

INSTITUTO FINLAY

Inmunogenicidad inducida por la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC® contra la cepa de *N. meningitidis* ATCC C11 en adolescentes después de 12 años de vacunados

Dra. María A. Camaraza,¹ Dr. Rolando Ochoa,² Téc. Aida G. Arnet,³ Dr. Franklin Sotolongo,⁴ Dra. Isabel Martínez,⁵ Dr. Iván Cuevas⁶ y Lic. Dairis Hernández⁷

RESUMEN

Se estudió la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC® contra la cepa ATCC C11 mediante Ensayo Bactericida del Suero y ELISA, a 184 adolescentes de un Politécnico de Ciego de Ávila, que habían sido inmunizados en campañas masivas 12 años antes. Se realizaron extracciones de sangre antes de aplicar la primera dosis (T₀), 4 semanas después de esta (T₁) y 4 semanas después de la segunda dosis (T₂). Después de 12 años de la vacunación, 25 % de los adolescentes presentó títulos bactericidas ³ 1:8 frente a la cepa evaluada. Por ELISA, 78 % mostró una concentración de anticuerpos superior al límite de detección contra el polisacárido capsular del meningococo C. Los porcentajes de seroconversión posterior a la primera dosis fueron 59 por Ensayo Bactericida del Suero y 82 por ELISA. No hubo diferencias significativas (p > 0,05) entre los resultados obtenidos después de la primera y segunda dosis por ambos ensayos. La reinmunización con 2 dosis de la vacuna no provocó hiporrespuesta frente a la cepa ATCC C11 en este grupo de edad.

DeCS: TEST INMUNOLOGICOS; MENINGITIS MENINGOCOCICA; NEISSERIA MENINGITIDIS/ aislamiento&purificación; ELISA; MEMORIA INMUNOLOGICA; VACUNAS/ inmunología.

La enfermedad meningocócica (EM) representa un serio problema de salud en el ámbito mundial.¹ A pesar de los avances alcanzados en el diagnóstico, la disponibilidad de antibióticos y de las mejoras en las unidades de terapia intensiva, uno de cada 10 pacientes con EM invasiva y de 20 a 40 % de los que desarrollan *shock* séptico aún mueren.²

Neisseria meningitidis, bacteria gramnegativa, constituye el agente etiológico de esta enfermedad. Los serogrupos A, B y C de *N. meningitidis* causan el mayor número de casos clínicos de EM.³

Las estrategias fundamentales encaminadas a la prevención de la EM son la quimioprofilaxis y la inmunoprofilaxis, la última constituye el medio por excelencia para este fin. Durante mucho tiempo esta estuvo limitada a los serogrupos A, C, Y y W135, con las vacunas desarrolladas en EE. UU. y Francia.⁴

Debido a la carencia de una vacuna eficaz contra el serogrupo B y por constituir la EM el principal problema de salud en Cuba durante la década de los años 80, entre los años 1982-1988, se desarrolló en Cuba una vacuna antimenin-

¹ Máster en Microbiología Clínica. Investigadora Auxiliar.

² Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular.

³ Técnico en Microbiología.

⁴ Especialista de II Grado en Microbiología. Profesor Asistente.

⁵ Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Titular.

⁶ Máster en Salud Pública. Especialista de I Grado en Epidemiología.

⁷ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.

gocócica contra los serogrupos B y C (VA-MENGOC-BC®) (Campa C, Sierra G. Vacuna contra la enfermedad meningocócica de los grupos B y C. Centro Nacional de Vacuna Antimeningocócica. MINSAP-CUBA. 1989). En 1989, se registra y comienza su aplicación en Cuba en forma de campaña. Posteriormente, en 1991, se incorpora al Programa Nacional de Inmunización para ser aplicada a la población infantil, al cumplir los 3 meses de edad la primera dosis y la segunda a los 5 meses (Aplicación de VA-MENGOC-BC®. Programa Nacional de Inmunizaciones de Cuba. Dirección Nacional de Epidemiología. MINSAP, Ciudad de La Habana, Cuba 1991).

