



Universidad de Santiago de Compostela
Departamento de Microbiología y Parasitología

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y GENÉTICA DE LA PROTEÍNA
P47 DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*:
UNA ALTERNATIVA PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA
ANTIMENINGOCÓCICA UNIVERSAL**

Memoria presentada por **Jesús A. Arenas Busto**
Para optar al Grado de Doctor en Biología

Santiago de Compostela, marzo 2006

D. Carlos Ferreirós Domínguez, Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela y **D^a Sandra Sánchez Poza**, Dra. en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN: Que la presente tesis doctoral, titulada “**Caracterización molecular y genética de la proteína P47 de *Neisseria meningitidis*: una alternativa para el desarrollo de una vacuna antimeningocócica universal**”, que para optar al grado de Doctor en Biología presenta D. Jesús A. Arenas Busto, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología de esta universidad y, hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, marzo 2006

Carlos Ferreirós Domínguez

Sandra Sánchez Poza

AGRADECIMIENTOS

Necesitaría más que esta hoja para expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este trabajo. Sin embargo, continuando las formas preestablecidas lo abrevio del siguiente modo:

A mis directores, Dr. Sandra Sánchez Poza y Prf. Carlos Ferreirós Domínguez, por comprometerse conmigo en este proyecto, su constante dedicación y los continuos y enriquecedores debates sobre los resultados o el curso de las investigaciones.

A la Profesora M^a Teresa Criado Álvarez (principal motor de nuestro laboratorio), por su constante y continua contribución en las labores de dirección y en la corrección de esta memoria, además de sus consejos, ánimos, simpatía ... que ha mostrado conmigo todo este tiempo.

Al Profesor Ernesto Cano Rubio del Departamento de Farmacología por sus instrucciones y consejos en los estudios realizados en citometría de flujo. Al Departamento de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III por su colaboración en el tipado de las cepas y también a Juan Carlos por la secuenciación desinteresada de ciertos fragmentos. Al Dr. Pizza Mariagrazia, por el envío de material biológico utilizado en nuestros ensayos. Sin restar ni una pizca de importancia, además:

A mis compañeros de laboratorio Ana, Sandra y Javier por su apoyo humano, las horas compartidas y sus ayudas en el laboratorio. A Soly, Manuel, Hipólito, Fito o Miguel Ángel, entre otros ya que son muchos, compañeros de estudio y pasillos, que sencillamente han hecho más ameno muchas horas de laboratorio.

Como no, a mis padres, igual que tantos otros verdaderos impulsores de la investigación en nuestro país, pero en mi caso: por su amor, sacrificio, confianza, proporcionarme el tiempo necesario que el trabajo me requería, así como por su apoyo económico en ciertos momentos.

A Fátima, también por esto último, además de la paciencia y el cariño que ha tenido conmigo en los momentos difíciles. Ah!, también a mi hermano.

Sinceramente, a todos **Gracias**.

La realización de este trabajo fue posible gracias a:

- La concesión de una Beca Predoctoral de la Xunta de Galicia
- Las subvenciones obtenidas de la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento. Xunta de Galicia (cod. PGIDT 01B1020301PR)

Relación de artículos publicados y en proceso de publicación como resultado del desarrollo de esta tesis doctoral:

Sandra Sánchez, Ana Abel, Jesús Arenas, María Teresa Criado, Carlos M. Ferrerirós. 2006. Cross-linking analysis of antigenic outer membrane protein complexes of *Neisseria meningitidis*. *Research in Microbiology*, 157: 136-142

Jesús Arenas, Ana Abel, Sandra Sánchez, Belén Alcalá, María Teresa Criado y Carlos Ferrerirós. 2006. Flow cytometry analysis of the cross-reactivity and surface accessibility of a conserved 47 kDa antigen in *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria*. *Research in Microbiology*. Sometida

Jesús Arenas, Ana Abel, Sandra Sánchez, María Teresa Criado y Carlos Ferrerirós. Analysis of the genetic and molecular diversity of the P47 lipoprotein of *Neisseria*: correlation with antigenic variability. En preparación

Las secuencias nucleotídicas obtenidas en esta Tesis serán depositadas en las bases de datos universales del “GenBank”

Indudablemente,
a mis Padres
y a Fátima

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	9
 1. ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA	
1.1 Características diferenciales del agente causal: <i>Neisseria meningitidis</i>	11
1.2 Características de la enfermedad y su epidemiología.....	12
1.2 a Desarrollo de la infección.....	12
1.2 b Epidemiología.....	15
1.3 Tratamiento, prevención de la enfermedad y vacunas antimeningocócicas disponibles.....	18
1.3 a Tratamiento.....	18
1.3 b Quimioprofilaxis.....	19
1.3 c Inmunoprofilaxis: vacunas disponibles.....	20
 2. NUEVAS APROXIMACIONES EN EL DESARROLLO DE VACUNAS: FUTURO DE LAS VACUNAS ANTIMENINGOCÓCICAS	
2.1 Papel de la genómica en el diseño vacunal.....	27
2.1 a La tecnología del ADN recombinante.....	29
2.1 b La tecnología genómica.....	34
2.2 La búsqueda del antígeno universal: <i>N. meningitidis</i>	42
2.2 a Características generales del antígeno ideal.....	43
2.2 b Variabilidad genética y molecular de los candidatos: relación con su antigenicidad.....	44
2.2 c Capacidad protectora: La actividad bactericida del suero.....	46
2.2 d Candidatos vacunales contra la meningitis meningocócica.....	48
 3. IMPORTANCIA DE LA PRESENTACIÓN DE LOS ANTÍGENOS EN EL DISEÑO DE UNA VACUNA EFECTIVA	
3.1 Exposición de antígenos: papel de las estructuras externas.....	60
3.1 a La citometría de flujo como técnica analítica en microbiología.....	62
3.1 b Análisis y detección de antígenos por FCM. Ventajas e inconvenientes de su uso.....	65
3.2 La conformación del antígeno: Implicación en la inducción de la protección.....	69

	Página
OBJETIVOS	75
MATERIAL Y MÉTODOS	79
1. CEPAS BACTERIANAS	
1.1 Origen y caracterización	81
1.2 Condiciones de cultivo y conservación	81
1.2 a Preparación de los inóculos	81
1.2 b Cultivo en medio líquido Mueller-Hinton	82
2. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS COMPLETOS DE MEMBRANA EXTERNA	
2.1 Extracción de vesículas de membrana externa y fijación	84
2.2 Fijación celular	85
2.3 Permeabilización con etanol	85
3. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS Y DE ELECTROTRANSFERENCIA	
3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	86
3.2 Electrotransferencia a membranas de PVDF	87
3.3 Immunoblotting	88
4. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO DE 47 kDa	
4.1 Extracción mediante Tritón X-114	89
4.2 Separación y detección de las proteínas extraídas con Tritón X-114	90
4.3 Elución a partir de geles de poliacrilamida y concentración del eluato	90
4.4 Identificación del antígeno de 47 kDa: Análisis por MALDI-TOF y reconocimiento de su contexto genómico	91
5. OBTENCIÓN DE SUEROS INMUNES	
5.1 Obtención de sueros en ratón	92
5.2 Obtención de sueros en conejo	93
6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN ANTIGÉNICA MEDIANTE INMUNOENSAYO EN FASE SÓLIDA	
6.1 Detección de la respuesta antigénica frente a proteínas desnaturalizadas	94
6.2 Detección de la respuesta antigénica frente a las proteínas nativas	95

	Página.....
7. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	
7.1 Unión del antisuero a células enteras.....	96
7.2 Condiciones de lectura y análisis de datos.....	98
8. ENSAYOS DE “CROSSLINKING” CON FORMALDEHIDO.....	99
9. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>p47</i>	
9.1 Preparación del ADN.....	100
9.2 Reacción de amplificación.....	101
9.3 Purificación del producto amplificado.....	102
9.4 Reacciones de secuenciación.....	103
9.5 Reconstrucción y análisis de las secuencias nucleotídicas del gen <i>p47</i>	104
10. PREDICCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA PROTEÍNA P47	
10.1 Estructura primaria.....	105
10.2 Reconocimientos de estructuras superiores.....	105
10.3 Predicción de epitopos lineales.....	105
11. ENSAYO DE ACTIVIDAD BACTERICIDA.....	107
12. APÉNDICES	
12.1 Medios de cultivo.....	109
12.2 Tinciones de proteínas separadas por SDS-PAGE.....	109
12.3 Tampones.....	111
RESULTADOS.....	115
1. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO DE 47 kDa	
1.1 Extracción de OMPs mediante Tritón X-114 y purificación por elución a partir de geles de poliacrilamida.....	117
1.2 Identificación del antígeno de 47 kDa.....	122
1.3 Contexto genómico de la proteína P47.....	124
2. CARACTERIZACIÓN DE SUEROS INMUNES	
2.1 Titulación de los sueros de ratón.....	126
2.2 Titulación de los sueros de conejo.....	126

	Página
3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y ANTIGENICIDAD DE LA PROTEÍNA P47	
3.1 Reactividad contra las proteínas de la membrana externa desnaturalizadas.....	129
3.2 Reactividad contra las proteínas de la membrana externa en condiciones nativas.....	132
3.3 Ensayos de accesibilidad de la proteína P47 en dot blotting.....	134
4. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO	
4.1 Optimización del ensayo.....	136
4.2 Distribución de las poblaciones del meningococo con los sueros inmunes.....	139
4.3 Respuesta cualitativa de las poblaciones a los sueros de conejo.....	141
4.4 Cuantificación de la reactividad de la totalidad de la población.....	144
4.5 Análisis de la accesibilidad a la proteína P47 en FCM.....	146
5. ENSAYOS DE “CROSSLINKING” CON FORMALDEHÍDO	151
6. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>p47</i>	
6.1 Detección del gen.....	153
6.2 Optimización del ensayo de secuenciación.....	155
6.3 Análisis de la microheterogeneidad genética.....	167
7. PREDICCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA PROTEÍNA P47	
7.1 Estructura primaria: análisis de microheterogeneidad	171
7.2 Estructura secundaria y patrones de reconocimiento	175
7.3 Modelos y deducciones de estructuras superiores	181
7.4 Predicción de epítomos lineales.....	181
7.5 Correlación entre la divergencia molecular y antigénica y la unión del suero anti-P47 a la célula entera mediante FCM.....	184
8. ACTIVIDAD BACTERICIDA.....	185
DISCUSIÓN.....	187
CONCLUSIONES.....	225
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	229

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Diferentes técnicas empleadas para el diseño de vacunas.....	30
Figura 2.- Patrón antigénico con suero de ratón homólogo anti-OMVs de la cepa Nm30 de las fases obtenidas tras la extracción con Tritón X-114 de OMPs de la misma cepa	118
Figura 3.- Patrón antigénico con suero de ratón homólogo anti-OMVs de la cepa B16B6 de las fases obtenidas tras la extracción con Tritón X-114 de OMPs de la misma cepa	119
Figura 4.- Western blot, con suero de ratón homólogo anti-OMVs de la cepa Nm30, de diferentes diluciones de la fase detergente extraída con Tritón X-114, del antígeno de 47 kDa purificado y OMVs obtenidas de la cepa Nm30.....	120
Figura 5.- Reacción antigénica del suero de conejo específico anti-P47 con las fases obtenidas tras la extracción con Tritón X-114 de OMPs de la cepa Nm30	121
Figura 6.- Espectro y cota de masas obtenidas por MALDI-TOF de los fragmentos peptídicos resultantes de la digestión triptica del antígeno de 47 kDa.....	122
Figura 7.- Ubicación del gen <i>p47</i> según el mapa genómico de la cepa <i>Neisseria meningitidis</i> Z2491 disponible en el “GenBank”.....	125
Figura 8.- Titulación en dot-blotting de los sueros de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 correspondientes a la tercera y última extracción de sangre.....	127
Figura 9.- Determinación de la dilución de trabajo de los sueros de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 obtenidos después del sangrado final.....	128
Figura 10.- Especificidad de la unión del suero de conejo anti-P47 en western blotting frente a células enteras de <i>N. meningitidis</i> , <i>N. sicca</i> , <i>N. subflava</i> y <i>N. lactamica</i>	130
Figura 11.- Reactividad cruzada del suero anti-OMVs de la cepa Nm30 con células enteras formalinizadas de cepas invasivas y aisladas de portadores de <i>N. meningitidis</i>	131
Figura 12.- Detección mediante inmunoensayo en fase sólida de la unión de los sueros de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 frente a células enteras formalinizadas de diferentes <i>Neisserias</i>	133
Figura 13.- Ensayos de accesibilidad por dot blotting de la hipotética lipoproteína P47 en células enteras formalinizadas, permeabilizadas o no, de <i>N. meningitidis</i> , <i>N. sicca</i> , <i>N. subflava</i> y <i>N. lactamica</i>	135
Figura 14.- Especificidad del suero anti-OMVs de la cepa Nm30 frente a células de <i>N. meningitidis</i> B16B6 fijadas con formaldehído o con glutaraldehído bloqueadas con Blotto® mediante ensayos en FCM.....	137
Figura 15.- Reactividad de diferentes diluciones de los sueros inmunes de conejo anti-OMVs de la cepa Nm30 y anti-P47 con células fijadas con formaldehído o glutaraldehído.....	137
Figura 16.- Comparación de la reactividad del suero anti-P47 en ensayos en FCM con células de la cepa <i>N. meningitidis</i> Nm30 sin fijar, fijadas con formaldehído y muertas por calor y luego fijadas.....	138
Figura 17.- Modelos de distribución de poblaciones de <i>N. meningitidis</i> tras la reacción con los sueros de conejo en función de la fluorescencia emitida y el ángulo de refracción SSC.....	140
Figura 18 y 18bis- Reactividad de los sueros de conejo anti-P47, anti-OMVs de la cepa Nm30 y suero no inmune frente a diferentes células fijadas con formaldehído de diferentes <i>Neisserias</i> en FCM.....	142-143

	Página
Figura 19.- Promedio de la intensidad de fluorescencia emitida por las poblaciones celulares fijadas con formaldehído de diferentes <i>Neisserias</i> con los sueros inmunes de conejo analizada por FCM...	144
Figura 20.- Variabilidad interpoblacional en la reactividad de los sueros anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 a células enteras fijadas con formaldehído de diferentes <i>Neisserias</i> en FCM.....	148
Figura 21.- Variabilidad intrapoblacional en la reactividad de los sueros anti-P47 y anti-OMVs a células enteras fijadas con formaldehído de diferentes <i>Neisserias</i> en FCM.....	149
Figura 22.- Efecto de la fijación o no con formaldehído tras la permeabilización de las células de <i>N. meningitidis</i> en la unión de los sueros anti P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 en FCM.....	150
Figura 23.- Diferencias en la accesibilidad del antígeno entre células enteras permeabilizadas o no con etanol y posteriormente fijadas con formaldehído en FCM.....	150
Figura 24.- Patrón electroforético y revelado con suero anti-P47 de células formalinizadas, células sin formalinizar y OMVs formalinizadas de la cepa Nm30 tratadas a 37°C y a 95°C durante 20 minutos	152
Figura 25.- Detección del gen <i>p47</i> en todas las cepas mediante amplificación por PCR.....	154
Figura 26.- Lugar de hibridación de los distintos cebadores según los locus NMA0280, NMA0281, región no codificante y NMA0282.....	157
Figura 27.- Perfil electroforético del producto del PCR de los fragmentos P47.1, P47.1-2, P47.3.....	160
Figura 28.- Perfil electroforético del producto del PCR de los fragmentos P47.4	161
Figura 29 y 29 bis.- Secuencia completa del gen <i>p47</i> en distintas cepas	162-167
Figura 30.- Similitud del gen <i>p47</i> secuenciado en distintas cepas.....	170
Figura 31.- Similitud de las variantes deducidas de la proteína P47 en distintas cepas.....	172
Figura 32 y 32 bis.- Secuencia completa de la proteína P47 en distintas cepas	173-174
Figura 33 y 33 bis.- Predicción de la estructura secundaria a partir de la secuencia de aminoácidos.....	177-178
Figura 34.- Perfil de hidrofobicidad de diferentes secuencias aminoacídicas y predicción de segmentos transmembrana.....	179
Figura 35.- Patrón de reconocimiento de dominios de la variante V de la proteína P47 y predicción del tipo de péptido señal y la región de corte para lipoproteínas	180
Figura 36.- Modelos estructurales deducidos para distintas variantes de P47.....	182
Figura 37.- Expresión de la lipoproteína P47 en células resistentes a la acción bactericida del suero anti-P47 evaluada mediante dot blotting	186

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1.- Vacunas disponibles en la actualidad contra los diferentes serogrupos de <i>N. meningitidis</i>	21
Tabla 2.- Ventajas e inconvenientes de las vacunas recombinantes.....	33
Tabla 3.- Características de la vacunología convencional y reversa en el desarrollo de vacunas.....	36
Tabla 4.- Características de distintas estructuras subcapsulares de <i>N. meningitidis</i> para su inclusión en una vacuna anti-meningocócica.....	59
Tabla 5.- Características de las cepas incluidas en el presente estudio.....	83
Tabla 6.- Condiciones del proceso de PCR utilizadas para la detección y secuenciación del gen <i>p47</i>	102
Tabla 7.- Condiciones del proceso de amplificación/marcaje de diferentes productos de PCR para su secuenciación.....	104
Tabla 8.- Servidores utilizados para el reconocimiento de diversas estructuras y características moleculares del antígeno de 47 kDa.....	106
Tabla 9.- Semejanza entre proteínas identificadas, secuenciadas y anotadas en el “GenBank” y los péptidos digeridos del antígeno de 47 kDa.....	123
Tabla 10.- Titulación por dot blotting de los sueros de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30.....	127
Tabla 11.- Características de los cebadores utilizados para la detección y secuenciación del gen <i>p47</i>	156
Tabla 12.- Combinación de cebadores y temperatura óptimas de anillamiento para la amplificación específica de fragmentos del gen <i>p47</i>	158
Tabla 13.- Relación de cepas portadoras de los distintos alelos del gen <i>p47</i> , grupos alélicos y variantes proteicas.....	169
Tabla 14.- Epitopos lineales comunes a la variante V de la proteína P47 en diferentes variantes.....	183
Tabla 15.- Actividad bactericida de los sueros inmunes anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 contra cepas <i>N. meningitidis</i>	186

LISTA DE ABREVIATURAS

ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCM	Flow cytometry (citometría de flujo)
FetA	Ferric enterobactin A (receptor de la enterobactina férrica A)
GAMBIT	Genome analysis and mapping by in vitro transposition (análisis y mapeo del genoma por transposición in vitro)
GNA	Genome-derived neisserial antigens (antígenos derivados del genoma)
IVET	in vitro expresión technology (tecnología de expresión in vivo)
IVIAT	in vivo induced antigen technology (tecnología de antígenos inducidos in vivo)
LbpA	Lactoferrin binding protein A (proteína de unión a lactoferrina A)
LbpB	Lactoferrin binding protein B (proteína de unión a lactoferrina B)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LOS	Lipooligosacáridos
LPS	Lipopolisacáridos
MH	Medio líquido Mueller-Hinton
MH/Desferal	Medio líquido Mueller-Hinton con Desferal
MLEE	Multi Locus Enzyme Electrophoresis
MLST	Multi Locus Sequence Typing
NadA	Neisseria adhesin antigen
NhhA	Neisseria hia homologue antigen
NspA	Neisserial surface protein A (proteína de superficie de Neisseria)
OMPs	Outer membrana proteins (proteínas de la membrana externa)
OMVs	Outer membrana vesicle (vesículas de membrana externa)
Opa	Opacity protein (proteína de opacidad)
Opc	Opacity protein (proteína de opacidad)
ORF	Open Reading Frame (marco de lectura abierta)
PBS	Phosphate buffer saline (tampón fosfato salino)
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride (fluoruro fenilmetanosulfónico)
PorA	Porin A (porina A)
PorB	Porin B (porina B)
PVDF	Polyvinilidene difluoride (difluoro de polivinilideno)
RIVET	Recombination based in vivo expresión technology (recombinación basada en la tecnología de expresión in vivo)
RmpM	Reduction modifiable protein M (proteína modificable por reducción)
SBA	Serum bactericidal activity (actividad bactericida del suero)
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en geles de archilamida en presencia de dodecilsulfato sódico)
SNC	Sistema nervioso central
STM	Signature-tagged mutagenesis
TBS	Tris buffer saline (tampón tris salino)
TbpA	Transferrin binding protein A
TbpB	Transferrin binding protein B
TCA	Tricloroacetic acid (ácido tricloroacético)
TEMED	N, N, N',N'-tetrametilendiamina
TraSH	Transposon site hybridization

sueros

SNI	Suero no inmune
Suero anti-P47	Suero obtenido contra la proteína P47 de la cepa <i>N. meningitidis</i> Nm30
Suero anti-OMVs de la cepa Nm30	Suero obtenido contra OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> Nm30
Suero anti-OMVs de la cepa B16B6	Suero obtenido contra OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> B16B6

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA

1.1 Características diferenciales del agente causal: *Neisseria meningitidis*

En 1887 el anatómo-patólogo Anton Weichselbaum¹ realizó el primer aislamiento del agente causal de la enfermedad meningocócica denominándolo *Diplokokkus intracellularis meningitidis*, más tarde renombrado como *Neisseria meningitidis*. Desde el punto de vista taxonómico, la primera edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology² lo ubicó en el género *Neisseria* situado en la sección IV, constituida por cocos y bacilos gram negativos aerobios. La nueva tendencia en clasificación de microorganismos basada en las secuencias genéticas del ARN ribosómico 16S, que recoge la segunda edición del manual, sitúa este género en la clase β del *phylum* proteobacterias. Las bacterias incluidas en este *phylum* se caracterizan por una morfología, fisiología y metabolismo muy variable.

