de animales	Número de dosis	Tiempo de reto*
VA-MENGOC-BC®	10	1	15 días
	10	2	
	10	3	
Controles	10	0	
VA-MENGOC-BC®	10	1	21 días
	10	2	
	10	3	
Controles	10	0	

*Tiempo entre la última inmunización y el reto

Para cada serogrupo se realizó en paralelo al reto, la infección experimental de ratones no inmunizados para estimar la DL₅₀. Con este objetivo se utilizaron seis diluciones decimales seriadas de bacterias, inoculándose 10 animales por concentración.

10. Ensayo de Protección con la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC: Para los estudios de protección pasiva con la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC se utilizaron 90 ratones, 30 para cada serogrupo. Se incluyeron 10 controles, 10 tratados por vía intravenosa y los otros 10, por vía intraperitoneal. La vía intraperitoneal se empleó por permitir la administración de grandes volúmenes y la endovenosa por constituir una de las vías de elección para la aplicación del producto en humanos. La Inmunoglobulina Antimeningocócica BC fue administrada 30 min, 2 y 6 h después de la inoculación de 1×10^7 UFC/mL de *N. meningitidis* A, B ó C. Se aplicaron en cada caso 5 mg de la inmunoglobulina en un volumen de 0,1 mL.

11. Procesamiento estadístico: Se realizó el cálculo de la protección (%) teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$P = 100(1 - M_t/M_c)$$

M_t: mortalidad de los tratados

M_c: mortalidad de los controles

La comparación de los tiempos de supervivencia se llevó a cabo mediante la prueba de Log-Rank.

Resultados y Discusión

La protección conferida por VA-MENGOC-BC® frente a NmA en ratones a los 15 días post-vacunación fue considerable, sobre todo a partir de la segunda dosis, llegando a un 83% con la aplicación de tres dosis (Tabla 1). Sin embargo, a los 21 días post-vacunación la protección ascendió al 100% en todas las dosis con una confrontación equivalente a la DL₅₀ (Tabla 2).

Tabla 1. Protección de VA-MENGOC-BC® frente a NmA, 15 días después de la última vacunación

Grupo	Mortalidad (%)	Protección (%)	Tiempo de supervivencia (h)
Control	60a	-	41,9
1 dosis	70b	-16,7	33,7
2 dosis	40c	33,3	56,9
3 dosis	10d	83,3	66,5

Dosis de reto: 1×10^7 UFC/mL, ab: P=0,320, ac: P=0,186, ad: P=0,01

Tabla 2. Protección cruzada de VA-MENGOC-BC® frente a NmA, 21 días después de la última vacunación

Grupo	Mortalidad (%)	Protección (%)	Tiempo de supervivencia (h)
Control	50a	-	48
1 dosis	0b	100	> 72
2 dosis	0b	100	> 72
3 dosis	0b	100	> 72

Dosis de reto: 1×10^7 UFC/mL, ab: P= 0,0049

La dosis letal media de la cepa de NmB (Tabla 3) empleada se estimó en $3,3 \times 10^5$ UFC/mL. Cuando se inocularon 3 x DL₅₀, la protección fue significativa con respecto a los controles no inmunizados, llegando a 87,5% para una dosis y 100% para dos y tres dosis, respectivamente (Tabla 4). Cuando el reto se realizó 21 días después de la última inmunización, la protección se mantuvo a altos niveles que estuvieron entre 75% y 100% (Tabla 5).

Tabla 3. Comportamiento de la mortalidad en el grupo control en tres de las 6 concentraciones utilizadas para calcular la DL50 de *Neisseria meningitidis* tipo B

Concentración UFC	N	Muertos	Mortalidad %
10^5	10	3	30
10^6	10	8	80
10^7	10	9	90

L50 = $3,33 \times 10^5$ UFC/mL, 0,2 mL, IP (límites 95%: 1,91-5,80 $\times 10^5$)

Tabla 4. Eficacia de VA-MENGOC-BC® frente a NmB a los 15 días de la última vacunación

Grupo	Mortalidad (%)	Protección (%)	Tiempo de supervivencia (h)
Control	80a	-	30,9
1 dosis	10b	87,5	66,5
2 dosis	0c	100	72
3 dosis	0c	100	72

Dosis de reto: 1×10^6 UFC/mL (3xDL50), ab: P=0,001, ac: P<0,001, bc: P=0,153

Tabla 5. Efectividad de VA-MENGOC-BC® frente a NmB, a los 21 días de la última vacunación

Grupo	Mortalidad (%)	Protección (%)	Tiempo de supervivencia (h)
Control	80a	-	30,9
1 dosis	0b	100	72
2 dosis	20c	75	56,2
3 dosis	10d	87,5	66,2

Dosis de reto: 1×10^6 UFC/mL (3xDL50), ab: P=0,004, ac: P=0,011, ad: P=0,027

La efectividad de VA-MENGOC-BC® frente a NmC en ratones fue menor que las obtenidas con los otros serogrupos a los 15 días post-vacunación. No obstante, estas estuvieron entre 33,3% y 55,6% (Tabla 6), mientras a los 21 días fueron de 100% para 1 y 2 dosis y de un 60% para tres aplicaciones de la vacuna (Tabla 7).