El ensayo bactericida del suero (EBS) está considerado la “prueba de oro” para realizar los estudios de eficacia de vacunas antime-ningocócicas,⁵ teniendo en cuenta que la presencia de anticuerpos bactericidas en el suero, está relacionada de manera inversa con la aparición de la enfermedad.⁶ También se emplean técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) correlacionadas con el EBS por su simplicidad y para facilitar la evaluación de múltiples muestras.⁷

Existen reportes en la literatura donde se plantea que, en niños pequeños, la aplicación de dosis repetidas de vacunas antime-ningocócicas constituidas por polisacárido no conjugado provocan hiporrespuesta.^{8,9} Se han realizado múltiples estudios para evaluar la respuesta inmune en personas vacunadas con la vacuna VA-MENGOC-BC®.¹⁰⁻¹² Pero teniendo en cuenta que uno de los componentes de la vacuna es el polisacárido de una cepa serogrupo C, se considera importante la evaluación de la inducción de hiporrespuesta a este componente ante la aplicación de dosis repetidas; así como el estudio de la respuesta anamnésica inducida por 2 dosis de refuerzo de esta vacuna.

MÉTODOS

Diseño de la investigación: estudio no controlado, prospectivo, abierto para la evaluación de la inmunogenicidad de VA-MENGOC-BC®.

Características de la población estudiada: de un total de 523 estudiantes pertenecientes al Politécnico de Oficios “Rodolfo Ramírez Esquivel” de la Provincia de Ciego de Ávila, se tomaron al

azar la tercera parte de cada grupo. Como los grupos no tenían un tamaño homogéneo, la muestra seleccionada fue de 184 adolescentes sanos, de 15 a 18 años de edad, inmunizados con VA-MENGOC-BC® 12 años antes.

Esquema de vacunación: se aplicó la vacuna antime-ningocócica cubana VA-MENGOC-BC®, siguiendo el esquema de vacunación establecido: 2 dosis de 0,5 mL por vía intramuscular, con un intervalo de 8 semanas entre ambas.

Secuencia de la toma de muestras de sangre: se realizaron 3 extracciones de sangre por vía intravenosa mediante el uso de jeringuillas estériles desechables de 10 mL. La primera muestra fue obtenida antes de administrar la primera dosis (T_0); la segunda 1 mes después de aplicar la primera dosis (T_1) y la tercera, 1 mes posterior a la aplicación de la segunda dosis (T_2). Las muestras de sangre se centrifugaron para la obtención del suero, el cual se conservó a - 20 °C hasta el momento de la realización del EBS y el ELISA.

Cepa utilizada en el EBS: se empleó la cepa homóloga de *N. meningitidis* ATCC C11.

Determinación de la respuesta inmune

EBS: se aplicó el procedimiento descrito por Sotolongo y otros,¹³ siguiendo la metodología del Centro para el Control de Enfermedades (CDC), Atlanta, EE.UU.¹⁴ Esta es una microtécnica basada en la reacción antígeno-anticuerpo mediada por el complemento, donde se puede determinar la capacidad bactericida o lítica del suero humano, al enfrentarlo a una suspensión de meningococo vivo.

Determinación de anticuerpos contra polisacárido capsular del meningococo C (PSC C): se realizó ELISA de tipo indirecto según el método de Nerey y otros;¹⁵ donde los anticuerpos contenidos en la muestra se unen al PSC C acoplados a la fase sólida. Los anticuerpos fueron reconocidos por un conjugado anti IgG humana-fosfatasa alcalina y esta unión se puso en evidencia mediante una reacción enzimática sobre un sustrato que desarrolla color (p-nitrofenil fosfato). A mayor intensidad de color, mayor presencia de anticuerpos en la muestra. Las absorbancias se midieron en un lector de placas ELISA a 405 nm y se transformaron a valores de concentración con un programa desarrollado por el CDC de Atlanta, EE. UU. Los

resultados se expresaron en unidades de IgG por mililitro (U/mL), usando como referencia sueros estándares de anticuerpos IgG contra el polisacárido C. Las muestras con valores de concentración por debajo del límite de detección de los ensayos (367 U/mL) se reportaron como la mitad de este valor.