Las especies del género *Neisseria* colonizan las membranas mucosas de los mamíferos y solamente dos son patógenas para el hombre: *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Todas las especies presentan morfología cocoide con un diámetro de 0,6-1 μm formando con mayor frecuencia parejas con el lugar de adhesión más achatado y, en algunas especies, agrupándose en cadenas cortas o tétradas. Características fisiológicas y bioquímicas como la degradación de carbohidratos facilitan su diferenciación.

La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 35°C-37°C y el pH entre 7,4-7,6. En todas las especies el crecimiento se favorece con una humedad relativa del 50% y, en *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* con una concentración de dióxido de carbono entre 3-10%.

¹ **Weichselbaum A.** 1887. Ueber die aetiologie der akuten meningitis cerebror spinalis. *Fortschr Med*, 5: 573-583

² **Vedros NA.** 1984. Genus I. *Neisseria* Trevisan 1885, 105^{AL}. Krieg RN y Holt GJ (eds). En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, p 290. Williams and Wilkins, Baltimore, London

La cantidad de guanina y citosina (G+C) oscila entre 50-52% en *N. meningitidis*, 48-51% en *N. subflava* y 49-51% en *N. sicca*. *N. lactamica* contiene un 51,7%.

La caracterización de cepas del meningococo es crucial para analizar los factores que regulan su comportamiento epidémico y ha ido acompañado del desarrollo, primero, de técnicas inmunológicas y, más tarde, de técnicas genético-moleculares. La divergencia antigénica del polisacárido capsular, las proteínas mayoritarias de Clase, PorB y PorA (detalladas en el apdo. 2.2.b) y los lipooligosacáridos (LOS) facilitaron su caracterización en *serogrupo*, *serotipo*, *serosubtipo* e *inmunotipo*, respectivamente. Los nuevos métodos de clasificación permiten un análisis más acertado de la naturaleza de los cambios evolutivos que ha sufrido el microorganismo: la movilidad electroforética de diferentes enzimas citoplasmáticas (MLEE), la comparación de secuencias multilocus (MLST) o la electroforesis de campo pulsado (PFGE). En este caso los aislados son agrupados en complejos de clones, constituidos por cepas muy próximas genéticamente con un probable origen común. Cada complejo incluye diferentes linajes que agrupan los aislados con un perfil similar³.

1.2 Características de la enfermedad y su epidemiología

1.2.a Desarrollo de la infección

N. meningitidis es una especie comensal del tracto respiratorio superior del hombre. La bacteria coloniza la nasofaringe de una parte de la población transmitiéndose por contagio directo mediante aerosoles. La colonización no es en sí misma peligrosa (hasta un 10% de la población es portadora en épocas

³ **Maiden MC y Frosch M.** 2001. Molecular techniques for the investigation of meningococcal disease epidemiology. *Mol Biotechnol*, 18: 119-134

interepidémicas sin llegar a padecer la enfermedad⁴). Esta relación comensal se establece por la actuación conjunta de las estructuras antigénicas de superficie de la bacteria y el sistema inmune del hospedador. Sin embargo, por razones no del todo claras, tras su adherencia a las células no ciliadas (facilitada por diferentes moléculas^{5,6}, y seguida de una fase de adaptación y proliferación local) el meningococo atraviesa las células de la faringe accediendo al torrente sanguíneo. Una vez que se produce la bacteriemia, son varios los mecanismos intrínsecos al microorganismo que pueden facilitar la evasión de la respuesta inmune: la producción de determinadas estructuras (cápsula, adhesinas, proteínas implicadas en la adquisición del hierro, vesículas de membrana externa (OMVs)), la variabilidad antigénica y de fase de las estructuras externas, el enmascaramiento de antígenos o la inhibición de la acción del complemento⁷. *N. meningitidis* tiene capacidad para provocar autólisis, liberar ADN y diversos componentes de la pared celular que inducen una serie de reacciones inflamatorias favoreciendo la evolución de la enfermedad. En otros casos la invasión y el progreso de la enfermedad se debe a una predisposición del hospedador⁸.

Durante la bacteriemia, en el 80% de los casos el patógeno accede al sistema nervioso central (SNC), aunque no se conoce con exactitud por donde traspasa la barrera hematoencefálica (el plexo coroideo, que presenta un elevado flujo de sangre, parece ser la puerta de entrada). En esta zona diversos mediadores inflamatorios, inducidos principalmente por lipopolisacaridos (LPS), juegan un papel importante al incrementar la permeabilidad. Estudios realizados *in vivo*

⁴ Cartwright C. 1995. Meningococcal carriage and disease. Cartwright, K. (ed). En: *Meningococcal Disease*, p 115

⁵ Virji M, Alexandrescu C, Ferguson DJP y col. 1992. Variations in the expression of pili: the effect on adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol*, 6: 1271-1279

⁶ Merz AJ y So M. 2000. Interactions of pathogenic *Neisseriae* with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell D Bio*, 16: 423-457

⁷ Vogel U y Frosch M. 1999. Mechanisms of *Neisserial* serum resistance. *Mol Microbiol*, 32: 1133-1139

⁸ Stephen C, Ross MD y Densen PM. 1984. Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of *Neisserial* and other infections in an immune deficiency. *Medicine*, 63: 243-267

también indican que el patógeno utilizaría una ruta transcelular para invadir las meninges⁹. Una vez en el espacio subaracnoidiano se incrementan los niveles de componentes de la pared celular (LPS, ácidos teicoicos y péptidoglicano) favoreciendo la secreción de diversas citoquinas y la inflamación de las meninges. Sus efectos sobre la circulación cerebral implican alteraciones metabólicas y daños en la circulación (isquemia). Ocasionalmente, el hospedador puede generar una respuesta inmune en el líquido cefalorraquídeo (LCR) que, aunque puede eliminar la bacteria, provoca inflamación, daños neurológicos localizados e incluso la muerte.

Los primeros síntomas de la enfermedad se inician con fiebre, malestar general, sensación de cansancio extremo, náuseas y vómitos, síntomas semejantes a la gripe, lo que dificulta su diagnóstico. Si el patógeno ha accedido al LCR, el individuo padece rigidez de la nuca, alteración del estado de conciencia y sueño, evolucionando hacia un shock y coma cuando el daño cerebral es más severo.

La inflamación y la activación del sistema de coagulación provocan, junto con otros factores, una coagulación intravascular diseminada que predispone a hemorragias en diferentes órganos vitales como las glándulas suprarrenales (Síndrome Waterhouse-Friderichs). Las erupciones hemorrágicas cutáneas, primero en forma de petequias y en estados más avanzados como púrpura, son un índice de la severidad de la enfermedad y representan un importante marcador de diagnóstico. Estas lesiones pueden abarcar amplias zonas de la piel produciendo necrosis y secuelas que pueden derivar en amputaciones. También han sido descritas otras manifestaciones menos comunes como la neumonía, artritis, peritonitis, otitis, uretritis o gastroenteritis¹⁰.

⁹ Hardy SJ, Christodoulides M, S  ller RO y col. 2000. Interactions of *Neisseria meningitidis* with cells of the human meninges. *Mol Microbiol*, 36: 817-829

¹⁰ Rosenstein NE, P  ewrkins BA, Stephens DS y col. 2001. Meningococcal Disease. *N Engl J Med*, 344: 1378-1388

1.2.b Epidemiología

La incidencia de la enfermedad causada por los distintos serogrupos se ha relacionado con múltiples factores, como la edad, geografía, clima o las poblaciones humanas. De los doce existentes solamente el A, B, C, Y e W135 han sido aislados de pacientes que han padecido la enfermedad, estando implicados en el 90% de los casos el A, B y C.

Por edades, la tasa más alta de incidencia corresponde a niños menores de cinco años con un pico secundario en adolescentes y jóvenes, aunque los casos más severos afectan a niños en edad preescolar. En un estudio realizado en Europa se observó que la incidencia del serogrupo B es más alta en niños que en adultos; sin embargo, el serogrupo C se asocia con frecuencia a brotes localizados entre adolescentes y adultos. El serogrupo Y e W135 tiende a causar la enfermedad en personas mayores¹¹.

El serogrupo A afectó sobre todo a China y el continente Africano¹² y causó brotes en los países industrializados durante el inicio del siglo XX, escasos a partir de finales de la II Guerra Mundial. Estos cambios no son del todo entendidos atribuyéndose a variaciones inmunológicas en la población general, a la introducción de nuevas cepas o a la protección cruzada por exposición a bacterias con estructuras similares. Actualmente, en dichas zonas la enfermedad es debida principalmente a los serogrupos B y C, aunque estos patrones varían entre distintas regiones¹³. En Europa la proporción de cepas invasivas del serogrupo B es más elevada en Noruega, Holanda, Alemania y Dinamarca. En la Republica Checa,

¹¹ Cartwright K, Noah N, Peltola H y col. 2001. Meningococcal disease in Europe. Epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines. Report of European advisory board meeting Vienna, Austria, 6-8 October, 2000. *Vaccine*, 19: 4347-4356

¹² Kvalsvig AJ y Unsworth DJ. 2003. The immunopathogenesis of meningococcal disease. *J Clin Pathol*, 56: 417-422

¹³ Pollard AJ. 2004. Global Epidemiology of Meningococcal Disease and vaccine Efficacy. *Pediatr Infect Dis J*, 23: 274-279

Eslovaquia, Escocia, Grecia e Irlanda existe, no obstante, un mayor número perteneciente al serogrupo C¹⁴. El serogrupo Y ha estado implicado en casos esporádicos de la enfermedad en Israel, Suecia y Estados Unidos¹⁵. El serogrupo W135 ha sido asociado a pequeños brotes epidémicos en Estados Unidos y a un brote internacional en la Meca¹⁶.

La región más afectada del mundo es el continente Africano y más concretamente la región sub-sahariana que se extiende desde Etiopía hasta Senegal (“*cinturón de la meningitis*”)¹⁷. Durante las epidemias tiene lugar un ciclo irregular entre 5-15 años, con una tasa de ataque de 400-800 casos por cada 100 000 habitantes. China y Mongolia también fueron afectadas por epidemias durante los años 70 extendiéndose a Nepal y la India. En los últimos 20 años las tasas de la enfermedad han decrecido coincidiendo con la introducción de la vacuna polisacáridica¹⁸, pero lamentablemente, se están desarrollando gradualmente epidemias del serogrupo B¹⁹.

En España y otros países Europeos se observó un cambio en el patrón epidemiológico durante los últimos quince años. Entre 1991 y 1996 la incidencia de la enfermedad era del 2,9 por cada 100 000 habitantes, predominando el serogrupo B. Un año después la tasa se duplicó, pero en esta ocasión la mayoría de los casos pertenecieron al serogrupo C (63%), obligando a una campaña de

¹⁴ Cartwright K, Noah N, Peltola H y col. 2001. Meningococcal disease in Europe. Epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines. Report of European advisory board meeting Vienna, Austria, 6-8 October, 2000. *Vaccine*, 19: 4347-4356

¹⁵ Cherubin CE, Marr JS, Schaeffer S y col. 1980 Meningococcal disease in New York City, 1973 to 1978: recognition of groups Y and W-135 as frequent pathogens. *J Am Med Assoc*, 244: 2167-2171.

¹⁶ Popovic T, Sacchi CT, Reeves MW y col. 2000. *Neisseria meningitidis* serogroup W135 isolates associated with the ET-37 complex. *Emerg Infect Dis*, 6: 428-429

¹⁷ Greenwood BM, Bradley AK y Wall RA. 1985. Meningococcal disease and season in sub-Saharan Africa. *Lancet*, 2: 829-830

¹⁸ Cochi SL, Markowitz LE, Joshi DD y col. 1987. Control of epidemic group A meningococcal meningitis in Nepal. *Int J Epidemiol*, 16: 91-97

¹⁹ Grodet C, Dequin PF, Watt S y col. 2004. Outbreak in France of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.12 belonging to sequence type 1403. *Clin Microbiol Infect*, 10: 845

vacunación masiva con la vacuna A+C. Con esta medida se redujo la enfermedad causada por el serogrupo C, aunque se ha ido incrementando ligeramente hasta el 2000²⁰, momento en que se introdujo la vacuna conjugada C en el calendario infantil. La medida redujo ligeramente los casos del serogrupo C, mientras que los del B se mantienen en los niveles anteriores²¹.

Nuestra Comunidad Autónoma muestra un claro predominio del serogrupo B. La incidencia más alta de la enfermedad ocurrió entre 1970-1987, con prácticamente todos los casos pertenecientes a este serogrupo. Después de un periodo interendémico, el patrón epidemiológico a partir de 1996 continuó el del resto del país, siendo la primera comunidad en adoptar la vacunación masiva. En la actualidad, Galicia presenta un mayor número de casos atribuibles al serogrupo B respecto a la media nacional²². No obstante, durante los últimos meses se ha observado un notable incremento en el número de casos ocasionados por el serogrupo C, que ha provocado que las autoridades sanitarias iniciasen una nueva vacunación masiva en determinados grupos de edad.

Las nuevas técnicas de tipado mejoraron considerablemente los estudios de epidemiología, demostrando que aislados genotípicamente divergentes han causado epidemias en todo el mundo. Así por ejemplo, el subgrupo III-I, aislado en Arabia Saudí y desde China a Nepal, parece el causante de las ondas epidémicas del serogrupo A²³ y los aislados del complejo ET-37 los responsables de los brotes del serogrupo C y W135²⁴.

²⁰ **Cano R, García C y Mateo S.** 1998. Enfermedad meningocócica. Situación en España en la temporada 1998-1999. *Rev Esp Salud Pública*, 74: 369-375

²¹ **Cano R, Larrauri A, Mateo S y col.** 2004. Impact of the meningococcal C conjugate vaccine in Spain: an epidemiological and microbiological decision. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.*, 29: 5-6

²² **Dirección Xeral de Saúde Pública de Galicia.** 2000. Impacto da campaña da vacunación coa vacina anti-meningocócica conjugada. *B Ep Gal*, 13: 4

²³ **Guibourdenche M, Hoiby EA, Riou JY y col.** 1996. Epidemics of serogroup A *Neisseria meningitidis* of subgroup III in Africa, 1989-94. *Epidemiol Infect.*, 116: 115-120

²⁴ **Popovic T, Sacchi CT, Reeves MW y col.** 2000. *Neisseria meningitidis* serogroup W135 isolates associated with the ET-37 complex. *Emerg Infect Dis.* 6: 428-429

1.3 Tratamiento, prevención de la enfermedad y vacunas anti-meningocócicas disponibles

1.3.a Tratamiento

El uso de antibióticos ha reducido drásticamente la mortalidad causada por la enfermedad meningocócica. Los antibióticos recomendados deben caracterizarse por una fácil penetración al LCR, aunque son varios los factores que influyen en su acceso²⁵. La rápida progresión de la enfermedad obliga a iniciar con prontitud el tratamiento tras su diagnóstico, aún sin ser confirmada por otros métodos.

La penicilina G y el cloranfenicol han sido, en principio, el tratamiento más utilizado como terapia inicial, pero la aparición de resistencias²⁶ obligó a utilizar otros antibióticos. Actualmente, las cefalosporinas de tercera generación son el antibiótico más adecuado para tratar la infección: tienen la ventaja de poseer una alta actividad contra varios patógenos comunes de las meninges, una excelente penetración en el SNC, nula toxicidad y fácil administración, aunque en ciertos países subdesarrollados su uso está limitado debido a su coste. En los casos muy severos de la enfermedad está indicada la vancomicina por su notable efectividad, aunque tiene una elevada toxicidad.

Adicionalmente, se emplean otros fármacos para reducir el daño ocasionado por la infección como anti-inflamatorios o corticoides (desametaxona)²⁷ que pueden reducir el daño cerebral ocasionado por la activación de la respuesta inflamatoria. La acumulación de fluido intravascular y el incremento de la presión intracraneal son tratados con agentes osmóticamente activos como el manitol, además de la heparina para combatir la coagulación intra vascular diseminada.

²⁵ **Rosenstein NE, Bradley AP, Stephens DS y col.** 2001. Meningococcal Disease. *N Engl J Med*, 344: 1378-1388

²⁶ **Woods CR, Smith AL, Wasilauskas BL y col.** 1994. Invasive disease caused by *Neisseria meningitidis* relatively resistant to penicillin in North Carolina. *J Infect Dis*, 170: 453-456

²⁷ **Mertsola J, Kennedy WA, Waagner DC y col.** 1991. Endotoxin concentrations in cerebrospinal fluid correlate with clinical severity and neurologic outcome of *Haemophilus influenzae* type by meningitis. *Am J Dis Child*, 145: 1099-1103

La elevada tasa de morbilidad y mortalidad asociada con la enfermedad en algunos casos, incluso en pacientes tratados con antibióticos, ha obligado a estudiar otras terapias adjuntas como la quimioprofilaxis o inmunoprofilaxis.

1.3.b Quimioprofilaxis

La principal barrera para evitar el contagio de la enfermedad es reducir el estado de portador previniendo así la invasión nasofaríngea. El riesgo de una invasión es más elevado en personas que están en contacto directo con el enfermo como familiares, contactos de guarderías o escolares, así como entre el personal militar. En estos casos es recomendada la quimioprofilaxis cuyo beneficio se ha asociado a una escasa tasa de infecciones secundarias. Estos agentes se deben caracterizar por ejercer su acción bactericida en saliva. Hasta finales de los años 60 el tratamiento con sulfamidas y rifampicina fue el más utilizado, pero la aparición de resistencias en algunas cepas²⁸ y las contraindicaciones en determinados grupos propiciaron el uso de ciprofloxacina o ceftriaxona.

La quimioprofilaxis, pese a su relevancia como medida preventiva, se hace impracticable e ineficaz en largos periodos epidémicos por diversos motivos: en algunos casos, la existencia de múltiples fuentes de exposición mantenida durante largos periodos y, en otros, los problemas logísticos o su coste tan elevado²⁹. Por estas razones, el desarrollo de vacunas es la fórmula más eficaz para mantener una inmunidad de grupo y prevenir la enfermedad.

²⁸ **Ferner C y Swedberg G.** 1997. Adaptation to sulphonamide resistance in *Neisseria meningitidis* may have required compensatory changes to retain enzyme function: Kinetic analysis of dihydropteroate synthesis from *N. meningitidis* expressed in knockout mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 179: 831-837

²⁹ **Rosenstein NE, Bradley AP, Stephens DS y col.** 2001. Meningococcal Disease. *N Eng J Med*, 344: 1378-1388

1.3.c Inmunopprofilaxis: vacunas disponibles

La vacunación en *N. meningitidis* se inició en base a la buena respuesta serológica de las vacunas polisacáridicas del neumococo. Los primeros intentos frente al meningococo no fueron óptimos pero posteriores mejoras en la purificación del polisacárido, permitieron las primeras preparaciones vacunales inmunogénicas contra la cápsula A y C. Posteriormente, se obtuvieron preparaciones contra el resto de polisacáridos capsulares implicados en la enfermedad meningocócica, excepto para el B. El α -2-8 N-acetilneuramínico, constituyente de la cápsula del serogrupo B, es estructural e inmunológicamente idéntico a los glicopéptidos de una molécula de adhesión celular³⁰. Este mimetismo molecular se cree que impide el reconocimiento de la cápsula B debido a un mecanismo de tolerancia inmunológica que, junto con sus posibles efectos autoreactivos, han impedido el desarrollo de una vacuna contra esta estructura. La importancia de esta teoría se ha puesto en entredicho³¹, pero la dificultad para demostrarlo ha bloqueado la investigación de la vacuna polisacáridica contra el meningococo B y en la actualidad no está disponible ninguna vacuna eficaz frente a este serogrupo. Se han realizado ensayos modificando el polisacárido B químicamente y conjugándolo a una proteína transportadora o “carrier”. Cuando se utilizó como tal la PorB recombinante (detallado en apdo. 2.2.b) se obtuvo una respuesta funcional en primates no humanos sin efectos autoreactivos³², actualmente en estudios preclínicos. En base a esta buena respuesta, recientemente

³⁰ Finne J, Bitter-Suerman D, Goridis C y col. 1987. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis: implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet*, 2: 355-357

³¹ Lively MR y Morero C. 1986. Vaccine against meningococcal group B disease. *Lancet*, 1: 214-215

³² Fusco PC, Michon F, Tae JY y col. 1997. Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates. *J. Infect Dis*, 175: 364-372

Bruge y colaboradores³³ conjugaron el polisacárido al toxoide tetánico, pero esta fórmula no generó la actividad funcional deseada.