Tabla 6. Efectividad de VA-MENGOC-BC® frente a NmC a los 15 días de la última dosis

Grupo	Mortalidad (%)	Protección (%)	Tiempo de supervivencia (h)
Control	90a	-	22,4
1 dosis	40b	55,6	51,2
2 dosis	60c	33,3	39,6
3 dosis	40b	55,6	50,6

ab: P=0,01, ac: P=0,061, bc: P=0,19

Tabla 7. Efectividad de VA-MENGOC-BC® frente a NmC, 21 días después de la última dosis

Grupo	Mortalidad (%)	Protección (%)	Tiempo de supervivencia (h)
Control	50a	-	44,5
1 dosis	0b	100	72,0
2 dosis	0b	100	72,0
3 dosis	20c	60	63,3

ab: P<0,005, bc: P=0,068, ac: P=0,080

Con relación a la efectividad de la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC frente a *N. meningitidis* A, B y C en ratones, la protección para los tres serogrupos fue alta; sobre todo cuando la terapia pasiva fue aplicada por la vía intravenosa con niveles de 44,4, 90 y 100%, respectivamente. Sin embargo, por la vía intraperitoneal, los niveles de protección se mantuvieron en 11%, 70% y 50% para los tres

respectivos serogrupos (Tabla 8), en lo que pudo influir la acción más inmediata de los anticuerpos

sobre los gérmenes circulantes en el sistema sanguíneo al usar la vía intravenosa.

Tabla 8. Protección y tiempo de sobrevivencia en ratones retados con *N. meningitidis* A, B ó C y tratados con inmunoglobulina por vía intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV)

Serogrupo	Tratamiento	Mortalidad* (%)	Protección (%)	Tiempo de sobrevivencia (h) *
A	Control	90a	-	23,4a
	IP	80ab	11,1	31,2ab
	IV	50b	44,4	45,0b
B	Control	100a	-	18,0a
	IP	30b	70	57,0b
	IV	10b	90	68,9b
C	Control	100a	-	39,8a
	IP	50b	50	45,4a
	IV	0c	100	72,0b

* Letras distintas indican diferencias significativas para $P < 0,05$

El desarrollo de ensayos inmunológicos que se correlacionen con la protección verdadera producida por estas vacunas constituye uno de los objetivos estratégicos en el plan de investigaciones priorizados por el programa para inmunización y vacunas de la Organización Mundial de la Salud. Esta además propone la utilización de las ratas infantiles en los estudios de la respuesta inmune frente a sueros obtenidos a partir de vacunados con preparados que contienen proteínas de la membrana externa de NmB, comprobando su actividad protectora y comparándola con la actividad bactericida de dichos sueros (6).

Se ha demostrado (7, 8) que las proteínas de *N. meningitidis* reguladas por hierro pueden inducir la producción de anticuerpos bactericidas capaces de proteger a los ratones frente a infecciones experimentales. En tanto el uso de anticuerpos dirigidos contra *Por A* (9), *Por B* y *Opc* (10) y contra LPS (11) ha inducido protección pasiva contra el meningococo en infecciones experimentales. Por otra parte, se plantea (12) la necesidad de focalizar la atención en los antígenos con demostrada habilidad para inducir anticuerpos bactericidas.

Nosotros hemos obtenido resultados satisfactorios en la utilización del biomodelo ratón, tanto en estudios de protección activa con VA-MENGOC-BC® como de protección pasiva con la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC a través de retos efectuados con NmB. No obstante, recientes estudios demuestran la

existencia de inmunidad cruzada entre proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* que incluyen la protección frente a las infecciones experimentales en el ratón (13, 14). En los últimos ensayos llevados a cabo en nuestro laboratorio hemos observado resultados que apoyan estos planteamientos al lograrse adecuados niveles de protección en ratones previamente inmunizados con VA-MENGOC-BC® y confrontados después con cepas del serogrupos A, así como la protección conferida con la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC frente a estas cepas.