Procesamiento estadístico: se calcularon la media geométrica (MG) y los intervalos de confianza al 95 % (IC 95 %), después de la transformación logarítmica de los valores de anticuerpos obtenidos en los tiempos estudiados. Se empleó el análisis de varianza para comparar la MG entre los grupos y la prueba exacta de Fisher para evaluar la diferencia entre los porcentajes de seroconversión. Se estimó la seroconversión, definida como el aumento ³ 1:4 de la respuesta inducida por la vacunación con respecto a la basal existente antes de inmunizar; en el caso del EBS se empleó además de este criterio, el análisis de los porcentajes de muestras con títulos ³ 1:8 en cada tiempo analizado.¹⁶ En las pruebas de estimación y de hipótesis usadas se consideró un error de primer tipo $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados de la actividad bactericida en el suero, medida por el EBS, contra la cepa

TABLA 1. Actividad bactericida en suero y concentración de anticuerpos contra *N. meningitidis* ATCC C11, en adolescentes vacunados con VA-MENGOC-BC® 12 años antes. Ciego de Ávila, 2000

Ensayo	No.	MG	IC	³ NC	%
EBS	178	3	2-3	44	25
ELISA	183	826	704-971	143	78

MG: media geométrica, IC = intervalo de confianza 95 %.

Fuente: Base de datos DACTA.

homóloga de *N. meningitidis* ATCC C11 y la concentración de anticuerpos, medidos por ELISA, frente al PSC C se muestran en la tabla 1. Después de 12 años de la inmunización con VA-MENGOC-BC®, 25 % de los adolescentes presentó títulos bactericidas = 1:8 frente a esta cepa y 78 % mostró una concentración de anticuerpos detectables contra el PSC C.

En la tabla 2 se muestran los porcentajes de seroconversión obtenidos, mediante EBS y ELISA, frente a la cepa de *N. meningitidis* ATCC C11. Los resultados del EBS se reflejan, tanto por el criterio empleado habitualmente (aumento en 4 títulos del T_n con respecto al T_0), como por el criterio actual (% de títulos bactericidas ³ 1:8 de los sueros en cada tiempo analizado).

Por EBS, según el primer criterio, posterior a la primera dosis el porcentaje de seroconversión fue 49 y posterior a la segunda 47. Según el criterio actual, los porcentajes de seroconversión resultaron 21 en el T_0 , 59 en el T_1 y 55 en el T_2 . En los resultados de las muestras procesadas mediante ELISA, después de la primera y segunda dosis, se observa que la seroconversión se comportó de manera similar, 82 %. Por ambos criterios y métodos, no existieron diferencias significativas entre los porcentajes de seroconversión obtenidos después de las 2 dosis ($p > 0,05$); esto demuestra que la aplicación de una sola dosis de refuerzo de VA-MENGOC-BC® después de 12 años, indujo una respuesta inmune importante en este grupo de edad. Se pone en evidencia una respuesta anamnésica.

En la tabla 3 se refleja la MG y los IC 95 % de la actividad bactericida sérica frente a la cepa de *N. meningitidis* ATCC C11 y de la concentración de anticuerpos contra el PSC C. Por ambos métodos no existieron diferencias

TABLA 2. Seroconversión frente a *N. meningitidis* ATCC C11 inducida por 2 dosis de VA-MENGOC-BC® en adolescentes. Ciego de Ávila, 2000

Ensayo	No.	Criterio anterior				Criterio actual					
		T_1/T_0 ³ 4		T_2/T_0 ³ 4		T_0 ³ NC		T_1 ³ NC		T_2 ³ NC	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
EBS	111	58*	49	55*	47	23	21	66*	59	61*	55
ELISA	114	93*	82	93*	82						

NC: nivel de corte, T_1/T_0 : incremento en 4 o más del título en el T_1 con respecto a T_0 , T_2/T_0 : incremento en 4 o más del título en el T_2 con respecto a T_0

* $p > 0,05$.