Se han estudiado de manera exhaustiva otras estructuras antigénicas alternativas como proteínas de membrana externa (OMPs) o OMVs de *N. meningitidis* entre otras³⁴, sin conseguir una fórmula eficaz contra este serogrupo; las disponibles en la actualidad se recogen en la siguiente tabla.

Tabla 1.- Vacunas disponibles en la actualidad contra los diferentes serogrupos de *Neisseria meningitidis*

Vacunas	Serogupos
<u>Polisacáridicas</u>	
Menomune® (Aventis Pasteur)*	A C Y W135
ACWY Vax® (GlaxoSmithKline)	A C Y W135
Mengivac A+C® (Aventis Pasteur)	A C
AC Vax® (GlaxoSmithKline)	A C
Trivalente ACW® Vaccine (GlaxoSmithKline)*	A C W135
<u>Polisacáridicas conjugadas</u>	
Meningitec® (Wyeth)	C conjugada a CRM ₁₉₇
Menjugate® (Chiron)	C conjugada a CRM ₁₉₇
NeisVac-C® (Baxter)	C conjugada al toxoide tetánico
Menactra® (Aventis Pasteur)*	A C Y W135 conjugada a CRM ₁₉₇
<u>Vesículas de membrana externa</u>	
VA-MENGOC-BC®*	OMVs de cepa B:4:P1.19,15 + C + OMPs
MeNZ B® (Chiron)*	OMVs de cepa B: 4: P1.7 b,4

* Solamente disponible en algunos países. **Tomada y modificada de: Zimmer MS y Stephens DS. 2004. Meningococcal conjugate vaccines. *Expert Opin Pharm*, 5: 855-863

³³ Bruge J, Cam NB, Damve B y col. 2004. Clinical evaluation of a group B meningococcal N-propionilated polysaccharide conjugate vaccine in adult, male volunteers. *Vaccine*, 22: 1087-1096

³⁴ Jódar L, Feavers IM, Salisbury D y col. 2002. Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet*, 359: 1499-1508

*** Vacunas polisacarídicas simples**

Como se indica en la tabla anterior, dos vacunas polisacarídicas están en uso en este momento: la bivalente A/C y la tetravalente A/C/Y/W135. Ambas son utilizadas para el control de brotes y epidemias y su administración está limitada a viajeros a áreas endémicas e inmunodeprimidos, debido a una inmunogenicidad baja y de duración corta en niños de poca edad.

La eficacia de ambas vacunas no fue similar frente a todos los serogrupos a los cuales estaba dirigida. En el primer caso, generó una eficacia contra el serogrupo A del 78,5% (95%CI, 67-90%) en niños mayores de cuatro años sin mostrar protección en menores al año de la vacunación³⁵; contra el serogrupo C la eficacia fue inferior (52%)³⁶ y tuvo poco efecto sobre el estado de portador de dicho serogrupo seis meses después³⁷. En nuestro país su éxito se asoció con un acusado descenso de casos tres años después de la vacunación, pero su efectividad se puso en entredicho posteriormente³⁸. En el segundo caso, su eficacia contra los serogrupos A y C fue muy reducida en niños menores de dos años y en algunos adultos al cabo de tres³⁹. La protección ejercida contra los serogrupos W135 e Y no ha sido todavía demostrada. Además, también ha sido desarrollada una vacuna trivalente A C Y para controlar determinadas epidemias en África⁴⁰.

En España están disponibles dos: la polisacarídica bivalente Mengivac AC® (Aventis Pasteur) y la tetravalente ACWY Vax® (GlaxoSmithKline).

³⁵ **Reingold AL, Broome CV y Hightower AW.** 1985. Age-specific differences in duration of clinical protection after vaccination with meningococcal polysaccharide A vaccine. *Lancet*, 2: 114-118

³⁶ **Amato NV, Finger H, Gotschlich EC y col.** 1974. Serologic response to serogroup C meningococcal vaccine in Brazilian preschool children. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 16: 149-153

³⁷ **Hassan-king MK, Wall RA y Greenwood BM.** 1998. Meningococcal carriage, meningococcal disease and vaccination. *J Infect*, 16: 55-59

³⁸ **Cano R, Larrauri A, Mateo S y col.** 2004. Impact of the meningococcal C conjugate vaccine in Spain: an epidemiological and microbiological decision. *Surv Rep*, 9: 5

³⁹ **Zangwill KM, Stout RW y Carlone GM.** 1994. Duration of antibody response after meningococcal polysaccharide vaccination in US Air Force personnel. *J Infect Dis*, 169: 847-852

⁴⁰ **Zimmer MS y Stephens DS.** 2004. Meningococcal conjugate vaccines. *Expert Opin Pharm*, 5: 855-863

*** Vacuna polisacáridica conjugada**

La respuesta a los antígenos polisacáridicos resultó exitosa tras la conjugación del polisacárido a una proteína, favoreciendo así una respuesta timo-dependiente y, además, memoria inmunológica. Esta mejora sustancial propició que un gran número de compañías farmacéuticas desarrollaran estas vacunas contra el serogrupo C. Los estudios de inmunogenicidad indicaron que se inducen niveles de anticuerpos protectivos tanto en lactantes como en niños⁴¹. Los principales problemas son la necesidad de administrar dosis de recuerdo, el descenso de anticuerpos en niños de corta edad y su ineficacia contra otros serogrupos.

Esta vacuna puede generar una espectacular inmunidad de grupo que disminuye la transmisión y el consecuente estado de portador⁴². La cantidad de IgG en saliva tras la vacunación con el polisacárido C conjugado es superior a la inducida por el polisacárido sin conjuguar tanto en niños como en adultos⁴³. Las vacunas actualmente disponibles tienen conjugados o toxoides tetánicos o un mutante no tóxico de la toxina diftérica (CRM₁₉₇), también empleados para vacunas de *H. influenzae* tipo b mostrando una inmunogenicidad equivalente y nula reactogenicidad. En la actualidad en España existen 3 vacunas conjugadas disponibles contra el meningococo C:

- Meningitec® desarrollada WyethVaccines, compuesta de 10µg de oligosacáridos del serogrupo C acoplados a 25 µg de CRM197 con AlPO₄ como adyuvante.
- Menjugate® desarrollada por ChironVaccines, compuesta de 10 µg de oligosacáridos del serogrupo C unidos a 15-33 µg del CRM197 en AlOH₃.

⁴¹ **Granoff DM, Maslanka SE y Carlone FM** 1998. A modified enzyme-linked-immunosorvent assay for measurement of antibody responses to meningococcal C polysaccharide that correlate with bactericidal responses. *Clin Diag Lab Immunol*, 5: 479-485

⁴² **Klugman KP**. 2001. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines and their effect on carriage and antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis*, 1: 85-91

⁴³ **Zhang Q, Pettit E, Burkinshaw R y col**. 2002. Mucosal immune responses to meningococcal conjugate polysaccharide vaccines in infants. *Pediatr Infect Dis J*, 21: 209-213

- Neiss-Vac® desarrollada por Baxter, compuesta de 10 µg de oligosacáridos del serogrupo C acoplados a 15-33 µg del toxoide tetánico en Al(OH)₃

En el Reino Unido la vacunación sistemática se inició en noviembre de 1999 con un régimen de dos dosis a los 2 y 4 meses de edad. Con esta medida la enfermedad ha decrecido en más del 85% en varios grupos de edad y con la inmunidad de grupo alcanzada se ha reducido en un 67% entre los niños no vacunados⁴⁴.

La vacuna fue incluida en el calendario vacunal infantil en nuestro país en Octubre del 2000, descendiendo la enfermedad en todos los grupos de edad y con una efectividad superior al 95% en niños inmunizados⁴⁵. La pauta de administración varía en la primovacunación entre las Comunidades Autónomas según el preparado comercial utilizado. El toxoide tetánico utilizado en la vacuna Neiss-Vac® como una proteína transportadora se ha comportado como más inmunógeno respecto que la que contiene CRM197⁴⁶, motivo por el que en el primer caso, se continuó *a priori* una pauta de dos dosis a los 2 y 4 meses y en el otro una dosis adicional a los 6 meses.

La efectividad de la vacuna parece estar relacionada con una dosis de recuerdo a los 18 meses de edad. En España entre el 2001 y 2004 se han confirmado un total de 32 fallos vacúnales en niños, inferior que en Reino Unido⁴⁷. Esta disminución de la eficacia vacunal propició que en 2003 se incorporase esta dosis de recuerdo tras la primovacunación. Los motivos aducidos han sido de diversa índole:

⁴⁴ **Maiden MC, y Stuart JM.** 2002. Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. *Lancet*, 359: 1829-1831

⁴⁵ **Cano R, Larrauri A, Mateo S y col.** 2004. Impact of the meningococcal C conjugate vaccine in Spain: an epidemiological and microbiological decision. *Surv Rep*, 9: 5

⁴⁶ **Borrow R, Goldblatt D, Finn A y col.** 2003. Immunogenicity of, and immunologic memory to, a reduced primary schedule of meningococcal C-tetanus toxoid conjugate vaccine in infants of the United Kingdom. *Infect Immunol*, 71: 5549-5555

⁴⁷ **Trotter CL, Andrews NJ, Kaczmarski EB y col.** 2004. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet*, 364: 365-367

utilización simultanea de la vacuna difteria-tétanos-pertussis acelular (DTPa), persistencia de portadores nasofaríngeos de *Haemophilus influenzae* Tipo b o una reducción de la inmunización natural o memoria inmunológica imperfecta. No obstante, el aumento de casos durante estos últimos meses en ciertos grupos vacunados propiciará nuevas modificaciones de la pauta de vacunación.

El éxito de estas vacunas ha extendido su uso a países de Latinoamérica y Canadá donde la mayoría de casos de enfermedad son atribuibles al serogrupo C. Algunos autores han afirmado que el meningococo es capaz de promover el cambio en la composición de cápsula por intercambio genético⁴⁸. Es posible que la vacunación induzca una presión inmune sobre clones virulentos del serogrupo C favoreciendo su desplazamiento hacia otros serogrupos.

Recientemente, el Grupo Sanofi Pasteur ha desarrollado una vacuna tetravalente A C Y W135 conjugada al toxoide diftérico (MCV4 o Menactra®), basándose en la vacuna polisacarídica Menomune®. Aunque su eficacia en adultos y adolescentes es elevada⁴⁹, su protección es modesta en niños menores de dos años⁵⁰. Hasta el momento, esta nueva fórmula prácticamente solo se comercializa en EEUU, e indicada únicamente en los grupos de edad citados.

*** Vacunas basadas en OMVs**

Las primeras vacunas y las más exhaustivamente estudiadas fueron desarrolladas sobre los años 80 en respuesta a brotes de la enfermedad del serogrupo B en Cuba y Noruega. Durante varios años la fórmula cubana fue la

⁴⁸ **Stewartlwey J, Marfin A, Edupuganti S y col.** 1999. Capsule switching of *Neisseria meningitidis* in children. *Infect. Immune*, 94: 271-276

⁴⁹ **Campbell J, Edelman R, King J y col.** 2002. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a tetravalent meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine given to healthy adults. *Pediatr Infect Dis J*, 21: 978-979

⁵⁰ **Rennels M, King JJ, Ryall R y col.** 2004. Dosage escalation, safety and immunogenicity study of four dosages of a tetravalent meningococcal polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J*, 23: 429-435

única disponible, aunque su comercialización está restringida a algunos países de América Latina. Esta vacuna es producida, a partir de la cepa B:4:P1.19, 15, con los polisacáridos del serogrupo C y una preparación de OMPs de alto peso molecular absorbidas con AlOH_2 . Una eficacia estimada del 83% en adolescentes justificó una campaña de vacunación masiva, que contribuyó al declive de la enfermedad. Su protección, posteriormente evaluada en Brasil, tras su uso en una epidemia causada por cepas del serogrupo B y C, fue similar en adolescentes pero menor en niños y nula en lactantes⁵¹.

La vacuna producida por el Instituto Nacional de Salud Pública Noruego fue desarrollada para ser utilizada durante un periodo hiperendémico causado por la cepa B:15:P1.7,16 del clon ET-5⁵². Los estudios de su eficacia en adolescentes mostraron solamente una respuesta del 57%, pero hay datos que apuntan a que un mayor número de dosis podría incrementar su eficacia.

En 2004, los laboratorios Chiron han comercializado en Nueva Zelanda una vacuna constituida de 25 microgramos de OMVs de la cepa B: 4:P1.7 b,4 absorbidas con AlOH_2 , para controlar un brote epidémico causado por una cepa del subtipo P1.7b,4⁵³. La protección estimada contra la cepa epidémica fue de un 96% en adultos y del 75% en adolescentes y niños, y su reactogenicidad similar a las vacunas cubana y noruega⁵⁴.

El principal problema que presentan las vacunas basadas en OMVs es su limitado grado de inmunogenicidad contra cepas que no han sido incluidas en la

⁵¹ Noronha CP, Struchiner CJ y Halloran ME. 1995. Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro. Brazil: a case-control study. *Int J. Epidemiol*, 24: 1050-1057

⁵² Bjune G, Hoiby EA, Gronnesby JK y col. 1991. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet*, 338: 1093-1096

⁵³ O'Hallaban J, Lennon D, Oster P y col. 2005. From secondary prevention to primary prevention: a unique strategy that gives hope to a country ravaged by meningococcal disease. *Vaccine*, 23: 2197-2201

⁵⁴ Oster P, Lennon D, O'Hallahan J y col. 2005. MeNZB™: a safe and highly immunogenic Taylor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine*, 23, 2191-2196

misma. Los niveles de reactividad cruzada parecen variar entre cepas y ser dependientes de la edad. Aunque su protección puede ser inducida por diferentes antígenos, la proteína mayoritaria de Clase 1 o PorA (ver apdo. 2.2.b) parece predominante, ocasionando una inmunidad dependiente del subtipo. Con objeto de eliminar este problema, se desarrolló en Holanda una vacuna con seis variedades antigénicas de PorA, que indujo protección únicamente contra las cepas portadoras de una de las variantes⁵⁵.

Las vacunas OMVs se han estudiado en mayor medida que otras fórmulas, no obstante, su uso se ha limitado a brotes epidémicos causados por una única cepa. En los lugares endémicos de serogrupo B, la vacunación con OMVs tendría un beneficio limitado debido a la rápida evolución de los tipos antigénicos entre las poblaciones de meningococos, presumiblemente por la presión inmunológica que se ejerce sobre estos.

2. NUEVAS APROXIMACIONES EN EL DESARROLLO DE VACUNAS: FUTURO DE LAS VACUNAS ANTIMENINGOCÓCICAS

2.1 Papel de la genómica en el diseño vacunal

Las vacunas disponibles o en desarrollo se basan bien en microorganismos vivos atenuados, microorganismos inactivados o bien en subunidades. Estas últimas emplean determinados componentes antigénicos que dirigen la respuesta inmune hacia estructuras específicas pero adecuadas para alcanzar la protección. En estos casos la fórmula vacunal está claramente definida, siendo de interés en términos de seguridad y reactogenicidad con respecto a otros diseños. Por el

⁵⁵ **Martín SL, Borrow R, Van der Ley P D y col.** 2000. Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA on outer membrane vesicles vaccine. *Vaccine*, 18: 2476-2481

contrario, es indispensable complementar su administración con adyuvantes y con varias dosis para alcanzar una respuesta inmune eficaz. Algunas de las vacunas desarrolladas durante las últimas décadas se basan mayormente en el uso exclusivo de determinados componentes antigénicos, como la vacuna Td (tétano-difteria).

Una variante de las vacunas basadas en sub-unidades son las vacunas conjugadas en las que una estructura bacteriana de débil inmunogenicidad, como el polisacárido capsular, se acopla químicamente a una proteína transportadora para generar una respuesta timo-dependiente. Ejemplos de este tipo de vacunas son la vacuna conjugada contra el meningococo C o la vacuna conjugada del neumococo heptavalente.

Hasta hace unos años, para analizar los componentes antigénicos era necesario cultivar el patógeno en condiciones *in vitro*, purificar los posibles candidatos y analizar su capacidad inmunogénica y protectora. Esta estrategia, ahora denominada como “vacunología convencional”, requiere mucho tiempo y únicamente identifica y evalúa los antígenos expresados en grandes cantidades. En muchos casos, estos antígenos mayoritarios no son los candidatos más adecuados, e identificar y evaluar proteínas minoritarias con esta tecnología no es factible. Además, las condiciones de cultivo no son similares a las que se producen durante la infección, y por tanto los antígenos expresados y posteriormente analizados pueden ser diferentes. Gran parte de estos inconvenientes se han solventado con el desarrollo, primero, de la tecnología del ADN recombinante y, posteriormente, con la tecnología genómica.

La tecnología del ADN recombinante permite, una vez identificado y secuenciado el gen responsable, producir a gran escala el candidato antigénico en un hospedador heterólogo o en microorganismos vivos atenuados. Con estas técnicas se desarrollaron dos vacunas muy eficaces: la vacuna acelular contra

Bordetella pertussis y la vacuna de la hepatitis B⁵⁶. Aunque ambas son seguras, inmunogénicas y bien toleradas, su eficacia protectora tiene un periodo de tiempo limitado y son necesarias dosis de recuerdo⁵⁷.

La tecnología genómica reduce en gran medida el tiempo empleado en la búsqueda de candidatos vacunales, aunque todavía no permitió el desarrollo de ninguna vacuna que esté disponible en la actualidad. Esta estrategia de búsqueda posibilita la investigación en patógenos no cultivables y hace posible determinar las proteínas que se expresan exclusivamente *in vivo*.

La secuenciación del genoma de gran número de microorganismos permite disponer de información en poco tiempo para iniciar la búsqueda de candidatos con una poderosa tecnología que ha variado el sentido clásico de la búsqueda. En la **Figura 1** se sintetizan diferentes técnicas empleadas en el diseño vacunal.

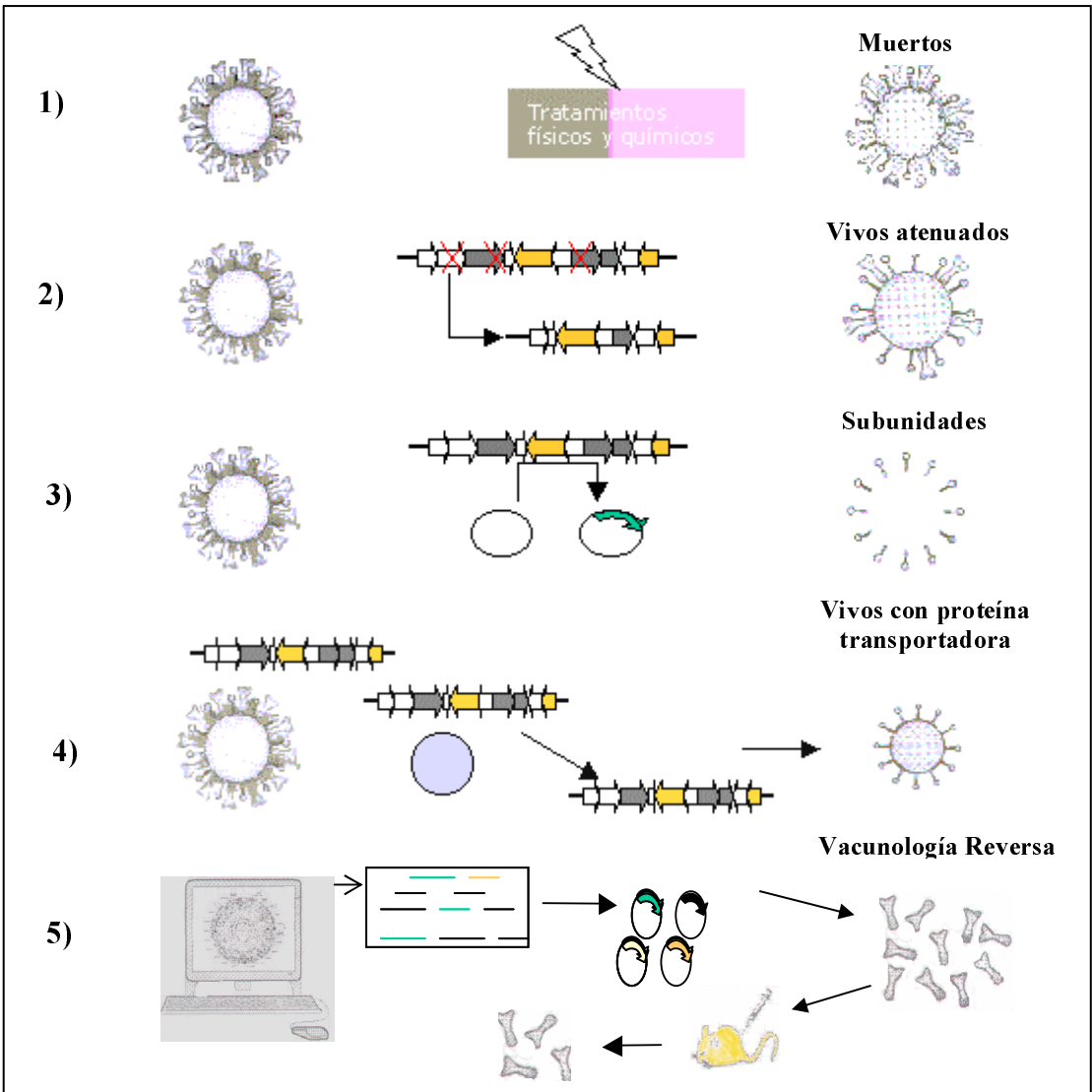
2.1.a La tecnología del ADN recombinante

Durante bastantes años los componentes inmunogénicos de las vacunas basadas en subunidades eran aislados directamente del patógeno, y, su producción requería grandes cantidades del mismo con el consecuente riesgo y coste. El posterior desarrollo de la tecnología del ADN recombinante solventó en un principio esta dificultad, y más tarde se ha extendido su aplicación con el desarrollo de otras estrategias que facilitaron sistemas de producción eficientes en vehículos de expresión no patogénicos. La técnica de fusión de proteínas ha permitido mejorar la purificación de inmunógenos, su localización y su fusión a proteínas transportadoras sin necesidad de conjugarlas químicamente. Además esta estrategia ofrece la posibilidad de presentar las subunidades en sistemas vivos de expresión o incluso en vectores de ADN que incorporen el gen que codifica para el antígeno.