Asimismo, se ha obtenido una fuerte inmunogenicidad basada en la presencia de anticuerpos Men-E2p en el suero de humanos y animales frente a cepas homólogas y heterólogas de *N. meningitidis* (15, 16). Por otra parte, se ha demostrado la presencia de inmunidad cruzada en ratones frente a la proteína de 37 KDa (Fbp) de *N. meningitidis* (17) y con proteínas *N. meningitidis* fijadoras de transferrina (18). Resultados similares fueron obtenidos por (19) cuando inmunizaron ratones adultos con polisacáridos de NmB, mientras que (20) encontraron respuesta de anticuerpos bactericidas frente a cepas homólogas y heterólogos de NmB.

Los polisacáridos capsulares pertenecientes a determinados serogrupos conjugados con proteínas resultaron mejores inmunógenos y tuvieron una larga persistencia de anticuerpos específicos contra los aislamientos pertenecientes

a estos serogrupos (21-23). Lo anterior pudiera estar sucediendo en el caso de VA-MENGOC-BC® y la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC, por tanto justificaría en buena medida la respuesta obtenida frente al serogrupo C, toda vez que esta vacuna contiene las proteínas de la membrana externa de *NmB* y el polisacárido del referido serogrupo. Similares hallazgos fueron obtenidos por (24), cuando utilizaron una vacuna obtenida a partir de lipopolisacárido de *E. coli* J5 y proteínas de la membrana externa de *NmB* constatando su protección frente a retos letales con diferentes gérmenes Gramnegativos en ratas (25).

Todo lo anterior nos permite plantear que nuestra vacuna VA-MENGOC-BC® está en mejores condiciones que cualquier otra para enfrentar el reto de una prueba de campo en un país donde las cepas circulantes de *N. meningitidis* fueran diferentes a las del serogrupo B. Los resultados demostraron, mediante sueroterapia con la Inmunoglobulina Antimeningocócica BC y por inmunización activa con VA-MENGOC-BC®, protección frente a retos con *N. meningitidis* A, B y C.

Referencias

- Goldberg WJ, Bernstein JJ. Migration of cultured foetal spinal cord astrocytes into adult host cervical cord and medulla following transplantation into thoracic spinal cord. *J Neurosci Res.* 1988; 19:34-42.
- Buchanan RM, Arulanandam BP, Metzger DW. IL-12 enhances antibody responses to T-independent polysaccharide vaccines in the absence of T and NK cells. *J Immunol.* 1998; 161(10):5525-33.
- Hanaberg B., Dalseg R., Oftung F., et al. Towards a nasal vaccine against meningococcal disease, and prospects for its use as a mucosal adjuvant. *Dev. Biol. Stand.* 1998; 92:127-33.
- Stojiljkovic I., Hwa V., Larsen J., et al. Cloning and characterization of the *Neisseria meningitidis* rfaC gene encoding alpha-1,5 heptosyltransferase I. *Fems Microbiol Lett.* 1995; 151(1):41-9.
- Pérez-Martín O, Lastre-González M, Díaz-Orellana M, Zayas-Vignier C, Caso R, Hernández I, Sierra-González G.: Biodistribution of the Cuban anti-meningococcal vaccine, VA-MENGOC-BC, in Balb/c mice. *Arch. Med. Res. Spring* 1997; 28(1):37-40.
- SAGE. Plan of activities for 1996, including full report of the research and development subgroup session of the meeting of the scientific advisory group of Vaccine Research and development (VRD) elicited Global program for vaccines and immunization. experts June 1999; 12-14.
- Petersson A, Kuipers A.J, Pelzer M, Verhangen EPM, et al. Monoclonal antibodies against the 70-kilodalton iron-regulated protein of *Neisseria meningitidis* are bactericidal and strain-specific. *Infect. Immun.* 1990; 58:3036-3041.
- Danve B, Lissolo L, Mignon M, Dumas P, Colombani PP, Colombani AB, et al. Transferrin-binding protein isolated from *Neisseria meningitidis* protective and bactericidal antibodies. *Laboratory Animals Vaccine.* 1993; 11:1214-1220.
- Frasch CE, Tsai CM, Mocca LF. Outer membrane proteins of *Neisseria Meningitidis*: Structure and importance in meningococcal disease. *Clin. Invest. Med.* 1986; 9:101-107.
- Saukkonen K, Abdillahi H, Poolman JT, Leinonen M. Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1:16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. *Microbiol. Pathogen.* 1987; 3:261.
- Fernández de Cossio M F, Dhlin M, Selander B, Cruz S, Del Valle J, Burrebaeck CA. Human monoclonal antibodies against an epitope on the class 5c outer membrane protein common to many pathogenic strains of *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.* 1992; 166:1322-1328.
- Verheul AF, Kuipers AJ, Braat AK, Dekker HA, Peeters CC, Snippe H, Poolman JT. Development characterization and biological properties of meningococcal immunotype L 3,7 (8), 9 specific monoclonal antibodies. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 1994; 1: 729-736.
- Poolman JT. Clinical trial with outer membrane protein vaccine and Por A recombinant vaccine. 10th International Pathogenic *Neisseria* Conference. Sept. 8-13 1979; Baltimore Maryland. 1996.
- Martin D, Cadieux N, Hamel J, Brodeur BR. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein with different protection against. Experimental infection. *J Exp. Med.* 1997; 185(7):1173-1183.
- Manning DS, Reschke DK, Judd RC. Omp85 proteins of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* are similar to *Haemophilus influenzae* D-15-Ag and *Pasteurella multocida* oma 87. *Microb. Pathog.* 1998; 25 (1):11-21.
- Westerink MA, Giardina PC, Apicella MA, Kieber-Emmons T. Peptide mimicry of the meningococcal group C capsular polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(9):4021-5.
- Ala'Aldeen DA, Westphal AH, De Kok A, Weston V, Atta MS, Baldwin TJ, Bartley J, Borriello SP. Cloning, sequencing, characterization and implications for vaccine design of the novel