Fuente: Base de datos DACTA.

significativas ($p > 0,05$) entre los valores T_1 y T_2 . Sin embargo, hubo diferencias significativas entre estos 2 tiempos con respecto al T_0 ($p < 0,05$), resultante de la inmunización con VA-MENGOC-BC®.

TABLA 3. Medias geométricas e intervalos de confianza de la actividad bactericida contra la cepa C y del ELISA contra el PSC C, inducida por 2 dosis de VA-MENGOC-BC® en adolescentes. Ciego de Ávila, 2000

Tiempo	ATCC C11			PSC C		
	No.	MG	IC	No.	MG	IC
T_0	111	2	2 - 3	114	786	637 - 971
T_1	111	28	16 - 48	114	9126	7336 - 11353
T_2	111	23	13 - 39	114	8552	6872 - 10642

MG: media geométrica, IC: intervalo de confianza 95 % para EBS.

Fuente: Base de datos DACTA.

DISCUSIÓN

El hecho de encontrar, 12 años después de la vacunación, un número considerable de adolescentes con actividad bactericida en el suero y una concentración de anticuerpos aceptables contra la cepa de *N. meningitidis* serogrupo C, pudiera atribuirse a que VA-MENGOC-BC® es capaz de inducir una respuesta inmune de larga duración. Sin descartar que esta inmunidad puede reforzarse por la exposición a bacterias con poca o ninguna relación taxonómica con el meningococo, pero que poseen epítopes semejantes e inducen anticuerpos con reactividad cruzada frente a este microorganismo.¹⁷ Muchas bacterias entéricas parecen tener reactividad cruzada con los serogrupos A y C, tanto para los antígenos capsulares como para los no capsulares.¹⁸

Delgado y otros¹⁹ llevaron a cabo una investigación en niños de 2 a 6 años de edad en Andalucía, con el objetivo de medir la respuesta inmune inducida por la vacuna antimeningocócica de PSC AC y compararla con la inmunidad natural presente en niños no vacunados. Al mes y a los 2 meses posteriores a la vacunación, la proporción de títulos bactericidas 3 1:8 fue significativamente superior en los vacunados (65,5 y 73,9 %) con respecto al grupo control (2,2 y 12 %). A los 6, 7, 12 y 13 meses no se observaron diferencias entre ambos grupos. Los autores concluyeron que, la actividad bactericida adquirida por la aplicación de esa vacuna declinó rápidamente en este grupo de edad.

Algunos autores expresan que, la administración de varias dosis de vacunas antimeningocócicas constituidas por antígenos polisacáridicos, en niños pequeños, provoca una hiporrespuesta.^{8,9}

MacDonald y otros⁹ realizaron un estudio controlado, aleatorio, con el objetivo de evaluar la inducción de memoria inmunológica en niños de 15 a 23 meses de edad. Un grupo recibió 2 dosis (intervalo de 2 meses entre ambas) de una vacuna antimeningocócica C conjugada (*Chiron Corp*, Emeryville, California) y al otro grupo le administraron 2 dosis (intervalo de 2 meses entre ambas) de una vacuna cuatrivalente antimeningocócica de polisacáridos. Transcurrido 1 año se le aplicó una dosis de la segunda vacuna a todos los niños de ambos grupos. En los que habían recibido la vacuna conjugada se puso en evidencia una respuesta considerable de anticuerpos (IgG) frente al polisacárido C, después de aplicada esta última dosis. Sin embargo, en los que recibieron las 3 dosis de la vacuna cuatrivalente los resultados mostraron una hiporrespuesta.