⁵⁶ **Andre FE.** 1990. Overview of a 5-year clinical experience with a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 8: 74-80

⁵⁷ **Ryan ET y Calderwood SB.** 2000. Cholera vaccines. *Clin Infect Dis.* 31: 561-565

Figura 1.- Diferentes técnicas empleadas para el diseño de vacunas. (1) Empleo de agentes físicos o agentes químicos (calor, formaldehído) para obtención de vacunas basadas en microorganismo muertos; (2) Obtención de mutantes para el desarrollo de vacunas basadas en microorganismos atenuados; (3) Identificación y clonación del gen que codifica para el candidato antigénico de elección; (4) Clonación del gen de interés en vectores vivos atenuados; (5) Identificación y análisis de candidatos vacunales mediante vacunología reversa



* Tomada de: Scarselli M, Giuliani MM, Adu-Bobie J y col. 2005. The impact of genomics on vaccine design. *TRENDS in Biotech*, 23: 84-91

En resumen, la aplicación de esta tecnología al diseño vacunal está principalmente establecida en los siguientes puntos:

1. Producción a gran escala del antígeno de interés en otros microorganismos no patógenos fácilmente controlables.
2. Producción de vectores vivos que expresen el antígeno de interés o moléculas de ADN que incorporen el gen que lo codifica.

El uso de la tecnología del ADN recombinante está permitiendo mejoras en la obtención de formulas vacunales contra importantes patógenos humanos tanto en bacterias^{58,59} como en virus^{60,61}. Su aplicación a *N. meningitidis* ha sido muy extensa, empleándose sobre todo para producir diferentes candidatos antigénicos que se detallarán posteriormente con mayor profundidad.

*** Sistemas de expresión de proteínas recombinantes y tecnología de fusión génica**

A la hora de elegir el sistema de expresión más adecuado para producir una proteína se deben considerar distintas variables como son las modificaciones post-transduccionales necesarias, su estabilidad, su excreción o acumulación en el citosol o, incluso, la relación coste-beneficio del producto final.

El uso de sistemas bacterianos con este fin se caracteriza por expresar altos niveles de antígenos que no requieren modificaciones post-transduccionales. *E. coli* es el más utilizado por su fácil manipulación, sus características genéticas y

⁵⁸ McMichael JC, Greeb BA. 2003. Vaccines for *Moraxella catarrhalis* and non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Curr Opin Investig Drugs*, 4: 953-958

⁵⁹ Swiatlo E y Ware D. 2003. Novel vaccine strategies with protein antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 38: 1-7

⁶⁰ Amara RR y Robinson HL. 2002. A new generation of HIV vaccines. *Trends Mol Med*, 8: 489-495

⁶¹ Rohan TE, Burk RD y Franco EL. 2003. Toward a reduction of the global burden of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 189: 37-39

fisiológicas y por los destacados niveles de expresión de proteínas heterólogas⁶², además de la disponibilidad de varios vectores. Otros microorganismos, en algunas ocasiones más ventajosos, también han sido empleados, entre otros el género *Bacillus*^{63,64}.

La posibilidad de producir proteínas recombinantes en hospedadores heterólogos ha facilitado el diseño de bacterias y virus recombinantes vivos que expresan el inmunógeno foráneo. La principal ventaja de estos vectores es que el antígeno heterólogo es presentado en su conformación nativa. La información genética disponible hace posible la selección *a priori* de los genes bacterianos o virales implicados en la patogenicidad, mejorando así la seguridad de los vectores. La capacidad de las bacterias para expresar proteínas externas sobre su superficie también permite su utilización como vectores vivos. Su construcción fue descrita primeramente en bacterias tales como *E. coli* o *Shigella* y *Streptococcus pyogenes* o *Staphylococcus aureus*⁶⁵. Algunos virus también han sido utilizados con la misma finalidad^{66, 67}.

Las vacunas basadas en ácidos nucleicos constituyen un nuevo tipo de vacunas de subunidades recombinantes, consistentes en ADN plasmídico que contiene genes que codifican el antígeno de interés cuya expresión es controlada por un promotor viral. Estas vacunas han demostrado su capacidad para generar una

⁶² **Makrides SC.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 60: 512-538

⁶³ **Billman-Jacobe H.** 1996. Characterization of a *Mycobacterium smegmatis* mutant lacking penicillin binding protein 1. *Antimic Ag Chemr*, 43: 3011-3013

⁶⁴ **Nagahama M, Michiue K y Sakurai J.** 1996. Production and purification of *Clostridium perfringens* alpha-toxin using a protein-hyperproducing strain, *Bacillus brevis* 47. *FEMS Microbiol Lett*, 145: 239-243

⁶⁵ **Hansson M, Per-Ake N y Stahl S.** 2000. Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnol Appl Biochem*, 32: 95-107

⁶⁶ **Ellis RW.** 1999. Effect of air abrasion and acid etching on sealant retention: an in vitro study. *Pediatr Dent*, 21: 316-319

⁶⁷ **Liljeqvist S y Stahl S.** 1999. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol*, 73: 30-33

respuesta inmune humoral y celular⁶⁸. Además de las ventajas de las vacunas basadas en subunidades, la técnica facilita: la construcción y producción del antígeno, realizar modificaciones post-transduccionales y su exposición al sistema inmune del hospedador. Uno de los mayores inconvenientes que se le atribuyen a estas estrategias es la posibilidad de integración del ADN en el genoma del hospedador, riesgo que se minimiza al reemplazar el ADN por ARN. La siguiente tabla recoge las características de las vacunas recombinantes comentadas anteriormente.

Tabla 2.- Ventajas e inconvenientes de las vacunas recombinantes

Vacunas Recombinantes	Ventajas (+) / Inconvenientes (-)
1. Inmunógenos proteicos	+ Ausencia de riesgo potencial de patogenicidad + Sistemas de producción disponibles - Se necesita de múltiples dosis - Necesita adyuvantes
2. Sistemas vivos	+ Puede inducir respuesta humoral y celular + No necesita adyuvantes - Riesgo de reversión cuando se utilizan organismos atenuados
<i>Bacterias</i>	+ Posible exposición y despliegue en la superficie de la membrana + Posible administración por la mucosa
<i>Virus</i>	+ Inducción eficiente de respuesta celular
3. Vacunas basadas en ácidos nucleicos	+ Ausencia de riesgo de patogenicidad + Producción simple + Puede inducir respuesta humoral y celular - Respuesta inmune variable - Transfección ineficiente
<i>ADN</i>	+ Disponibilidad de sistemas de presentación - Presentación ineficiente - Riesgo de integración en el cromosoma del hospedador - Respuesta inmune moderada y variable

⁶⁸ Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW y col. 1997. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol*, 15: 617-648

La fusión de genes permite la expresión de proteínas fusionadas que combinan las propiedades de cada una de ellas. La fusión de la proteína de interés a otra añade grandes beneficios a su manipulación, facilitando la purificación, incrementando su solubilidad, evitando la proteólisis o dirigiendo su localización a diferentes compartimentos de la célula. Tiene la ventaja de permitir incrementar la vida media de las proteínas terapéuticas, el acoplamiento al inmunógeno de proteínas transportadoras y de facilitar su exposición sobre la superficie de células. Ha sido muy utilizada para combinar epítopos reconocidos por células T y B, al mejorar la respuesta de los inmunógenos, y para simplificar la emulsión de proteínas hidrofílicas en adyuvantes⁶⁹.

2.1.b La tecnología genómica

*** Vacunología reversa**

Como ya se ha comentado, la secuenciación de los genomas de varios patógenos humanos propició el cambio en la estrategia de identificación y análisis de las proteínas antigénicas útiles en el desarrollo de vacunas. El genoma contiene la secuencia de todas las proteínas que el patógeno puede expresar durante las distintas etapas de su ciclo infectivo. Actualmente, con la ayuda de programas informáticos, es posible elegir las proteínas potencialmente expuestas en superficie, purificarlas y analizar su eficacia como antígenos. Esta metodología tiene las ventajas, entre otras, de ser aplicable a microorganismos no cultivables, reconocer proteínas que no se expresan *in vitro* y ahorrar tiempo en la investigación de los candidatos, mejorando la estrategia empleada clásicamente. Sin embargo, el inconveniente de este sistema es la dificultad de identificar antígenos no proteicos,

⁶⁹ Andersson C, Sandberg L, Wermérus H y col. 2000. Improved systems for hydrophobic tagging of recombinant immunogens for efficient iscom incorporation. *J Immunol Methods*, 21: 181-193

como los polisacáridos, que son importantes componentes de varias vacunas desarrolladas con éxito.

Varios ejemplos que utilizan esta metodología han sido aplicados tanto a bacterias como a virus. La secuenciación del genoma completo de una cepa virulenta de *N. meningitidis*⁷⁰ permitió su aplicación para la investigación de nuevos candidatos vacunales que diesen solución a la meningitis contra el serogrupo B⁷¹. Se utilizan diferentes programas informáticos para reconocer fragmentos de lectura abierta (ORF) que codifican posibles proteínas expuestas en superficie o excretadas. Todos los ORFs se examinan para buscar las secuencias del péptido señal e identificar las probables regiones hidrofóbicas o lipoproteínas. Estas secuencias amplificadas por PCR, se clonan en *E. coli* y, tras la expresión de la proteína, se purifican para obtener sueros en ratones. Posteriormente, con las técnicas de western blotting y citometría de flujo (FCM) se analiza la especificidad, accesibilidad y se verifica su localización en la membrana externa. La protección inducida por el suero es estudiada analizando la capacidad de activar la vía clásica del complemento. Además, el análisis de la variabilidad de su secuencia entre cepas de la especie permite reconocer las zonas más variables de la proteína. En pocos años esta técnica permitió la identificación de algunos antígenos que actualmente están siendo considerados como posibles candidatos vacunales^{72,73}.

⁷⁰ **Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg y col.** 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*, 10: 1809-1815

⁷¹ **Pizza M, Scarlato V, Masignani V y col.** 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, 287: 1816-1820

⁷² **Granoff DM, Moe GR, Giuliani MM y col.** 2001. A novel mimetic antigen eliciting protective antibody to *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol*, 167: 6487-6496

⁷³ **Comanducci M, Bambini S, Brunelli B y col.** 2002. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J. Exp Med*, 195: 1445-1454

Esta técnica empleada en *N. meningitidis* también fue utilizada durante los últimos años para identificar otros candidatos en distintos patógenos bacterianos^{74,75,76}. En virus, el concepto de vacunología reversa es nuevo. Recientemente, se analizó mediante esta tecnología la información genómica de antígenos que no forman parte de la cápsula viral o están presentes en baja cantidad y que no pudieron ser purificados y analizados por las técnicas convencionales. Estos antígenos ya están mostrando resultados prometedores^{77, 78}.

Tabla 3.- Características de la vacunología convencional y reversa en el desarrollo de vacunas

Vacunología convencional	Vacunología reversa
- Análisis de los antígenos más abundantes durante la enfermedad - Identificación de antígenos expresados <i>in vitro</i> - Aplicable únicamente a microorganismos cultivables - Imprescindible el estudio de protección en modelos animales - Basada en componentes estructurales del microorganismo - Los polisacáridos, lipooligosacáridos o glicolípidos pueden ser analizados	- Análisis de todos los antígenos durante la enfermedad - Identificación de antígenos expresados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> - Aplicable a microorganismos cultivables y no cultivables - Imprescindible el estudio de protección en modelos animales - Basada en componentes no estructurales, incluyendo proteínas tempranas de virus - Precisa de una correcta conformación de las proteínas recombinantes expresadas - No permite analizar antígenos no proteicos

* Tomada de: **Adu-Bobie J, Capecchi B, Serruto D y col.** 2003. Two years into reverse vaccinology. *Vaccine*, 21: 605-610.

⁷⁴ **Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE y col.** 2001. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*; 69: 1593-1598

⁷⁵ **Ross BC, Czajkowski L, Hocking D y col.** 2001. Identification of vaccine candidate antigens from a genomic analysis of *Porphyromonas gingivalis*. *Vaccine*, 19: 4135-4142

⁷⁶ **Montigiani S, Falugi F, Scarselli M y col.** 2002. Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*, 70: 368-379

⁷⁷ **Pauza CD, Trivedi P, Wallace M y col.** 2000. Vaccination with tat toxoid attenuates disease in simian/HIV-challenged macaques. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 3515-3519

⁷⁸ **Osterhaus AD, van Baalen CA, Gruters RA y col.** 1999. Vaccination with Rev and Tat against AIDS. *Vaccine*, 17: 2713-2714

En conclusión, la vacunología reversa ha reducido el tiempo de identificación de componentes inmunológicamente activos solventado gran parte de los problemas de las vacunas difíciles de desarrollar con la estrategia empleada en la vacunología convencional. No obstante y pese a dichas mejoras, esta tecnología dificulta el conocimiento de la eficacia protectora inducida por el inmunógeno, la cual debe ser valorada por diferentes patrones subrogados de protección (actividad bactericida del suero, opsonofagocitosis, entre otros).

*** Genómica comparativa**

La secuenciación de más de 200 genomas en bacterias y más de 400 en virus ha aportado una cantidad de información que permite tanto la identificación de candidatos vacunales como de posibles dianas para antibióticos. El desarrollo de la informática facilita la comparación del genoma entre dos o más microorganismos en pocos segundos. El análisis de toda la información de la secuencia del genoma es esencial para predecir e identificar posibles dianas con un mínimo grado de incertidumbre. En particular, el análisis de la variabilidad genética entre patógenos o microorganismos no patogénicos relacionados, facilita la rápida identificación de fragmentos de ADN que codifican para factores relacionados con la virulencia, denominados también “*islas de patogenicidad*”, que son adquiridas por transferencia horizontal de genes y están ausentes en microorganismos no patógenos. Además, esta técnica es utilizada para seleccionar epítomos reconocidos por células B y T, acercándose al emergente campo de la inmunología computacional⁷⁹.

Otra nueva tecnología parece revolucionar el campo de la hasta ahora olvidada inmunización pasiva, utilizando los clones de células B de memoria que son más eficientes en personas inmunizadas o infectadas. Esta técnica permite analizar

⁷⁹ Groot AS y Rappuoli R. 2004. Genome-derived vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 3: 59-76

anticuerpos monoclonales de muy alta afinidad contra microorganismos, así como el aislamiento de clones celulares que pueden ser terapéuticamente muy efectivos. La terapia podría utilizarse para dar solución a algunas enfermedades de las que no se dispone de vacuna en la actualidad. Los resultados recientes de García-Suárez y colaboradores⁸⁰ han demostrado que la protección pasiva puede ser aplicada contra la enfermedad neumocócica puesto que la inmunización de ratones con anticuerpos monoclonales ha impedido el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, el perfeccionamiento de terapias basadas en anticuerpos puede ser extremadamente útil para promover el desarrollo de vacunas frente a otras enfermedades.

*** Genómica funcional**

La genómica funcional ofrece una nueva perspectiva para la producción de mutantes atenuados que podrían utilizarse como vacunas vivas o en sistemas para la producción de antígenos heterólogos. Estas técnicas se basan en establecer una correlación funcional entre genes/proteínas con el fenotipo, así como con la expresión de la patogenicidad.

- Tecnología del ADN en microarrays

La tecnología de *microarrays* o microchips de ADN es una poderosa herramienta que permite el estudio del transcriptoma. La técnica se basa en hacer hibridar el ARN, sintetizado por la bacteria en unas determinadas condiciones, con fragmentos de ADN específicos fijados sobre la superficie de un chip. La expresión génica puede estudiarse bien para examinar cada gen de forma aislada y valorar su comportamiento diferencial al modificar las condiciones externas, o bien, para analizar el comportamiento conjunto de varios genes que constituyen un “*cluster*” o agrupamiento de genes en términos de funcionalidad, interacción o

⁸⁰ **García-Suarez M, Cima-Cabal MD, Florez N y col.** 2004. Protection against pneumococcal pneumonia in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin. *Infect Immun*, 72: 4534-4540

regulación cruzada. Su aplicación a la vacunología está centrada en analizar genes implicados en la virulencia^{81,82}, y consecuentemente, identificar nuevos candidatos vacunales.

En *N. meningitidis* se estudió la interacción del microorganismo con células epiteliales tanto en bacterias adherentes como no adherentes. Después de la adhesión bacteriana se observaron alteraciones en la expresión de 350 genes que se agruparon en cinco categorías⁸³. Con estas observaciones se pudieron identificar 12 antígenos expuestos en superficie. En un estudio más reciente se reconocieron nuevos candidatos proteicos al analizar la expresión génica en bacterias incubadas en suero humano y en células epiteliales y endoteliales⁸⁴.

El conocimiento de los mecanismos de protección que emplea cada vacuna es un requisito esencial para diseñar nuevas formulas vacunales. El perfil de expresión génica y el análisis inmunohistoquímico pueden revelar estos mecanismos de protección⁸⁵.

En los últimos años se han publicado enormes avances en la tecnología del ADN en “*microarrays*” tanto en el descubrimiento de nuevos genes como en el desarrollo de vacunas o antibióticos. Sin embargo, esta herramienta está limitada: a) porque los resultados de la expresión génica están sometidos al modelo utilizado y, b), porque los niveles de ARNm no reflejan exactamente la cantidad de proteína, y su expresión no implica necesariamente una consecuencia patológica. Consecuentemente, continúan siendo necesarios los estudios tradicionales de biología, patología y toxicidad.

⁸¹ **Cohen P, Bouaboula M, Bellis M y col.** 2000. Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. *J Biol Chem*, 275: 11181-11190

⁸² **Mills JC, Syder A, Hong CV y col.** 2001. Molecular profile of the mouse gastric parietal cell with and without exposure to *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:13687-13692

⁸³ **Grifantini R, Bartolini E, Muzzi A y col.** 2002. Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. *Nat Biotechnol*, 20: 914-921

⁸⁴ **Kurz S, Hubner C, Aepinus C y col.** 2003. Transcriptome-based antigen identification for *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, 21: 768-75

⁸⁵ **Mueller A, O'Rourke J, Chu P y col.** 2003. Protective immunity against *Helicobacter* is characterized by a unique transcriptional signature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 12289-12294

Algunas enfermedades infecciosas como el caso que nos ocupa, todavía carecen de una vacuna efectiva. La publicación del genoma completo de algunos patógenos puede proporcionar un acercamiento a su desarrollo. El avance de la tecnología genética permite identificar un gran número de antígenos de los que se evaluará sus características inmunológicas, acortando de este modo el tiempo de búsqueda de candidatos y aumentando las probabilidades de hallar el más adecuado.

- Tecnologías de investigación de la expresión genética in vivo

El reconocimiento de antígenos a partir de genes que se expresan específicamente cuando la bacteria infecta al hospedador se ha realizado por varias tecnologías, como las denominadas “*in vivo induced antigen technology*” (IVIAT), “*in vitro expresión technology*” (IVET) o “*recombination based in vivo expresión technology*” (RIVET).

La primera de las tecnologías citadas permite identificar productos génicos que son reconocidos por el sistema inmune del hospedador⁸⁶. Para ello, es necesario disponer y seleccionar anticuerpos de pacientes que reconocen antígenos expresados “*in vivo*”. Su ventaja sobre otras es que no requiere la manipulación genética del patógeno o de animales de experimentación.

Mahan y colaboradores⁸⁷ diseñaron la técnica IVET para identificar promotores de genes inducidos exclusivamente en los tejidos del hospedador, lo que ha permitido reconocer genes de virulencia en especies patógenas^{88,89}. Más recientemente, la tecnología RIVET está facilitando la detección de genes de

⁸⁶ **Handfield M, Brady JF, Progulske FA y col.** 2000. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. *Trends Microbiol*, 8: 336-839

⁸⁷ **Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ.** 1993. Bacteriophage P22 transduction of integrated plasmids: single-step cloning of *Salmonella typhimurium* gene fusions. *J Bacteriol*, 175: 7086-7091

⁸⁸ **Young GM y Miller VL.** 1997. Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Mol Microbiol*, 25: 319-328

⁸⁹ **Lowe AM, Beattie DT y Deresiewicz RL.** 1998. Identification of novel *Staphylococcal* virulence genes by in vivo expression technology. *Mol Microbiol*, 27: 967-976

expresión variable temporalmente durante la adaptación a un nuevo medio⁹⁰. Otras utilidades de estas técnicas implican las librerías de expresión del genoma, vacunación con ADN o librerías péptido-genomas.