- dihydrolipoyl acetyltransferase of *Neisseria meningitidis* *J. Med. Microbiol.* 1996; 45(6):419 - 32 .
18. Gómez JA, Agra C, Ferron L, Powel N, Pintor M, Criado M, Ferreiros CM: Antigenicity, cross - reactivity and surface exposure of the *Neisseria meningitidis* 37 kDa protein (Fbp). *Vaccine.* 1996; 14(14):1340-6
 19. Ferron L, Ferreiros CM, Criado MT, Pintor M. Immunogenicity and antigenic heterogeneity of a human transferrin-binding protein in *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 1992; 60(7):2887-92.
 20. Colino J, Outshoorn I. Dynamics of the murine humoral immune response to *Neisseria meningitidis* group B capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* 1998; 66(2):505-
 21. Christodoulides M, Heckels JE. Immunization with a multiple antigen peptide containing defined B- and T-cell epitopes. Production of bactericidal antibodies against group B *Neisseria meningitidis*. *Microbiology.* 1994; 140 (PL 11): 2951-60.
 22. Costantino PS, Viti A, Podda MA, Velmote L. Mencioni and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C. *Vaccine.* 1992; (10):691-698.
 23. Anderson EL, Bowers T, Menk C, Kennedy DY, Belshe RB, Harakel H, Holder P, Calone GM. Safety and immunogenicity of meningococcal A and C polysaccharide conjugate vaccine in adults. *Infect . Immun.* 1994; (62):3391-3395.
 24. Zakirov MM, Petrov AB, Burkhanov SA, Vartania luP, Torchilin VP, Trubetskoi US et al. The immunological activity of *Neisseria meningitidis* lipo-oligosaccharide incorporated into liposomes. *Zh Mikrobiol. Epidemiol. Immunbiol.* 1995; (1):49-53.
 25. Bhattacharjee AK, Opal SM, Taylor R, Naso R, Semenuk M, Zollinger WD, Moran EE, Young L, Hammack C, Sadoff JC, Cross AS. A noncovalent complex vaccine prepared with detoxified *Escherichia coli* J5 (Rc chemotype) lipopolysaccharide and *Neisseria meningitidis* Group B outer membrane protein Produces protective antibodies against gram-negative bacteremia. *J. Infect. Dis.* 1996; 173 (5):1157-63.

VA-MENGOC-BC® efficacy evaluation in Balb/c mice challenged with serogroups A, B and C

Abstract

There are several animal models for the experimental reproduction of human meningococcal disease. Their usefulness in the evaluation of immunization and therapy, as well as in the pathogenesis of the disease is unquestionable. The present paper describes the assessment of the efficacy of VA-MENGOC-BC® and the Human BC Antimeningococcal Globulin against *Neisseria meningitidis* groups A, B and C using mice treated with iron dextran and mucin as virulence enhancers. Mice were immunized intraperitoneally with one, two or three doses (0.5 mL) of VA-MENGOC-BC®. The time elapsed between the first and a second dose was three weeks and 15 days between the second and the last one. The challenge was performed with lethal doses (1-3xDL₅₀) of *N. meningitidis* A, B or C, 15 or 21 days after the last immunizing dose. In order to test the efficacy of the Human Antimeningococcal Globulin as a means of passive immunization, a different group of mice was treated 30 min, 2 h and 6 h after bacterial inoculation. Five milligrams of globulin were administered intravenously or intraperitoneally to each mouse. Results demonstrated that VA-MENGOC-BC® and the Human BC Antimeningococcal Globulin confer significant protection against a lethal challenge with *N. meningitidis* A, B and C in mice treated with virulence enhancement agents.

Keywords: VA-MENGOC-BC®, Human Antimeningococcal Globulin BC, mouse, mucin, iron dextran, challenge, protection.