Los mismos autores realizaron una extensión del estudio, donde incluyeron a los niños que habían recibido las 3 dosis de la vacuna cuatrivalente antimeningocócica. Incluyeron, además, el grupo al que le habían aplicado 2 dosis de una vacuna anti-hepatitis B y transcurrido 1 año se le había administrado una dosis de la vacuna cuatrivalente antimeningocócica. Todos los niños recibieron una dosis de la vacuna antimeningocócica C conjugada. Se tomaron muestras de suero antes y 1 mes después de la inmunización. La vacuna conjugada indujo títulos de anticuerpos bactericidas 3 1:8 en la mayoría de los niños en ambos grupos. Sin embargo, a los 50 meses de edad, aún se evidenció una hiporrespuesta frente al polisacárido C en los niños donde se había encontrado hiporrespuesta a los 34 meses. El mecanismo molecular de este comportamiento es aún desconocido.²⁰

Sin embargo, los resultados de esta investigación demostraron que, tanto por EBS como por ELISA, la reinmunización con 2 dosis de VA-MENGOC-BC®, 12 años después de aplicado el primer esquema de vacunación, no indujo hiporrespuesta frente a la cepa de *N. meningitidis* ATCC C11 y al PSC C en el grupo de adolescentes estudiado. Debe tenerse en cuenta que, aunque el

PSC en esta vacuna no está conjugado covalentemente a una proteína portadora, su interacción con las vesículas de membrana externa pudiera explicar este comportamiento.

SUMMARY

The antibodies' response induced by the VA-MENGOC-BC® Cuban antimeningococcal vaccine against the ATCC C11 strain was studied by Bactericidal Serum Trial and ELISA among 184 adolescents from a polytechnic, in Ciego de Ávila, that had been immunized in mass campaigns 12 years before. Blood samples were taken before administering the first dose (T_0), 4 weeks later (T_1), and 4 weeks after the second dose (T_2). 12 years after vaccination, 25 % of the adolescents presented bactericidal titers $\geq 1:8$ against the evaluated strain. 78 % showed a concentration of antibodies over the limit of detection against the meningococcus C capsular polysaccharide. The percentages of seroconversion after the first dose were 59 by Bactericidal Serum Trial and 82 by ELISA. There were no significant differences ($p > 0.05$) between the results obtained after the first and second dose by both trials. The reimmunization with 2 doses of the vaccine did not cause hyporesponsiveness against the ATCC C11 strain in this age group.