- Tecnologías de inhibición funcional de genes

Son varias las técnicas que han sido desarrolladas con el fin de eliminar la función de determinados genes para obtener o detectar mutantes. Entre estas, la denominada “*signature-tagged mutagenesis*” (STM) permite identificar genes microbianos necesarios para la infección en un hospedador animal o en células de hospedadores⁹¹. Al mismo tiempo, facilita la identificación de proteínas esenciales para la infección o enfermedad, que podrían ser candidatos vacunales. Su aplicación en *N. meningitidis* permitió identificar 73 genes con un papel esencial en la bacteriemia y 16 candidatos vacunales que actualmente se están estudiando⁹². Esta tecnología también ha sido utilizada con éxito en otras bacterias patógenas⁹³.

También han sido desarrolladas otras técnicas con el mismo objetivo, como la denominada “*transposon site hybridization*” (TraSH), aplicada a la identificación de genes expresados bajo condiciones específicas⁹⁴, o la “*genome analysis and mapping by in vitro transposition*” (GAMBIT), para inducir mutagénesis en regiones restringidas del genoma⁹⁵.

⁹⁰ **Slauch JM y Camilli A.** 2000. IVET and RIVET: use of gene fusions to identify bacterial virulence factors specifically induced in host tissues. *Methods Enzymol*, 326: 73-96

⁹¹ **Shea JE, Santangelo JD y Feldman RG.** 2000. Signature-tagged mutagenesis in the identification of virulence genes in pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 3: 451-458

⁹² **Sun YH, Bakshi S, Chalmers R y col.** 2000. Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat Med*, 6: 1269-1273

⁹³ **Coulter SN, Schwan WR, Ng EY y col.** 1998. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Mol Microbiol*, 30: 393-404

⁹⁴ **Sasseti CM, Boyd DH y Rubin EJ.** 2001. Comprehensive identification of conditionally essential genes in *mycobacteria*. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 98: 12712-12717

⁹⁵ **Sasseti CM, Boyd DH y Rubin EJ.** 2003. Genes required for *mycobacterial* growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol*, 48: 77-84

2.2 La búsqueda del antígeno universal: *N. meningitidis*

Como ya se ha indicado anteriormente en el apdo. 1.3.c, las vacunas basadas en OMVs contra el serogrupo B de *N. meningitidis* han demostrado que son seguras pero solamente eficaces contra algunas cepas (ver apdo. 1.3). En general, los anticuerpos funcionales obtenidos después de la inmunización no reaccionan de forma cruzada contra todas las cepas debido, sobre todo, a que la acción bactericida del suero es dirigida predominantemente contra la variante antigénica de la proteína PorA (ver siguiente apdo.) introducida en la vacuna^{96,97}. La escasa reactividad cruzada de estas vacunas y la inmunotolerancia al polisacárido capsular del serogrupo B han obligado a buscar otros candidatos conservados en la especie que, independientemente del serogrupo, sean capaces de inducir anticuerpos que provoquen la bacteriolisis y opsonofagocitosis. Estas estructuras supondrían la base de una vacuna polivalente que eliminaría el posible problema del cambio de cápsula (ver apdo. 1.3.c, sbapdo. vacuna polisacáridica conjugada). Diversos antígenos no capsulares se han caracterizado por presentar una variabilidad antigénica menor que la proteína PorA y capacidad para estimular la generación de anticuerpos funcionales y están ya en avanzado estado de desarrollo algunas vacunas basadas en dichos antígenos⁹⁸.

Actualmente, parece que las proteínas de membrana externa o los LOS, por sus características moleculares y antigénicas, son la principal alternativa para eliminar los inconvenientes de las vacunas hasta ahora desarrolladas contra la enfermedad meningocócica.

⁹⁶ **Clark S, Borrow R, Sadler F y col.** 1998. Immunoblotting investigation of UK infants sera collected during a phase 2 study of a PorA recombinant meningococcal vaccine. Nassif, X (ed). En: *11th International Pathogenic Neisseria Conference*, p 798, EDK, París

⁹⁷ **Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM y col.** 1999. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *J Am Med Assoc*, 281: 1520-1527

⁹⁸ **Findlow J, Lowe A, Deane S y col.** 2005. Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine in toddlers and school children. *Vaccine*, 23: 2623-2627

2.2.a Características generales del antígeno ideal

Los antígenos adecuados para incorporar en una vacuna universal frente a la enfermedad meningocócica deben cumplir diferentes requisitos fundamentales:

➤ *Características genéticas y moleculares*

- Conservación en la especie y carencia de variabilidad antigénica en los principales clones causantes de la enfermedad.
- Expresión en la superficie externa del patógeno, tanto *in vitro* como *in vivo*, y tanto en la fase de portador como durante todo el proceso infeccioso.
- Exposición en la superficie en todas las cepas de la especie durante la invasión e infección.
- Ausencia de toxicidad o reactogenicidad, o en caso contrario poder eliminarla sin alterar su inmunogenicidad de forma negativa.

➤ *Capacidad inmunogénica*

- Antigenicidad e inducción de respuesta timo-dependiente y por lo tanto capacidad para generar memoria inmunológica duradera, tanto en adultos como en niños de corta edad, y sin necesidad de sucesivas administraciones.
- Generación de anticuerpos protectivos contra la invasión por cualquier cepa de la especie independientemente de sus características genéticas o su serogrupo, primero, en los modelos de animales de experimentación y, posteriormente, en humanos durante los ensayos clínicos.

➤ *Producción y estabilidad*

- Facilidad para su purificación y producción sin variar su estructura molecular mediante las técnicas actuales.
- Estabilidad en los preparados vacunales durante largos periodos de tiempo y no alteración ante variaciones de temperatura.

2.2.b Variabilidad genética y molecular de los candidatos: relación con su antigenicidad

La variabilidad antigénica de las OMPs y LOS ha impedido, hasta el momento, el uso de una formula vacunal que resuelva el problema del serogrupo B. En la superficie del meningococo, así como en otros patógenos, se han estudiado gran número de candidatos vacunales, que pese a inducir una respuesta inmune prometedora contra determinadas cepas, su variabilidad antigénica ha reducido sus posibilidades para su inclusión en una formula vacunal universal (ver apdo. 2.2.b). La importancia de este mecanismo radica en que la respuesta funcional se reduce a un número limitado de cepas con características moleculares similares, lo que dejaría a los individuos vacunados expuestos a la invasión por otras cepas molecularmente divergentes. En este aspecto, es interesante que en el estudio de la candidatura de ciertas moléculas se incluyan análisis exhaustivos acerca de su variabilidad molecular y antigénica. Para conocer y cuantificar dichos parámetros, considerados como fundamentales en el estudio de OMPs de *N. meningitidis*, las últimas tendencias en vacunología se dirigen hacia el uso combinado de la bioinformática y los datos aportados por las técnicas inmunológicas, moleculares y genéticas tradicionales^{99,100}. Esta fusión de herramientas permite, en gran medida, analizar la divergencia genética y predecir su implicación estructural o antigénica¹⁰¹, basándose en la comparación con otras ya conocidas.

La generación de mapas de epítomos puede proporcionar información útil sobre la ubicación de las zonas de unión de los anticuerpos. No obstante, es fundamental conocer la estructura de dicha región en relación con la del resto de la molécula y de regiones próximas, ya que pequeñas variaciones en la conformación de la

⁹⁹ Petrovsky N y Brusica V. 2002. Computational immunology: the coming of age. *Immunol Cell Biol.*, 80: 248-254

¹⁰⁰ Zagursky RJ y Rusell D. 2001. Bioinformatics: use in bacterial vaccine discovery. *Biotechniques*, 31: 636-640

¹⁰¹ Doytchinova IA y Flower DR. 2002. Quantitative approaches to computational vaccinology. *Immunol Cell Biol.*, 80: 270-279

proteína pueden inducir a la variabilidad antigénica sin necesidad de alterar los epítopos lineales. En este sentido, la adquisición de datos a partir de la secuenciación del gen codificante, y su análisis posterior mediante algoritmos proporcionan información útil acerca del beneficio del antígeno, así como de la posible elección de las variantes antigénicas más adecuadas. El desarrollo de ciertos programas informáticos especializados permite reconocer varias características de las proteínas en base a su secuencia aminoacídica (hidrofobicidad, regiones expuestas, etc.), y predecir su estructura tridimensional o, incluso, los lugares de unión de los anticuerpos o los epítopos lineales por el complejo MHC, sin necesidad de realizar previos estudios inmunológicos^{102,103,104,105}.

La inmunoinformática también puede ser muy útil para buscar regiones conservadas que mantengan epítopos entre cepas, lo cual permitiría la síntesis de péptidos mediante la tecnología del ADN recombinante. Dichos epítopos, pese a estar conservados, además deben unirse a múltiples alelos MHC para establecer una respuesta T en la mayoría de la población. Encontrar epítopos que cumplan ambos requisitos resulta una práctica bastante difícil y laboriosa mediante la vacunología convencional, donde las herramientas computacionales podrían reducir enormemente el tiempo de búsqueda.

En resumen, toda esta tecnología informática apoyada en el conocimiento de los genomas está sirviendo para estudiar varias OMPs y analizar la variabilidad

¹⁰² **Kolaskar AS y Tongaonkar PC.** 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein Antigens. *FEBS*, 276: 172-174

¹⁰³ **Alix AJ.** 1999. Predictive estimation of protein linear epitopes by using the program PEOPLE. *Vaccine*, 18: 311-314

¹⁰⁴ **Yu K, Petrovsky YK, Schönbach C y col.** 2002. Methods for prediction of peptide binding to MHC molecules: a comparative study. *Mol Med*, 8: 137-148

¹⁰⁵ **Zhang C, Anderson A y DeLisi C.** 1998. Structural principles that govern the peptide-binding motifs of class I MHC molecules. *J Mol Biol*, 281: 929-947

antigénica, con la finalidad de poder iniciar una estrategia de inmunización que optimice las propiedades del antígeno para su uso vacunal¹⁰⁶.

2.2.c Capacidad protectora: La actividad bactericida del suero

Ya a principios del siglo XX se demostró la implicación de los anticuerpos circulantes y del sistema del complemento en la protección frente a la enfermedad meningocócica. Su importancia para combatir las infecciones por *Neisseria* fue determinada, por una parte, por el hecho de que personas deficientes en proteínas del complemento (factor C3, componentes terminales o properdina) presentan una cierta predisposición a padecer episodios recurrentes de la enfermedad meningocócica¹⁰⁷, y por otra, por el hecho de que el microorganismo ha desarrollado varios mecanismos de resistencia contra este, que se han relacionado con graves patologías, como la enfermedad severa meningococcal o la meningitis meningocócica¹⁰⁸. La investigación de estos mecanismos es beneficiosa en el desarrollo de vacunas, especialmente en el caso del serogrupo B debido a la pobre inmunogenicidad de algunos componentes de su envoltura y la variabilidad de otros (comentado en el apdo. 1.3.c). Avances en el conocimiento de la relación entre la superficie del meningococo y la inmunidad humoral podría implicar grandes mejoras en este campo.

Una de las técnicas que permiten detectar la presencia de anticuerpos que activan el sistema del complemento es la denominada actividad bactericida del suero (SBA). Dicho ensayo se ha correlacionado con la inmunidad frente a la enfermedad y, por ello, la inducción de anticuerpos bactericidas después de la vacunación se considera una evidencia aceptable de la eficacia potencial de las

¹⁰⁶ **Livingston BD, Newman M, Crimi C y col.** 2001. Optimization of epitope processing enhances Immunogenicity of multi-epitope DNA vaccines. *Vaccine*, 19: 4652-4660

¹⁰⁷ **Ram S, Mackinnon FG, Gulati S y col.** 1999. The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol*, 36: 915-928

¹⁰⁸ **Vogel U y Frosch M.** 1999. Mechanisms of *Neisseria* serum resistance. *Mol Microbiol*, 32: 1133-1139

vacunas¹⁰⁹. En 1976, la Organización Mundial de la Salud recomendó el uso de esta técnica para valorar la producción y funcionalidad de las vacunas polisacáridicas, y, desde ese momento, es una condición indispensable para la concesión de la licencia a las formulaciones desarrolladas, siendo necesario que los adultos inmunizados presenten en su suero anticuerpos bactericidas contra las cepas seleccionadas, al menos a dilución $2,5 \times 10^{-1}$ ¹¹⁰.

Un suero es considerado bactericida cuando provoca la muerte de al menos el 50% de las células respecto a un suero que no presenta anticuerpos bactericidas.

Los estudios clásicos de Goldschneider y col¹¹¹ establecieron la SBA como la técnica estándar para valorar la protección. Estos autores utilizaron complemento humano de individuos agammaglobulémicos como fuente exógena de complemento. Sin embargo, debido a la dificultad que supone disponer de este tipo de fuente se recomendó el uso de complemento de conejo con objeto de estandarizar los ensayos para una correcta evaluación de la vacuna polisacáridica. Posteriormente, se observó que dicha modificación conlleva problemas interespecies¹¹², por lo que para evaluar la SBA en presencia de complemento de conejo se establecieron diluciones del suero mayores.

¹⁰⁹ **Jodar L, Griffiths E y Feavers I** 2004. Scientific challenges for the quality control and production of group C meningococcal conjugate vaccines. *Vaccine*, 22: 1047-1053

¹¹⁰ **World Health Organization** 1976. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. *World Health Organ Techn Rep series*, 594. Geneva, Switzerland

¹¹¹ **Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS** 1969. Human immunity to the meningococcus I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med*, 129: 1307-1326

¹¹² **Santos GF, Deck RR, Donnelly J y col** 2001. Importance of complement source in measuring meningococcal bactericidal titers. *Clin Diag Lab Immunol*, 8: 616-623

2.2.d Candidatos vacunales contra la meningitis meningocócica

*** Proteínas mayoritarias o de Clase**

Las proteínas mayoritarias de Clase 1, 2 y 3 son porinas con un importante papel en la patogénesis e inmunidad, debido a la activación de las células B y otras células presentadoras de antígenos. Su potencial vacunal ha sido analizado por su elevada expresión en superficie e inmunogenicidad, características que las hacen, *a priori*, buenos candidatos.

La proteína de clase 1 (PorA) es una porina catiónica expresada, exclusivamente, en la membrana externa de *N. meningitidis*, con un nivel de expresión considerablemente variable¹¹³. La diversidad antigénica está determinada por dos regiones cortas y también variables, localizadas en los extremos de varios lazos expuestos en la superficie¹¹⁴. Los anticuerpos dirigidos contra estas regiones son bactericidas e inducen protección en modelos animales y en voluntarios sanos inmunizados con vacunas basadas en OMVs¹¹⁵. Su capacidad protectora ha justificado su inclusión en dichas fórmulas y el desarrollo de una vacuna basada en seis variantes de PorA. Sin embargo, su diversidad antigénica limita la reactividad cruzada tanto en la vacuna mono como hexavalente, restringiendo su uso.

La proteína de Clase 2 y 3 (PorB) funciona como una porina aniónica, que se ubica en la membrana externa de *N. meningitidis* y *N. lactamica*, formando complejos triméricos. Esta proteína se presenta en dos variantes alélicas excluyentes: PorB2 (proteína mayoritaria de Clase 2) y PorB3 (proteína

¹¹³ Poolman JT, Marie S y Zanen HC. 1980. Variability of low-molecular-weight, heat-modifiable outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 30: 642-648

¹¹⁴ Russel JE, Jolley KA, Feavers IM y col. 2004. PorA Variable Regions of *Neisseria meningitidis*. *Emerg Infect Dis*, 10: 674-678

¹¹⁵ Voort ER, Van der Ley P, Van der Viesen J y col. 1996. Specificity of human bactericidal antibodies against PorA P1.7,16 induced with a hexavalent meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun*, 64: 2745-2751

mayoritaria de Clase 3), cuya diversidad antigénica se localiza en dos regiones hipervariables correspondientes a dos lazos de la proteína.

Saukkonen y colaboradores¹¹⁶ demostraron en 1989 que los anticuerpos monoclonales anti-Clase 2 y 3 eran bactericidas e inducían protección en modelos animales de infección, especialmente en el caso de los anti-PorB2. La estimulación de anticuerpos contra la porina, por un lado en pacientes convalecientes y, por otro, tras la inmunización con la vacuna Noruega¹¹⁷, sugirió su implicación en una respuesta inmune protectora en humanos. Sin embargo, pese a esta buena respuesta inmunológica, Michaelsen y colaboradores¹¹⁸ observaron una accesibilidad muy reducida de la PorB3 en determinados serotipos de la especie.

Por otra parte, el efecto adyuvante de la PorB se ha aprovechado para incrementar la respuesta humoral contra sustancias poco inmunogénicas, en vacunas contra la malaria o *Haemophilus influenzae* tipo b. Asimismo, una PorB recombinante también se conjugó a un polisacárido semisintético para producir una vacuna contra el serogrupo B.

La proteína de Clase 4 (RmpM) parece ser un estabilizador de diferentes complejos, receptores de membrana y poros, en diferentes especies del género *Neisseria*¹¹⁹. Esta proteína une anticuerpos específicos que parecen bloquear la actividad bactericida contra las proteínas de Clase 1, 2 o 3¹²⁰. Dicha característica

¹¹⁶ Saukkonen R, Leinonen M, Abdillahi H y col. 1989. Comparative evaluation of potential components for group B meningococcal vaccine by passive protection in the infant rat and in vitro bactericidal assay. *Vaccine*, 7: 325-328

¹¹⁷ Aase A, Bjune G, Hoiby EA y col. 1995. Comparison among opsonic activity, anti-meningococcal immunoglobulin G response, and serum bactericidal activity against meningococci in sera from vaccinees after immunization with a serogroup B outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun*, 63: 3531-3536

¹¹⁸ Michaelsen TE, Aase A, Kolberg J y col. 2001. PorB3 outer membrane protein or *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine*, 19: 1526-1533

¹¹⁹ Troncoso G, Sánchez S, Kolberg J y col. 2001. Analysis of the expression of the putatively virulence-associated neisserial protein RmpM in commensal *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 199: 171-176

¹²⁰ Munkley A, Tinsley CR, Virji M y col. 1991. Blocking of bacterial killing of *Neisseria meningitidis* by antibodies directed against class 4 outer membrane protein. *Microb Pathog*, 11: 447-452

podría afectar la inmunogenicidad de las vacunas meningococales basadas en/o que contuviesen OMPs, y, por tanto, carece de interés como candidato vacunal. No obstante, estudios posteriores no mostraron evidencias de este efecto bloqueante¹²¹.

Las proteínas de Clase 5 (Opa y Opc) son importantes en la adhesión y en la invasión de las células del hospedador. Los meningococos contienen cuatro copias de genes *opa*, pudiendo alternar el nivel de expresión y la variante proteica expresada. Los anticuerpos anti-Opas obtenidos en ratón son bactericidas, pero los inducidos en estado de portador no son protectivos contra cepas heterólogas. Por el contrario, la proteína Opc solamente cuenta con una única copia del gen, pero aún así, puede variar su expresión a nivel transcripcional. La Opc indujo anticuerpos bactericidas como se demostró en la administración de la vacuna Noruega, aunque estos no presentaron reactividad cruzada¹²².

*** Proteínas de restricción de hierro**

Las OMPs reguladas por la concentración de hierro, algunas de las cuales funcionan como receptores específicos de proteínas transportadoras o sideróforos, son candidatos vacunales atractivos porque su expresión resulta esencial para el crecimiento del patógeno *in vivo* y su función metabólica requiere de su exposición en superficie.

Las proteínas TbpA y TbpB, constituyentes del complejo de adquisición de hierro a partir de la transferrina, han sido muy estudiadas durante años en nuestro

¹²¹ Rosenqvist E, Musacchio A, Aae A y col. 1999. Functional activities and epitope specificity of human and murine antibodies against the class 4 outer membrane protein (RmpM) of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 67: 1267-1276

¹²² Jolley KA, Appleby L, Wright JC y col. 2001. Immunization with recombinant Opc outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of sequence variation and levels of expression on the bactericidal immune response against meningococci. *Infect Immun.* 69: 3809-3816

laboratorio¹²³ y en otros importantes grupos de investigación. El interés suscitado se debe a que inducen anticuerpos bactericidas y bloquean la adquisición de hierro¹²⁴, llegando incluso a inhibir su crecimiento cuando la transferrina es la única fuente del oligoelemento.

La TbpB continúa siendo una alternativa muy atractiva puesto que cumple varios de los requisitos exigidos al candidato ideal. Uno de los principales inconvenientes es que presenta heterogeneidad antigénica^{125,126}, y, aunque existen epítomos comunes entre cepas diferentes, su exposición también es variable, aún así genera protección contra la septicemia meningocócica en ratones¹²⁷. En humanos se ha visto que se expresa “*in vivo*” y que es inmunogénica en el transcurso de la infección¹²⁸. No obstante, en estudios clínicos posteriores se observaron escasos niveles de anticuerpos bactericidas.

Estudios previos, que examinaron la respuesta inmune de humanos a la TbpA, demostraron que durante la infección, la proteína es capaz de estimular una fuerte respuesta inmune¹²⁹. La demostración de que la TbpA sola, puede proteger contra la infección meningocócica de ratones, probablemente por mecanismos diferentes a la SBA, confirmó esta hipótesis. Varios trabajos sugieren que la TbpA es un

¹²³ **Ferreirós CM, Criado MT, Pintor M y col.** 1991. Analysis of the molecular mass heterogeneity of the transferrin receptor in *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria*. *FEMS Microbiol Lett*, 83: 247-254

¹²⁴ **Pintor M, Criado MT, Ferrón L y col.** 1996. Blocking of iron uptake from transferrin by antibodies against the transferrin binding proteins in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Pathog*, 20: 127-139

¹²⁵ **Ferrón L, Ferreirós CM, Criado MT y col.** 1992. Immunogenicity and antigenic heterogeneity of a human transferrin-binding protein in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 60: 2887-2892

¹²⁶ **Rokbi B, Renaud-Mongenie G, Mignon M y col.** 2000. Allelic diversity of the two transferrin binding protein B gene isotypes among a collection of *Neisseria meningitidis* strains representative of serogroup B disease: implication for the composition of a recombinant TbpB-based vaccine. *Infect Immun*, 68: 4938-4947

¹²⁷ **Danve B, Lissolo L, Mignon M y col.** 2000. Transferrin-binding proteins isolated from *Neisseria meningitidis* elicit protective and bactericidal antibodies in laboratory animals. *Vaccine*, 18: 2476-2481

¹²⁸ **Ferreirós CM, Ferrón L y Criado MT.** 1994. In vivo human response to transferrin-binding protein 2 and other iron-regulated proteins of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 8: 63-68

¹²⁹ **Johnson AS, Gorrings AR, Fox AJ y col.** 1997. Analysis of the human Ig isotype response to individual transferrin binding proteins A and B from *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 19: 159-167

inmunógeno más efectivo que la TbpB¹³⁰. West y colaboradores¹³¹ demostraron en ratones una mayor protección contra la septicemia meningococal cuando se inmunizan con TbpA-recombinante o con complejos de TbpA/B que cuando se inmuniza únicamente con la TbpB.

El receptor exógeno de sideróforos denominado FetA (anteriormente FrpB), ha sido objeto de estudio al estimular la generación de anticuerpos específicos en pacientes convalecientes y porque induce anticuerpos bactericidas en animales de experimentación¹³². Al igual que la proteína PorA, la existencia de una región inmunodominante¹³³ y muy variable¹³⁴, justifica que los anticuerpos policlonales anti-FetA no reaccionen ni sean funcionales con otras cepas de la especie. Pese a esto, la proteína parece estimular una respuesta inmune en vacunados¹³⁵.

Las proteínas LbpA y la LbpB constituyen las proteínas del complejo de unión a lactoferrina. Ambas, de igual modo que la TbpB y FetA, son inmunogénicas en humanos tras la infección, pero exhiben heterogeneidad antigénica. Aunque algunos pacientes convalecientes tienen anticuerpos contra LbpB, muchos no presentan actividad contra LbpA¹³⁶, probablemente por una nula exposición, y por ello no son adecuadas para la vacunación.

¹³⁰ **Pintor M, Gómez JA, Ferrón L y col** 1998. Analysis of TbpA and TbpB functionality in defective mutants of *Neisseria meningitidis*. *J Med Microbiol*, 47: 757-760

¹³¹ **West D, Reddin K, Matheson M y col.** 2001. Recombinant *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein A protects against experimental meningococcal infection. *Infect Immun*, 69: 1561-1567

¹³² **Pettersson A, Kuipers B, Pelzer M y col.** 1990. Monoclonal antibodies against the 70-kilodalton iron-regulated protein of *Neisseria meningitidis* are bactericidal and strains specific. *Infect Immun*, 58: 3036-3041

¹³³ **Van der Ley, Van der Viesen, J Suttmuller R y col** 1996. Sequence variability of FrpB, a major iron-regulated outer-membrane protein in the pathogenic *Neisseriae*. *Microbiology*, 142: 3269-3274

¹³⁴ **Thompson EA, Feavers IM y Maiden CJ.** 2003. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology*, 149: 1849-1858

¹³⁵ **Wedge E, Hoiby EA, Rosenqvist E y col.** 1998. Immune responses against major outer membrane antigens of *Neisseria meningitidis* in vaccines and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian serogroup B protection trial. *Infect Immun*, 66: 3223-3231

¹³⁶ **Jonhson AS, Gorringe AR, Mackinnon FG y col.** 1999. Analysis of the human Ig Isotype response to lactoferrin binding protein A from *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 25: 349-354

*** Antígenos derivados del genoma**

Como ya hemos comentado anteriormente en el apdo. 2.1.b., la tecnología genómica ha sido utilizada desde hace pocos años para identificar candidatos vacunales diferentes a los propuestos por la vacunología convencional. Tanto la vacunología reversa como la tecnología del ADN en *microarrays* han identificado genes que codifican probables OMPs¹³⁷. La clonación de estos genes y su expresión en *E. coli* ha permitido obtener los denominados “*Genome-derived Neisserial Antigens*” (GNA)¹³⁸. Estos antígenos han sido analizados para determinar su potencial vacunal y, algunos de ellos, fueron caracterizados bioquímica y funcionalmente. En general, las ventajas de los antígenos que han sido propuestos como candidatos vacunales se basan en su conservación en la especie o en el género, su exposición en la membrana externa y su capacidad para inducir anticuerpos funcionales. Pese a estas virtudes, la mayoría presenta variabilidad antigénica o de expresión, lo que genera una respuesta inmune disfuncional contra otras cepas de la especie. Los candidatos más relevantes han sido: GNA33, GNA2132, App, NhhA, NadA y GNA1870. Brevemente, a continuación se detallan sus características específicas:

Con respecto al antígeno GNA33, se corresponde con una lipoproteína con una importante función metabólica, estructural e implicada en la virulencia de la bacteria¹³⁹. Está presente en el meningococo y gonococo y posee capacidad para inducir protección en animales de experimentación. No obstante, su potencial

¹³⁷ Grifantini R, Bartolini E, Muzzi A y col. 2002. Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. *Nat Biotechnol*, 20: 914-921

¹³⁸ Pizza M, Scarlato V, Masignani V y col. 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, 287: 1816-1820

¹³⁹ Adu-Bobie J, Lupetti P, Brunelli B y col. 2004. GNA33 of *Neisseria meningitidis* is a lipoprotein required for cell separation, membrane architecture and virulence. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 28: 329-334

vacunal resulta dudoso ya que la protección parece producirse por mimetismo molecular con la proteína PorA¹⁴⁰.

El antígeno GNA2132 es codificado por un gen conservado en diferentes *Neisserias*. El potencial de este candidato fue analizado por Welchs y colaboradores¹⁴¹. Los autores resaltaron su importancia por la protección pasiva contra la enfermedad que ofrecía en ratones, probablemente mediada por opsonofagocitosis.

Tres de los antígenos identificados se han correspondido con potenciales adhesinas:

1) NhhA (también denominada GNA992), conservada en la especie y con una expresión variable¹⁴². Se ha observado que es accesible y capaz de generar títulos altos de anticuerpos bactericidas contra la cepa homóloga, aunque dicha actividad no se ha detectado en suero y muestras de pulmón tras una inmunización intranasal murina.

2) App (anteriormente GNA1985), conservada en cepas asociadas a la enfermedad¹⁴³ y reacciona con sueros de pacientes convalecientes y portadores del meningococo, indicando expresión *in vivo* y antigenicidad en humanos.

3) NadA, la cual ha sido considerada como uno de los candidatos más prometedores por estimular la síntesis de anticuerpos específicos en pacientes convalecientes, y, además, por intervenir en la adquisición de la inmunidad

¹⁴⁰ **Granoff DM, Moe GR, Giuliani MM y col.** 2002. A novel mimetic antigen eliciting protective antibody to *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol*, 167: 6487-6496

¹⁴¹ **Welsh AJ, Moe G, Rossi R y col.** 2003. Antibody to genome-derived neisserial antigen 2132, a *Neisseria meningitidis* candidate vaccine, confers protection against bacteremia in the absence of complement-mediated bactericidal activity. *J. Infect Dis*, 183: 1730-1739

¹⁴² **Peak IR, Srikhanta Y, Dieckelmann M y col.** 2002. Identification and characterisation of a novel conserved outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 70: 6021-6031

¹⁴³ **Serruto DJ, Adu-Bobie, Scarselli M y col.** 2003. *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. *Mol Microbiol*, 48: 323-334

natural¹⁴⁴. Dicha proteína es codificada por cuatro alelos, y aunque varios estudios revelaron su capacidad para generar anticuerpos bactericidas contra cepas heterólogas, lamentablemente la respuesta no ha sido efectiva contra la totalidad^{145,146,147}.

El interés por estas proteínas radica en que su unión a anticuerpos podría generar un importante efecto inhibitor en la adhesión de la bacteria, paso imprescindible para que se inicie la infección.

Masigani y colaboradores¹⁴⁸, identificaron recientemente una lipoproteína que han denominado GNA1870. En base a su caracterización, los autores consideraron dos limitaciones principales para su uso vacunal: su expresión variable y la divergencia de la secuencia del gen entre cepas del meningococo, estableciendo tres subgrupos o variantes alélicas. Su eficacia protectora se restringe a cepas que expresan la misma variante¹⁴⁹.

*** Vacunas basadas en OMVs de *N. lactamica***

La flora saprófita existente en la orofaringe está constituida por diferentes especies comensales y patógenas pertenecientes al género *Neisseria* (como *N. lactamica*, *N. sicca*, etc...) o a otros géneros bacterianos (como *Moraxella catarrhalis*). Dichas especies pueden presentar antígenos comunes con el

¹⁴⁴ **Litt DJ, Savino SS, Beddek A, y col.** 2004. Putative vaccine antigens from *Neisseria meningitidis* recognized by serum antibodies of young children convalescing after meningococcal disease. *J Infect Dis*, 190: 1488-1496

¹⁴⁵ **Bowe F, Lavelle EC, McNeela NE y col.** 2004. Mucosal vaccination against serogroup B meningococci: induction of bactericidal antibodies and cellular immunity following intranasal immunization with NadA of *Neisseria meningitidis* and mutants of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Infect Immun*, 72: 4052-4060

¹⁴⁶ **Comanducci M, Bambini S, Brunelli B y col.** 2002. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med*, 195: 1445-1454

¹⁴⁷ **Comanducci M, Bambini S, Caugant y col.** 2004. NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 72: 4217-4223

¹⁴⁸ **Masignani V, Comanducci M, Giuliani S y col.** 2003. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA 1870. *J Exp. Med*, 197: 789-795

¹⁴⁹ **Welsch AJ, Rossi R, Comanducci M y col.** 2004. Protective activity of monoclonal antibodies to genome derived neisserial antigen 1870, a *Neisseria meningitidis* candidate vaccine. *J Immunol*, 172: 5606-5615

meningococo, favoreciendo el desarrollo de anticuerpos funcionales y la consiguiente protección contra la enfermedad meningocócica.

En este sentido, estudios realizados en nuestro laboratorio¹⁵⁰ han puesto de manifiesto que *N. meningitidis* y *N. lactamica* comparten gran número de antígenos comunes a nivel de la superficie de la membrana. Algunos de estos antígenos, son capaces de estimular anticuerpos bactericidas frente al meningococo en modelos experimentales¹⁵¹, demostrando que, la colonización por *N. lactamica* podría ser uno de los mecanismos de adquisición y maduración de la inmunidad natural frente a *N. meningitidis*, y por tanto, varios investigadores han considerado la posibilidad de la vacunación masiva con algunas de sus estructuras externas. La ausencia de cápsula en *N. lactamica* indica que OMPs y LOS son los principales causantes de dicha actividad inmunológica¹⁵². Actualmente, está en desarrollo una vacuna inglesa basada en OMVs de dicha especie¹⁵³, la cual se encuentra en un estado muy avanzado de su desarrollo (comunicación personal).

Por el contrario hay que considerar que tal medida podría alterar el estado de portador de esta especie y en consecuencia el equilibrio ecológico que presenta y su papel como comensal en la mucosa, favoreciendo, posiblemente, la colonización de la misma por otros patógenos.

*** Otras bases vacunales**

Una de las proteínas hasta ahora más estudiadas ha sido la denominada proteína de superficie de *Neisseria* NspA. Aunque todavía se desconoce su función está muy conservada en cepas de *N. meningitidis*. La inmunización de distintos

¹⁵⁰ Troncoso G, Sánchez S, Moreda M y col. 2000. antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and comensal *Neisseria* species. *Immunol Med Microbiol*, 27: 103-109

¹⁵¹ Sánchez S, Troncoso G, Ferreirós CM y col. 2001. Evaluation of cross-reactive antigens as determinants of cross-bactericidal activity in pathogenic and comensal *Neisseria*. *Vaccine*, 19: 3390-3398

¹⁵² Sánchez S, Troncoso G, Criado MT y col. 2002. In vitro induction of memory-driven responses against *Neisseria meningitidis* by priming with *Neisseria lactamica*. *Vaccine*, 20: 2957-2963

¹⁵³ Gorringe A, Halliwell D, Matheson M y col. 2005. The development of a meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. *Vaccine*, 23: 2210-2213

animales de experimentación con una NspA recombinante generó anticuerpos bactericidas contra varias cepas del meningococo y protección pasiva contra la infección¹⁵⁴. Estudios posteriores indicaron que la proteína no era accesible en gran número de cepas de *N. meningitidis*¹⁵⁵, lo que redujo en gran medida sus expectativas para la inclusión en la vacuna universal.

En estudios más recientes se ha visto que el sistema de expresión de la proteína era fundamental para inducir protección¹⁵⁶, probablemente al preservarse determinados epítomos conformacionales. Estas premisas encaminaron a Dweyer y colaboradores¹⁵⁷ a obtener OMVs enriquecidas en NspA en *N. flavescens*, que indujeron protección contra la enfermedad en ratones. En la actualidad la proteína se considera un candidato vacunal muy prometedor.

Recientemente, Fletcher y colaboradores¹⁵⁸ han descrito las características y utilidad como base vacunal de una nueva lipoproteína denominada LP2086. Esta molécula está expuesta en la membrana externa de *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* y *N. lactamica*, con un nivel de expresión y exposición variable. En las cepas del meningococo la proteína es codificada por dos variantes alélicas. La inmunización de ratones con una combinación de dos variantes de la proteína LP2086-recombinante y de otras dos de PorA-recombinante estimuló la generación de anticuerpos bactericidas contra cepas homólogas y heterólogas.

¹⁵⁴ **Martín D, Cadieux N, Hamel J y col.** 1997. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. *J Exp Med*, 185:1173-1183

¹⁵⁵ **Moe GR, Tan S y Granoff DM.** 1999. Differences in surface expression of NspA among *Neisseria meningitidis* group B strains. *Infect Immun*, 67: 5664-5675

¹⁵⁶ **Moe GR, Zuno-Mitchell P, Hammond SN y col.** 2002. Sequential immunization with vesicles prepared from heterologous *Neisseria meningitidis* strains elicits broadly protective serum antibodies to group B strains. *Infect Immun*, 70: 6021-6031

¹⁵⁷ **Dweyer CA, Reddin K, Martin D y col.** 2004. Expression of heterologous antigens in commensal *Neisseria* spp.; preservation of conformational epitopes with vaccine potential. *Infect Immun*, 72: 6511-6518

¹⁵⁸ **Fletcher LD, Bernfield L, Barniak V y col.** 2004. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect Immun*, 47: 2088-2100

Los lipopolisacáridos meningococales o lipooligosacáridos también están considerados como un importante candidato vacunal. Su posible aportación está basada en diferentes características inmunogénicas. En el suero de pacientes de adultos y niños que padecieron la enfermedad meningocócica se detectaron anticuerpos contra estas moléculas, y algunos de ellos inducen bacteriolisis mediada por el complemento. Se ha observado también que participan en la inmunidad natural adquirida contra el meningococo durante la colonización de especies comensales¹⁵⁹. En estudios recientes¹⁶⁰ se señaló que varias partes internas de los LOS contienen residuos de glucosa y glicina unidos a fosfoetanolamida y hepII, estructuras que representan epítomos inmunodominantes que son estudiados como futuros candidatos vacunales. Aunque los LOS están sujetos a variación antigénica y de fase, estos datos parecen indicar que una vacuna basada en LOS bien conjugados o detoxificados puede ser efectiva contra la enfermedad.

Las características de los candidatos descritos parecen indicar en muchos casos que las partes más conservadas, aún siendo antigénicas, no están sujetas a presión inmunológica por falta de exposición al sistema inmune. Su escasa variabilidad las hace *a priori* atractivas para su estudio pero, su uso puede estar limitado por la exposición en la superficie de la célula. Estas limitaciones han llevado diferentes autores a sugerir que la base vacunal esté constituida de un conjunto de proteínas con diferentes variantes antigénicas. En la **Tabla 4** se resumen las características de diferentes candidatos vacunales no capsulares contra la meningitis meningocócica.

¹⁵⁹ **Braum JM, Beuth J, Blackbraun JM y col.** 2004. *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica* and *Moraxella catarrhalis* share cross-reactive carbohydrate antigens. *Vaccine*, 22: 898-908

¹⁶⁰ **Kahler CM, Datta A, Tzeng YL y col.** 2005. Inner core assembly and structure of lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis*: capacity of strain NMB to express all known immunotype epitopes. *Glycobiology*, 15: 409-419

Tabla 4.- Características de distintas estructuras subcapsulares de *N. meningitidis* para su inclusión en una vacuna anti-meningocócica

Estructura	Pm (kDa)	Función	Potencial vacunal
- Proteínas de Clase			
PorA	44-47	Porina catiónica	Componente mayoritario de la vacunas holandesa y noruega basadas en OMVs. Es Inmunogénica pero presenta heterogeneidad antigénica
PorB	37-42	Porina aniónica	Proteína inmunogénica pero muestra heterogeneidad antigénica y reducida exposición de algunos epítomos
RmpM	37-42	Estabilización de complejos de la membrana Anclaje de OMP al péptidoglicano	Puede inducir anticuerpos con capacidad de bloquear la acción bactericida
Opa	26-30	Adhesión, invasión	Variabilidad antigénica, pero los anticuerpos tienen potencial para bloquear la adhesión de la bacteria
Opc	25	Invasión, adhesión	Incluida en la vacuna noruega basada en OMVs, induce anticuerpos bactericidas tras la vacunación
- Proteínas de restricción de hierro			
TbpA	98	Unión a transferrina	Inmunogénica pero muestra heterogeneidad antigénica
TbpB	65-90	Unión a transferrina	Inmunogénica y con limitada heterogeneidad antigénica
Fet A	77	Receptor férrico enterobactina	Heterogeneidad antigénica
- Antígenos derivados del genoma			
GNA33		Metabólica, estructural y de virulencia	Induce respuesta inmune funcional. Posible actividad inducida por mimetismo con un epítomo de PorA
GNA 2132		Desconocida	Heterogeneidad antigénica pero muestra protección pasiva contra la enfermedad
App		Adhesión a células epiteliales	antigénica
NhhA		Adhesión a nivel neuronal	Antigénica y accesible. Genera altos títulos de anticuerpos bactericidas contra la cepa homóloga. Actividad no observada tras la inmunización intranasal
NadA		Invasión y patogénesis	Heterogeneidad antigénica pero Respuesta inmune eficaz
GNA 1870		Desconocida	Expresión variable, variabilidad antigénica
- OMVs de <i>N. lactamica</i>			
			Presencia de estructuras comunes (OMPs y LOS) con <i>N. meningitidis</i> , inmunogénicas y con respuesta funcional
- Otras estructuras			
NspA	18-22	Desconocida	Inmunogénica e induce protección en animales
LP 2086		Desconocida	Conservada en la especie, variabilidad antigénica limitada y actividad funcional
LOS		Mimetismo antigénico, reduce la deposición de C3 y C9 e inhibe la vía alternativa del complemento	Induce respuesta inmune tras la vacunación. Los LOS detoxificados están bajo consideración como antígenos vacunales

3. IMPORTANCIA DE LA PRESENTACIÓN DE LOS ANTÍGENOS EN EL DISEÑO DE UNA VACUNA EFECTIVA

3.1 Exposición de antígenos: Papel de las estructuras externas

La exposición de los epítomos situados en la superficie de los patógenos es de una importancia crucial para que se unan los anticuerpos específicos y así iniciar la activación del complemento por la vía clásica. Uno de los mecanismos de defensa con los que cuenta el agente externo es reducir cuantitativamente el grado de exposición de estos epítomos, así como los lugares de unión de otras moléculas del complemento. Varios autores han demostrado que esta función es realizada por varias estructuras de la envuelta como la cápsula, los lipopolisacáridos o incluso determinadas proteínas.