Subject headings: IMMUNOLOGIC TESTS; MENINGITIS; MENINGOCOCCAL; NEISSERIA MENINGITIDIS/ isolation&purification; ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY; IMMUNOLOGIC MEMORY; VACCINES/ immunology.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Solberg CO. Infecciones meningocócicas. En: Fauci AS, Braunwal E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martín JB, Kasper DL *et al* (eds). Harrison. Principios de Medicina Interna. 14ª ed. vol. 1. McGraw-Hill-Interamericana 1998.p.1040-5.
- Havens PL, Garland JS, Brook MM, Dewitz BA, Stremski ES, Troshynski TJ. Trends in mortality in children hospitalized with meningococcal infections, 1957 to 1987. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:8-11.
- Schwartz B, Moore PS, Broome CV. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(Suppl.):118-24.
- Frasch CE. Meningococcal vaccines: past, present and future. In: Cartwright K, ed. *Meningococcal disease*. Chinchester, Jhn Wiley & Sons; 1995.p.245-83.
- Griffiss JM. Mechanisms of Host Immunity. In: Cartwright K, ed. *Meningococcal disease*. Chinchester, John Wiley & Sons Ltd; 1995.
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 1969;129(6):1307-26.
- Holst J, Feiring B, Fuglesang JE, Hoiby EA, Nokleby H, Aaberge IS. Serum bactericidal activity correlates with the vaccine efficacy of outer membrane vesicle against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Vaccine* 2003;21:734-7.
- Leach A, Twumasi PA, Kumah S. Induction of immunologic memory in Gambian children by vaccination in infancy with group A plus group C meningococcal polysaccharide protein conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1997;175:200-4.
- 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;280:1685-9.
- Regueira M, Palmeiro S, Gutiérrez M, Malberty A, Sotolongo PF, García AM. Estudio de cepas de *N. meningitidis* circulantes en Argentina 1991-1993 y ensayos de sueros de vacunados con la vacuna antimeningocócica de origen cubano contra cepas de los diferentes serotipos y subtipos causantes de la enfermedad. *Rev Hosp Niños Buenos Aires* 1994;36(158/159):249-54.
- Echeverry ML, Malberty JA, Galeano ML, Sotolongo PF, Galguera MA, Montoya BC. Respuesta inmune humoral al polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C en un ensayo de vacunación antimeningocócica BC en Antioquia, Colombia. *Bol Ofic Sanit Panam* 1995;118(4):295-301.
- Fernández JA, Malberty JA, Sotolongo PF, Bacallao GJ, Camaraza MA, Nerey OM *et al*. Cinética de la respuesta de anticuerpos bactericidas y de la IgG específica en individuos vacunados con VA-MENGOC-BC®. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1997;13(1): 38-45.
- Sotolongo F. *Neisseria meningitidis*: aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. La Habana: Ediciones Finlay, Instituto Finlay; 1995. Serie monográfica.
- Maslanka SE, Gheesling LL, Libutti DE, Donaldson KB, Haraek HS, Dykes JK. Standarization and a multilaboratory comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup A and C serum bactericidal assays. The multilaboratory Study Group. *Clin Diag Lab Immunol* 1997;4:156-67.
- Nerey M, Ochoa R, Martínez JC, Licea T, Ferriol X, García AM *et al*. ELISA para la cuantificación de IgG humana antipolisacárido C de *N. meningitidis* Biotecnología Habana'97. *Av Biotecnol Mod* 1997 Dic 1-6;4:C30.
- Gray SJ, Carr AD, Rigde AG, Makenna J, Kaczmarek EB, Clarke SC *et al*. En: Caugant D, Wedege E (eds). Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* isolates collected from UK 15-18 years old at the time of introduction of serogroup C polysaccharide conjugate vaccine and one year post vaccine. *Proceeding of the 13th International Pathogenic Neisseria Conference*; 2002. September 1-6; Oslo: Division of Infectious Disease Control; 2002:346.
- Kasper DL, Winkelhake JL, Zollinger WD, Brandt BL, Artenstein MS. Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* 07:K1(L): NM and group B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 1973;110:262-8.
- Robbins JB, Schneerson R, Liu TY, Schiffer MS, Schiffman G, Myerowitz RL. Cross-reacting bacterial antigens and immunity to disease caused by encapsulated bacteria. In: E. Neter and F. Milgram (eds), *The immune system and infectious diseases*. S. Karger, Basel. 1974. p.141-218.
- Delgado E, Berrón S, García J, González J, Martínez F. Actividad bactericida frente a *Neisseria meningitidis* C en población vacunada y no vacunada en Andalucía. *Rev Esp Salud Públ* 1998;72(5):407-10.
- MacDonald NE, Halperin SA, Law BJ, Danzig LI, Granoff DM. Can meningococcal C conjugate vaccine overcome immune hyporesponsiveness induced by previous administration of multiple doses of plain polysaccharide vaccine?. *JAMA* 2000;283:1826-7.

Recibido: 3 de julio de 2003. Aprobado: 3 de noviembre de 2003.

Dra. María A. Camaraza. Instituto Finlay. Avenida 27 No. 19805, La Lisa. AP 16017, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 208 6075; Teléfono: (53-7) 202 0986; Correo electrónico: camaraza@finlay.edu.cu