La cápsula posee un importante papel protector contra varias moléculas del sistema inmune^{161,162} y reduce la accesibilidad de proteínas de la membrana externa¹⁶³. No obstante, no existen muchos trabajos en los que se le asigne de forma inequívoca este papel; probablemente debido a la capacidad de algunas especies de secretar o no esta estructura, las diferencias de expresión y composición dentro de la misma especie o también posiblemente por la actuación conjunta de otras moléculas. En la especie que nos ocupa, las cápsulas de los meningococos invasivos contienen ácidos siálicos, excepto las del serogrupo A. Como ocurre en otras moléculas de la membrana externa, la sialización facilita el enmascaramiento de epítomos, pudiendo tener el mismo efecto en la cápsula, aunque este mecanismo no se ha estudiado todavía con detenimiento.

¹⁶¹ **Ram S, Mackinnon FG, Gulati S y col.** 1999. The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol*, 36: 915-928

¹⁶² **Pangburn MK.** 1997. Alternative pathway: activation and regulation. En *The complement system*. Rother K, Till GO Hansch GM (eds), p 23, Springer, Berlín

¹⁶³ **Moe GR, Tan S y Granoff DM.** 1999. Differences in surface expression of NspA among *Neisseria meningitidis* group B strains. *Infect Immun*, 67: 5664-5675

Las moléculas de LPS también condicionan directamente la exposición de varias proteínas de la membrana externa^{164,165}. En algunas bacterias^{166,167} la longitud de las cadenas de sus carbohidratos juega una labor importante en el enmascaramiento de lugares antigénicos, efecto dependiente de la cantidad y estructura de las cadenas polisacáridicas. Otros microorganismos como *N. meningitidis* carecen de LPS, y consecuentemente de largas cadenas como la O-específica, conteniendo LOS. Pese a que las cadenas de carbohidratos de estas últimas son más cortas que los LPS, también se ha observado una inhibición estérica de estas estructuras sobre diversos antígenos proteicos y lipídicos de esta especie^{168,169,170}. La enorme diversidad de estas moléculas y la variabilidad de fase a la que están sometidas, provocan que sus relaciones topológicas con las estructuras antigénicas varíen en la misma especie y en determinadas etapas del crecimiento del microorganismo.

Las proteínas de la superficie celular bacteriana son más variables en su secuencia que el resto de proteínas, mecanismo de evasión al sistema inmune que ha sido exhaustivamente analizado en la mayor parte de patógenos bacterianos humanos. Sin embargo, el fenómeno de enmascaramiento de antígenos por

¹⁶⁴ **Bowen RA, Cloeckert A, Zygmunt M y col.** 1995. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun*, 63: 3945-3952

¹⁶⁵ **Vretou E, Psarrou E y Spiliopoulou D.** 1992. The role of lipopolysaccharide in the exposure of protective antigenic sites on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J. Gen Microbiol*, 138: 1221-1227

¹⁶⁶ **Grossman N., Svenson SB, Leive L y col.** 1990. *Salmonella* O antigen-specific oligosaccharide-octyl conjugates activate complement via the alternative pathway at different rates depending on the structure of the O antigen. *Mol Immunol*, 27: 859-865

¹⁶⁷ **Bryrd DW, Roop RM, Veit PH y col.** 1991. Serum sensitivity and lipopolysaccharide characteristics in *Bordetella bronchiseptica*, *B. pertussis* and *B. parapertussis*. *J Med Microbiol*, 34: 159-165

¹⁶⁸ **Michaelsen TE, Aase A, Kolberg J y col.** 2001. PorB3 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine*, 19: 1526-33

¹⁶⁹ **Poolman JT, Wientjes FB, Hopman CTP y col.** 1985. Influence of the length of lipopolysaccharide molecules on surface exposure of class 1 and 2 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* 2996 (B:2b:P1.2). En: *The Pathogenic Neisseria*. Schoolnik GK, Brooks GF, Falkow S y col (eds). p 562. DC: American Society for Microbiology, Washington

¹⁷⁰ **Plested JS, Makepeace K, Jennings MP y col.** 1999. Conservation and accessibility of an inner core lipopolysaccharide epitope of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 67: 5417-5426

proteínas contiguas no ha sido descrito con tanta intensidad, probablemente por la complejidad del estudio de las relaciones topológicas entre OMPs. Aún así este fenómeno también se ha observado en algunos microorganismos de especial interés para el desarrollo de vacunas^{171,172}. En otras ocasiones, la propia estructura tridimensional de las proteínas es la que establece este efecto sobre sus epítomos más conservados, proceso que podría explicar las diferencias de exposición de algunas proteínas de *N. meningitidis*^{173,174}.

3.1.a La citometría de flujo como técnica analítica en microbiología

Durante bastantes años la FCM ha sido aplicada exclusivamente al estudio de células de mamíferos. Su uso en la microbiología no fue hasta 1977, y a partir de este momento su versatilidad ha motivado su uso con diferentes finalidades. La técnica se basa en separar individualmente las partículas de una suspensión biológica y analizar la fluorescencia emitida y la refracción de la luz de cada una de ellas. A partir de las características propias de los microorganismos y su medio natural, los investigadores han empleado diversas estrategias para poder detectarlos y analizarlos empleando la FCM.

Desde sus inicios la técnica demostró su aplicabilidad para diferenciar bacterias, incluso en varios cultivos mixtos de cepas, mediante los ángulos de luz refractada y autofluorescencia. La difracción de la luz está en función del tamaño celular relativo, la morfología y la topografía de la superficie externa¹⁷⁵, lo cual facilita la diferenciación de microorganismos basándose en estas características. Se

¹⁷¹ **Bunikis J y Barbour AG.** 1999. Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* is hindered by Osp lipoproteins. *Infect Immun*, 67: 2874-2883

¹⁷² **Ziegelbauer K y Overath P.** 1993. Organization of two invariant surface glycoproteins in the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*, 61: 4540-4545

¹⁷³ **Van der Ley P, Heckels JE, Virji M y col.** 1991. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria*. *Infect Immun*, 59: 2963-2971

¹⁷⁴ **Wedge E, Dalseg R, Caugant DA y col.** 1993. Expression of an inaccessible P1.7 subtype epitope on meningococcal class 1 proteins. *J Med Microbiol*, 38: 23-28

¹⁷⁵ **McCoy JP.** 2002. Basic principles of flow cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am*, 16: 229-243

ha observado que algunas moléculas presentes en las bacterias son capaces de emitir fluorescencia cuando son excitadas a una determinada longitud de onda, diferenciándolos respecto a otros que no poseen esta propiedad.

El empleo de tinciones fluorescentes, tanto simples como en cócteles, proporciona un poder de resolución mayor que las medidas de refracción de luz. Mientras que las tinciones para una molécula simple (ADN o proteínas) han sido efectivas en técnicas como la microscopia para diferenciar microorganismos, con un nivel de especificidad razonable, la capacidad para discriminar subpoblaciones bacterianas se ha mejorado considerablemente con la FCM. El uso de estas sustancias ha sido muy extenso y ha facilitado, por ejemplo, los estudios de viabilidad y vitalidad celular respecto a los métodos tradicionales de recuento en placa. En la actualidad se dispone de varias tinciones que diferencian entre células muertas, células vivas y entre estados intermedios basándose en la integridad de su membrana o su estado energético¹⁷⁶. La aplicación de las tinciones celulares en FCM impulsó su uso hacia la mejora de otras medidas como la determinación de varios parámetros del crecimiento de microorganismos como pueden ser el contenido lipídico y en ácidos nucleicos, la distribución proteica, la actividad respiratoria o el metabolismo; estos factores son de una importancia relevante para entender la dinámica biogeoquímica en hábitats naturales o para valorar el proceso de fermentación en levaduras. Su aplicación también se extendió al análisis de la resistencia o susceptibilidad de los patógenos a determinados antibióticos, mejorándolo considerablemente respecto a las técnicas tradicionales. En este campo la FCM determina esta medida en horas y no en días como los métodos tradicionales, llegando a detectar subpoblaciones de diferente resistencia y facilitando la elaboración de una curva respuesta más precisa. Otras aplicaciones

¹⁷⁶ **Jepras RI, Carter J, Pearson SC y col.** 1995. Development of a robust flow cytometric assay for determining number of viable bacteria. *Appl Env Microbiol*, 61: 2696-2701

más extensas han consistido en medir la interacción entre bacterias fagogénicas y macrófagos.

El grado de variación de la secuencia del ARN-ribosómico resulta de gran interés en la caracterización molecular de bacterias con oligonucleótidos¹⁷⁷. Los ensayos que utilizan ARNr tienen la ventaja de que estas macromoléculas son lo suficiente pequeñas como para penetrar en las células fijadas, hibridando específicamente con el ARNr intracelular. El uso de ARN-ribosómico marcado y la FCM facilita dicha caracterización en pocas horas, aunque, el análisis de los microorganismos en su entorno natural no es muy conveniente por su lento metabolismo y la baja cantidad de estas macromoléculas.

Igual que ha ocurrido en otros campos de la biología molecular, los anticuerpos han extendido su utilidad y su poder de discriminación a la FCM. Pueden ser marcados con diferentes fluorocromos permitiendo la identificación de microorganismos, clasificaciones serológicas o el análisis de la expresión de antígenos¹⁷⁸, sin necesidad de que los microorganismos sean cultivables. Este proceso es más refinado al realizar combinaciones de diferentes anticuerpos marcados con distintos fluorocromos y con una variedad de tinciones. La reactividad cruzada de los anticuerpos con otras especies y el uso de anticuerpos secundarios puede llevar a falsos positivos debido a unión inespecífica, uniones que pueden ser eliminadas en parte por los agentes de bloqueo, y contrariamente a los métodos inmunoenzimáticos, la capacidad multiparamétrica de la citometría permite una mejor discriminación entre la unión específica e inespecífica. Algunos investigadores han empleado partículas de látex con anticuerpos unidos, que al

¹⁷⁷ **Hugenholtz P y Pace NR.** 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol*, 14: 190-197

¹⁷⁸ **Dietrich MA, Truax RE, French DD y col.** 1991. Measurement of antibody binding to intact bacteria using flow cytometric techniques. *J Microbiol Methods*, 13: 281-291

reaccionar con el antígeno provocan modificaciones en los ángulos de refracción indicando la unión del antígeno-anticuerpo.

3.1.b Análisis y detección de antígenos de superficie por FCM: ventajas e inconvenientes de su uso

Las técnicas mas empleadas por los investigadores para analizar la exposición de los epítomos en distintos microorganismos han sido: la microscopia electrónica, dot blotting, ELISA y más recientemente la FCM. Complementariamente, han ido acompañadas del western blotting, para analizar el grado de expresión antigénica, la unión en condiciones desnaturalizadas y la especificidad de los anticuerpos.

Mediante la FCM los anticuerpos marcados facilitan la enumeración de antígenos de superficie o la detección de tipos celulares en una población o mezcla de poblaciones. Esta herramienta demostró que se adecuaba a la determinación de la antigenicidad y accesibilidad de antígenos bacterianos por la cuantificación de anticuerpos unidos por unidad celular, relacionando esta medida al tamaño celular u otros parámetros asociados. Además, la técnica se diferencia de las anteriormente mencionadas en que permite el estudio de la variabilidad inter e intrapoblacional en la expresión de los antígenos ya sea en las poblaciones o en subpoblaciones de interés. Este tipo de análisis en diferentes preparaciones de bacterias supone un importante paso para la preparación de vacunas. En este campo la FCM ha servido para analizar antígenos de superficie en diferentes microorganismos tanto en *N. meningitidis*¹⁷⁹ como de otros microorganismos como *Streptococcus*¹⁸⁰ entre otros.

La FCM también es utilizada para valorar la efectividad de otros procedimientos relacionados con la vacunación como la detección y medida de los

¹⁷⁹ Michaelsen TE, Aase A, Kolberg J y col. 2001. PorB3 outer membrane protein on *Neisseria meningitidis* is poorly accesible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine*, 19: 1526-1533

¹⁸⁰ Rioux S, Martín D, Ackermann HW, y col. 2001. Localization of surface immunogenic protein on group B streptococcus. *Infect Immun*, 69: 5162-5165

niveles de anticuerpos en sangre tras la inmunización. Entre las ventajas más señaladas que aporta la FCM a la microbiología destacan^{181,182}:

i. *Estudio de las partículas biológicas de forma individual.*

La mayoría de las técnicas moleculares miden exclusivamente un determinado parámetro de una población sin conocer las diferencias dentro la misma. La FCM separa las partículas de la muestra y las analiza una a una, señalando si existe heterogeneidad intrapoblacional.

ii. *Adquisición y análisis de datos multiparamétricos.*

El uso conjunto de combinaciones de tinciones, ligandos específicos y ángulos de refracción permite analizar varios parámetros de una muestra, definiendo subpoblaciones o tipos celulares. Su análisis posterior facilita la cuantificación estadística acerca de las características individuales o conjuntas (porcentajes respecto al total, distribución, variabilidad, promedios...).

iii. *Adquisición de datos en tiempo real.*

La exposición de resultados en tiempo real y el hecho de que la citometría de flujo mida solamente un bajo porcentaje de la muestra, facilita al usuario optimizar y valorar varias condiciones durante la medida. Por otra parte, es posible realizar mediciones a diferentes intervalos de tiempo, lo cual permite valorar temporalmente el efecto de determinados agentes sobre la población.

iv. *Rapidez en el análisis.*

La cantidad de partículas biológicas que se pueden leer por segundo está en función de las características del equipo, así como de la velocidad del flujo aplicada a la muestra. La necesidad de evitar la coincidencia de dos eventos en el punto de interrogación y los posibles daños mecánicos producidos entre las células

¹⁸¹ **Winson MK y Davey MH** 2000. Flow cytometric analysis of microorganisms. *Methods*, 21:231-240

¹⁸² **Davey HM y Dell DB** 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev*, 60: 641-696

ha llevado a optimizar la velocidad de lectura entre 300-1000 eventos/seg. Esta velocidad de análisis permite que en 10-100 segundos se adquiriera información sobre una cantidad significativa de células (1×10^4 - 10^5 células) que represente la variabilidad poblacional.

v. *Separación de células marcadas (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS).*

Determinados citómetros tienen la capacidad de transferir una parte específica de la población a una determinada localización para un posterior análisis físico, químico, biológico o molecular. La purificación de esporas, la determinación de células cultivables, el aislamiento de clones o subpoblaciones celulares o la selección de bacterias alteradas genéticamente son algunas de sus aplicaciones más frecuentes en la microbiología.

A pesar de las ventajas que presenta esta metodología en la microbiología, se deben subrayar algunos de los inconvenientes que conlleva su uso, las cuales se detallan a continuación:

i. *Coincidencias.*

Cuando el flujo de partículas es demasiado bajo y la concentración de la muestra alta se produce una coincidencia de dos o más partículas en el punto de interrogación. Como resultado, se asocia a una misma célula una característica resultante del sumatorio de las partículas que han confluido.

ii. *No discriminación de agregados.*

La agrupación de bacterias formando agregados celulares es una característica de determinadas especies o cepas, como puede ser el caso de *N. meningitidis*. La agrupación entre las células se establece por uniones hidrofóbicas difíciles de romper por procesos físicos o químicos. El flujo laminar del citómetro no puede disgregarlos, y las características de un agregado se asocian entonces a una célula.

En algunas ocasiones los agregados pueden diferenciarse de las células simples mediante los ángulos de refracción de luz, lo cual se convierte en una ventaja respecto a otras técnicas, permitiendo estudiar sus características de forma independiente.

iii. *Tamaño de las partículas.*

La entrada de las partículas al punto de interrogación está limitada por el tamaño de las mismas. Dicha limitación, dependiente de las características técnicas del citómetro, puede impedir el estudio de bacterias filamentosas en su hábitat natural, microorganismos que crecen formando biopelículas o grandes agrupaciones.

iv. *Solapamiento de fluorescencia.*

Un fluorocromo excitado puede emitir en un amplio rango de longitudes de onda. La mayoría de los citómetros de flujo recogen la luz emitida por un fluorocromo en una longitud de onda determinada (canal). En algunos casos, cuando se emplean varios fluorocromos, la fluorescencia recogida en un canal se corresponde a dos fluorocromos por un fenómeno de solapamiento del espectro de emisión, atribuyendo a un evento una característica que no es propia (falsos positivos). En la actualidad existen citómetros que evitan el solapamiento de fluorocromos y programas disponibles para eliminar este efecto durante el análisis de los datos.

v. *Elevado coste.*

El alto coste de los citómetros, del material que precisan y del mantenimiento o reparación, sobre todo por la escasez de empresas especializadas, hacen que estos instrumentos de medida no estén al alcance de todos los laboratorios.

3.2 La conformación del antígeno: Implicación en la inducción de la protección

La adecuada conformación de los epítomos es un aspecto fundamental para generar una respuesta inmune funcional. Varios investigadores han observado una clara relación entre la conformación de antígenos en las vacunas y la generación de anticuerpos bactericidas o activadores de la opsonofagocitosis. La alteración o desnaturalización de las proteínas provoca un cambio en su conformación respecto a la nativa que influye enormemente en su antigenicidad; esto ha sugerido que, en gran parte de los casos, los epítomos lineales sean menos importantes para la protección que los epítomos conformacionales^{183,184}. Esta escasa protección puede ser causada por que los epítomos lineales, formados por pequeñas secuencias, solamente permiten la unión de una baja cantidad de anticuerpos en la misma zona. En otras ocasiones estos anticuerpos se dirigen hacia regiones variables entre cepas, o que en condiciones nativas se ubican en partes que están enmascaradas por otras estructuras u ocultas por la propia molécula¹⁸⁵, impidiendo la activación de la respuesta. Así, estas observaciones parecen indicar que los anticuerpos producidos contra antígenos naturales pueden resultar más adecuados para conferir protección por varias razones. Su ubicación puede facilitar la deposición de los componentes del complemento o la opsonofagocitosis y, su conformación, igual que la de otras moléculas, puede estimular isotipos de IgG (IgG1 y IgG3) activadores del complemento. Sin embargo, la principal limitación con la que se encuentran los investigadores es la de conservar esta configuración antes y durante la inmunización. Los anticuerpos generados por el sistema inmune pueden no

¹⁸³ **Ulbrandt ND, Cassat DR, Patel NK y col.** 2001. Conformational nature of the *Borrelia burgdorferi* decorin binding protein A epitopes that elicit protective antibodies. *Infect Immun*, 69: 4799-4807

¹⁸⁴ **Sánchez S, Troncoso G, Ferreirós CM y col.** 2001. Evaluation of cross-reactive antigens as determinants of cross-bactericidal activity in pathogenic and commensal *Neisseria*. *Vaccine*, 19: 3390-3398

¹⁸⁵ **Rosenqvist NE, Musacchio A, Aae A y col.** 1999. Functional activities and epitope specificity of human and murine antibodies against the class 4 outer membrane protein (Rmp) of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 67: 1267-1276

reconocer pequeñas diferencias en estos epítomos sobre la superficie de la bacteria, no unirse y por lo tanto no generar la respuesta deseada. El principal desafío al que se enfrentan es mantener dicha condición utilizando diferentes estructuras o agentes que faciliten su solubilidad y conformación natural.

La purificación del antígeno a partir del cultivo del microorganismo es un proceso tedioso y requiere mucho tiempo. El uso de otros sistemas vivos como *E. coli*, permite obtener la proteína recombinante en cuerpos de inclusión en grandes cantidades, reduciendo esta limitación. Sin embargo la efectividad del antígeno puede verse reducida, el compartimento subcelular donde se renaturaliza o las condiciones de purificación influyen en su antigenicidad, pudiendo alterar los epítomos protectivos más importantes. Las condiciones del citosol y la oxidación parcial de las proteínas durante su purificación facilitan la formación de posibles puentes disulfuros, lo que explicaría en algunos casos su reducida eficacia¹⁸⁶, aunque otras proteínas recombinantes han presentado efectividad como antígenos después de su purificación¹⁸⁷. En otros casos los vectores utilizados introducen pequeños péptidos para facilitar su expresión y purificación. La presencia de estas secuencias en la zona N-terminal puede limitar su potencial, resultando ser zonas inmunogénicas o induciendo respuestas inmunes no características o no deseadas por alterar su conformación. Recientemente, Humphries y colaboradores¹⁸⁸ han demostrado que la PorA recombinante (detallada en apdo. 2.2.b) induce una respuesta protectora diferente según el vector utilizado.

¹⁸⁶ **Exner MM, Wu S, Blanco DR y col.** 2000. Protection elicited by native outer membrane protein Oms66 (P66) against host adapted *Borrelia burgdorferi*: conformational nature of bactericidal epitopes. *Infect Immun*, 68: 2647-2654

¹⁸⁷ **Fikrig E, Feng W, Barthold SW y col.** 2000. Arthropod and host specific *Borrelia burgdorferi* bbb32 expression and the inhibition of spirochete transmission. *J Immunol*, 164: 5344-5351

¹⁸⁸ **Humphries HE, Williams JN, Christodoulides M y col.** 2004. Recombinant meningococcal PorA protein, expressed using a vector system with potential for human vaccination induces a bactericidal immune response. *Vaccine*, 22: 1564-1569

Tras la purificación, la proteína debe solubilizarse en sustancias que aseguren una conformación terciaria similar a la nativa como han demostrado los liposomas o determinados detergentes, entre otros. El tratamiento con diversos agentes como SDS o deoxycolato ayuda a que las OMPs adopten determinadas estructuras terciarias que mejoran favorablemente la exposición de las regiones antigénicas inmunodominantes, induciendo anticuerpos bactericidas o activadores de la opsonofagocitosis¹⁸⁹. Esta práctica supone un bajo rendimiento de la proteína renaturalizada y el inconveniente inherente de su producción a gran escala. Los liposomas utilizados como vehículo de antígenos tiene algunas propiedades ventajosas como la carencia de toxicidad, el ser biodegradables y no inmunogénicos, e inducir una respuesta humoral y celular específicas contra las proteínas embebidas¹⁹⁰. Su similitud con las membranas biológicas proporciona una forma admisible para la preparación de formulaciones que contengan las proteínas en su forma natural. Su uso con proteínas recombinantes de *N. meningitidis* coadministrado con distintos adyuvantes estimuló anticuerpos bactericidas¹⁹¹, no observados cuando se inmunizó solamente con las proteínas. Trabajos previos con las proteínas recombinantes de *N. meningitidis* Opc y PorB^{192,193} (detallado en apdo. 2.2.b), demostraron que dichos antígenos inducen niveles más altos de anticuerpos funcionales cuando están solubilizados en liposomas que en detergentes, quizás debido a un efecto adyuvante natural.

¹⁸⁹ **Niebla O, Alvarez A, Martín A y col.** 2001. Immunogenicity of recombinant class 1 protein from *Neisseria meningitidis* refolded into phospholipid vesicles and detergent. *Vaccine*, 19: 3568-3574

¹⁹⁰ **Gregoriadis G.** 1995. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol*, 13: 527-537

¹⁹¹ **Jonge MI, Hamstra HJ, Jiskoot W y col.** 2004. Intranasal immunisation of mice with liposomes containing recombinant meningococcal OpaB and OpaJ proteins. *Vaccine*, 22: 4021-4028

¹⁹² **Wright JC, Williams JN, Christodoulide M y col.** 2002. Immunisation with recombinant Opc outer membrane protein induces a bactericidal immune response against *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 70:4028-4034

¹⁹³ **Jolley K, Appleby L, Wright JC y col.** 2001. Immunisation with recombinant Opc outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of sequence variation and levels of expression on the bactericidal immune response against meningococci. *Infect Immun*, 69: 3809-3916

Las OMVs son estructuras derivadas de la membrana externa que también pueden conservar la naturaleza de los inmunógenos de la superficie externa. La importancia de estas estructuras para mantener la conformación natural de los epítomos protectores fue puesta de manifiesto con la proteína de *N. meningitidis* NspA, que logró alcanzar anticuerpos protectores en OMVs de *Neisseria* comensales, no así cuando se utilizó únicamente la proteína recombinante producida en *E. coli*¹⁹⁴. La presencia de cápsula o LPS, si bien puede restringir la accesibilidad de los epítomos, podría contribuir al mantenimiento de la naturaleza de los mismos u otros antígenos. Los lípidos actúan como activadores de la respuesta inmune o como adyuvante integral¹⁹⁵. La mayor desventaja de las OMVs es su composición heterogénea, con moléculas no deseadas como LPS tóxicos, proteínas inmunodominantes o bloqueantes de anticuerpos funcionales. La capacidad de obtener mutantes que secretan OMVs sin componentes no deseados o con un exceso de determinadas proteínas ha mejorado su eficacia; sin embargo, hay que tener en cuenta que el isotipo estimulado de IgG y la magnitud y cinética de la respuesta a los antígenos meningococales es dependiente, entre otros factores, de la naturaleza de las OMVs¹⁹⁶. En cualquier caso la inmunización con múltiples dosis puede contribuir a alcanzar una respuesta contra epítomos relativamente poco inmunogénicos de *Neisseria meningitidis*, pero capaces de alcanzar protección. La inmunización secuencial con vesículas obtenidas en especies heterólogas promete

¹⁹⁴ O'Dwyer CA, Reddin K, Martin D y col. 2004. Expresión of heterologous antigens in comensal *Neisseria* spp.: preservation of conformational epitopes with vaccine potential. *Infect Immun*, 72: 6511-6518

¹⁹⁵ Steeghs L, Kuipers B, Hamstra HJ y col. 1999. Immunogenicity of outer membrane proteins in a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response. *Infect Immun*, 67: 4988-4993

¹⁹⁶ Guthrie T, Wong SY, Liang B y col. 2004. Local and systemic antibody responses in mice immunized intranasally with native and detergent-extracted outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 72: 2528-2537

un acercamiento para alcanzar una inmunidad eficaz contra la meningitis meningocócica¹⁹⁷.

Otra línea de investigación sugiere la posibilidad de utilizar la tecnología de fagos para la presentación de epítomos, consiguiendo una adecuada conformación antigénica para activar una respuesta funcional. El beneficio de utilizar fagos filamentosos está en la capacidad de obtener anticuerpos dirigidos contra epítomos menos inmunogénicos. Esta metodología es mucho mas simple que la ruta convencional de síntesis de péptidos y acoplamiento a proteínas transportadoras y, ha sido capaz de inducir anticuerpos bactericidas contra una región variable de la proteína PorA (apdo. 2.2.b) de *N. meningitidis*¹⁹⁸.

Si bien la generación de una respuesta adecuada no depende exclusivamente de la conformación del antígeno sino que intervienen otros parámetros (características de los anticuerpos generados, la especie animal, adyuvantes, proceso de inmunización)^{199,200,201}, dicha conformación juega un papel primordial en la misma.

¹⁹⁷ **Moe GR, Zuno-Mitchell P, Samantha NH y col.** 2002. Sequential immunization with vesicles prepared from heterologous *Neisseria meningitidis* strains elicits broadly protective serum antibodies to group B strains. *Infect Immun*, 70: 6021-6031

¹⁹⁸ **Menéndez T, Haz I, Delgado M y col.** 2001. Immunisation with phage-displayed variable region 2 from meningococcal PorA outer membrane protein induces bactericidal antibodies against *Neisseria meningitidis*. *Immunol Lett*, 39: 143-148

¹⁹⁹ **Wang J, Jarvis GA, Achtman M y col.** 2000. Functional activities and immunoglobulin variable regions of human and murine monoclonal antibodies specific for the P1.7 Por A protein loop of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immunol*, 68: 1871-1878

²⁰⁰ **Christodoulides M, Brooks JL, Rattue E. y col.** 1998. Immunization with recombinant class 1 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of liposomes and adjuvants on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci. *Microbiology*, 144: 3027-3037

²⁰¹ **Moe GR, Zuno-Mitchell P, Samantha NH y col.** 2002. Sequential immunization with vesicles prepared from heterologous *Neisseria meningitidis* strains elicits broadly protective serum antibodies to group B strains. *Infect Immun*, 70: 6021-6031

En resumen, las diferentes investigaciones realizadas con distintos candidatos vacunales contra la enfermedad meningocócica indican que son varios los factores que influyen y que pueden modificar el potencial de un candidato. En este aspecto, han sido varios los antígenos, considerados *a priori* como buenos candidatos, que posteriormente fueron excluidos por no cumplir ciertas características, probablemente, no consideradas inicialmente como fundamentales. La vacunología reversa así como otras tecnologías, comentadas en el apdo. 2.1, complementariamente con los avances de la biotecnología o la inmunología computacional, podrían reducir el tiempo de búsqueda y análisis de diferentes moléculas. No obstante, la naturaleza del patógeno o la ausencia de un patrón animal adecuado exige estudios más amplios y exhaustivos que analicen en mayor profundidad tanto diferentes características moleculares, inmunogénicas o de expresión, como de la disposición del mismo en la envuelta celular o la naturaleza de sus epítomos bactericidas.

OBJETIVOS

El principal problema en la prevención de la meningitis meningocócica sigue siendo el desarrollo de una vacuna eficaz contra el serogrupo B. Debido a la naturaleza de su polisacárido, el éxito de las vacunas conjugadas no ha podido extenderse a la prevención de la enfermedad causada por el meningococo B, por lo que en la actualidad las investigaciones se centran en el estudio de otras moléculas de la superficie celular como las proteínas de membrana externa. Sin embargo, las exigentes características que debe cumplir un antígeno ideal son requerimientos difíciles de cubrir por un único antígeno. De hecho, uno de los principales problemas ha sido la elevada variabilidad antigénica de las proteínas estudiadas hasta el momento (Por A, proteínas de Clase 2/3, Opc, Tbps, Fbp, NspA,...) que, aunque en muchos casos son altamente inmunogénicas y abundantes en la envuelta celular, requieren el desarrollo de una vacuna multivalente, implicando un elevado coste de producción y una protección limitada a un reducido número de serotipos.

El estudio mediante diferentes técnicas electroforéticas de antígenos comunes entre *Neisseria meningitidis* y especies comensales como *Neisseria lactamica* que se ha llevado a cabo durante los últimos años en nuestro laboratorio, nos ha permitido detectar la presencia en las vesículas de membrana externa de una proteína de 47 kDa altamente inmunogénica y expresada de manera generalizada por todas las cepas de *Neisseria* estudiadas. La presencia de una proteína de tamaño similar en complejos purificados, como el de las Tbps o aquellos en los que las porinas se encuentran asociadas, parecía indicarnos que podría tratarse de una molécula con un importante papel en el metabolismo de adquisición de hierro o en la estructura de la envuelta celular. Además, se han detectado anticuerpos contra esta proteína en sueros de pacientes que padecieron la enfermedad meningocócica. Todos estos datos nos han sugerido su posible implicación en el metabolismo bacteriano y su probable relevancia en la virulencia del patógeno y por lo

tanto, justifican un estudio preliminar del potencial de este antígeno como candidato para el desarrollo de una vacuna universal contra la meningitis meningocócica. Por ello, en la presente Tesis Doctoral nos planteamos identificar este antígeno y estudiar sus características moleculares, genéticas y antigénicas en un determinado número de cepas incluyendo (debido a las posibles ventajas que podría implicar el utilizar una especie comensal en la producción y desarrollo de una vacuna) especies no patógenas como *Neisseria lactamica*. En este sentido, los objetivos concretos son:

1. Identificar el antígeno de 47 kDa, examinar su contexto genético en los genomas disponibles en el “GenBank” y purificarlo en condiciones que permitan la obtención de sueros altamente específicos en animales de experimentación.
2. Estudiar su expresión en diferentes medios de cultivo, analizar su inmunogenicidad y el grado de conservación antigénica tanto en cepas de *Neisseria meningitidis* como en otras especies comensales del mismo género.
3. Realizar un estudio de la accesibilidad de los epitopos lineales de esta molécula en un amplio número de cepas.
4. Detectar el gen que la codifica, secuenciarlo en un número de cepas suficiente que permita analizar el grado de divergencia genética, predecir sus características moleculares, la posible disposición de los epitopos lineales y correlacionar su divergencia con la antigenicidad.
5. Realizar una valoración preliminar de su posible utilización en una vacuna anti-meningocócica mediante el estudio de la funcionalidad de los anticuerpos generados frente a diferentes cepas de *Neisseria meningitidis*. Correlacionar la funcionalidad de los anticuerpos con la exposición de epitopos y la variabilidad molecular del antígeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS

1.1 Origen y caracterización

En el presente trabajo se han incluido 27 cepas *N. meningitidis*, 4 cepas *N. lactamica*, 1 *N. subflava* y 1 *N. sicca* procedentes de la colección del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia (Universidad de Santiago de Compostela). Las cepas *N. meningitidis* GLD y B16B6 fueron amablemente cedidas por el Dr. SP Borriello del Queen Medical Center de Nothingan, (Reino Unido) y las cepas NMB y M7 por la Dra. MariaGrazia Pizza del Immunobiological Research Institute de Siena, (Italia) y por el Dr. D. Granoff del Children's Hospital Oakland Research Institute de Oakland, (Estados Unidos). Las restantes cepas fueron o bien, aisladas de la orofaringe de individuos sanos en un muestreo realizado en la ciudad de Santiago de Compostela, o bien, aisladas a partir de sangre y líquido cefalorraquídeo en el antiguo Hospital Xeral de Galicia de Santiago de Compostela y el Hospital Xeral de Vigo.

La posición taxonómica de todas las cepas se comprobó previamente mediante el análisis de sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Su caracterización serológica y MLST se realizó en el Laboratorio de Referencia de Meningococos del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda, Madrid (**Tabla 5**).

1.2 Condiciones de cultivo y conservación

1.2.a Preparación de los inóculos

Las cepas bacterianas se conservaron en viales Eppendorff con leche descremada estéril al 10% (p/v) a -20°C. Los inóculos de trabajo se prepararon a partir de las mismas tras la descongelación a temperatura ambiente y realizando un aislamiento en placas de medio sólido Choc Iso [medio GC agar base y

hemoglobina al 1% (p/v) con Biovitex al 1% (Biolife, Milán, Italia)]²⁰² (apéndice 1) e incubadas durante 24 horas a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

A partir de los aislamientos se recogió una colonia y se sembró, en forma de césped, en el mismo medio y las mismas condiciones de cultivo durante 8 horas, hasta alcanzar la fase exponencial del crecimiento.

1.2.b Cultivo en medio líquido Mueller-Hinton

El césped obtenido en las placas de medio Choc-Iso se resuspendió en medio Mueller-Hinton líquido (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) (MH) (apéndice 1) hasta conseguir una absorbancia a 540 nm entre 1,6-1,8.

Para realizar la extracción de OMVs (apdo. 2.1), se inocularon 10 ml de esta suspensión en matraces Erlenmeyer de 2 litros con 500 ml de medio MH conteniendo 0,1 mM de mesilato de deferoxamina, (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos; Desferal) (MH/Desferal) que se incubaron durante 12-14 horas a 37°C y con una agitación constante de 100 *rpm*.

En el resto de ensayos se inoculó 1 ml de suspensión bacteriana en matraces Erlenmeyer de 100 ml que contenían 20 ml de medio MH o MH/Desferal incubándose durante 5 o 6 horas a 37°C y en agitación constante a 100 *rpm*. En un segundo matraz de 250 ml con 50 ml de medio MH o MH/Desferal se realizó un subcultivo con 2 ml de suspensión bacteriana que se incubó en las mismas condiciones entre 10 y 12 horas.

²⁰² McGee ZA, Street CM, Chapell CI y col. 1979. Pili of *Neisseria meningitidis*, effect of media on maintenance of piliation, characteristics of pili and colonial morphology. *Infect Immun*, 24: 194-201

Tabla 5.- Características de las cepas incluidas en el presente estudio

Cepa	Serogrupo	Serotipo/ subtipo	ST	Complejo Clonal	Origen
<i>N. meningitidis</i>					
Nm30	C	2b:P1,2	ST-8	ST-8, A4	LCR
* B1686	B	2a:P1,2	ST-11	ST-11, ET-37	LCR
GLD	C	2a:P1,5	ST-214	ST-11, ET-37	LCR
M7	B	2b: P1,2,5	ST-4609	ST-8, A4	LCR
NmB	B	2b:P1,2,5	ST-4609	ST-8, A4	LCR
Nm9	C	2b:P1,2,5	ST-8	ST-8, A4	HMC, LCR
Nm16	B	4: P1,15	ST-33	ST-32, ET-5	LCR
Nm17	C	2b:P1,2,5	ST-8	ST-8, A4	HMC
Nm20	C	2b:P1,2,5	ST-8	ST-8, A4	LCR
Nm21	C	2b:P1,2,5	ST-8	ST-8, A4	HMC
Nm22	B	15:P1,16	ST-32	ST-32, ET-5	LCR
Nm39	B	2b:P1,2,5	ST-8	ST-8, A4	HMC
Nm40	B	2b:P1,2,5	ST-8	ST-8, A4	HMC
Nm59	C	NT:P1,3	ST-289	ST-22	LCR
Nm60	B	4:P1,15	ST-5367	ST-32, ET-5	HMC
Nm62	AA	2a:P1,5	ST-1287	ST-11, ET-37	LCR
Nm63	B	15:ND	ST-33	ST-32, ET-5	LCR
Nm68	B	15: ND	ST-5367	ST-32, ET-5	HMC

* Cepa de referencia de *N. meningitidis*
NA: No aplicable; ND: No determinado; AA: Autoagluinable; LCR, Líquido Cefalorraquídeo; HMC, Hemocultivo; OF, Orofaringe

2. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS COMPLETOS DE MEMBRANA EXTERNA

2.1 Extracción de vesículas de membrana externa y fijación

Las vesículas de membrana externa se obtuvieron mediante extracción con cloruro de litio y rotura con prensa de French, siguiendo el protocolo descrito previamente por Gómez y col²⁰³. La suspensión bacteriana, obtenida tras el crecimiento en medio MH/Desferal, se mantuvo durante 90 minutos a 56°C para provocar la muerte celular. A continuación, se recogieron las células por centrifugación a 10000 x g, durante 10 minutos, a 4°C y se resuspendieron en tampón acetato 0,1 M, pH 5,8, conteniendo cloruro de litio 0,2 M (apéndice 3) (cinco mililitros de tampón por gramo de sedimento). La rotura celular se realizó pasando la suspensión de células tres veces a través de la prensa de French® a una presión no inferior a 1,1 x 10⁸ kPa. Los restos celulares se retiraron mediante centrifugación de 10 000 x g durante 10 minutos a 4°C y, posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 200 000 x g durante 10 minutos a la misma temperatura, para obtener el extracto de membrana externa. Dicho sedimento se sometió a dos pulsos de ultrasonidos de 5 segundos.

La determinación proteica de las OMVs obtenidas se realizó por el método de BCA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BCA Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos)²⁰⁴.

Una parte de las OMVs se solubilizaron en agua destilada conteniendo formaldehído al 1% (v/v) a razón de 4 mg/ml de proteína. La suspensión se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente para favorecer los enlaces entre proteínas contiguas y posteriormente se centrifugó (200 000 x g durante 10 minutos a 4°C) para retirar el exceso de formaldehído.

²⁰³ Gómez JA, Criado MT y Ferreirós CM. 1997. Bactericidal activity of antibodies elicited against the *Neisseria meningitidis* 37-kDa ferric binding protein (FbpA) with different adjuvants. *FEMS immunol Med Microbiol*, 20: 79-86

²⁰⁴ Smith PK, Krohn RI, Hermason GT y col. 1985. Measurement of protein using bicinchononic acid. *Anal Biochem*, 150:76-85

Todas las suspensiones de OMVs se resuspendieron en agua bidestilada con azida sódica al 0,02% (v/v) y un inhibidor de proteasas (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) a 0,5 mM, manteniéndose a 4°C hasta su uso.

2.2 Fijación celular

Al medio de cultivo bacteriano se le adicionó formaldehído (Sigma Co, Estados Unidos) hasta alcanzar el 1% (v/v), y se mantuvo a temperatura ambiente, en agitación constante a 100 *rpm* durante 30 minutos. Posteriormente, las células bacterianas se separaron por centrifugación a 10 000 *x g* durante 10 minutos a 4°C. El extracto celular obtenido se lavó dos veces con tampón fosfato salino (cloruro sódico 0,19 M, fosfato sódico anhidro, 8,4 mM y fosfato sódico monobásico dihidratado 0,01 mM, pH 7,2; PBS) (apéndice 3), recogiénolas por centrifugación (10 000 *x g* 10 minutos).

Para optimizar las condiciones del inmunoensayo medido en FCM las células vivas bien, se fijaron con glutaraldehído al 0,25%, continuando el mismo proceso empleado en la fijación anterior, o bien, se inactivaron por calor manteniendo los matraces con medio líquido dos horas a 56°C y luego se fijaron con formaldehído.

2.3 Permeabilización con etanol

Las células bacterianas se permeabilizaron por la adicción de etanol al medio de cultivo hasta alcanzar el 70% (v/v), manteniéndose a temperatura ambiente durante 30 minutos y a 100 *rpm*. Posteriormente, las células se separaron del medio por centrifugación a 10 000 *x g* durante 10 minutos a 4°C. El extracto celular resultante se lavó dos veces con PBS por centrifugación en las mismas condiciones. Una parte de la suspensión celular se fijó adicionando formaldehído hasta alcanzar el 1% (v/v) y se incubó posteriormente como se describió con anterioridad.

Todas las suspensiones de las bacterias fijadas o no y/o permeabilizadas se ajustaron a una absorbancia de 1,1 a 540 nm (1×10^9 bacterias/ml) y se le añadió

PMSF a 0,5 mM y azida sódica al 0,02% (v/v) manteniéndolas a 4°C hasta su utilización. Las suspensiones que presentaron alteraciones en las características morfológicas de las células fueron desechadas.

3. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS Y DE ELECTROTRANSFERENCIA

3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las proteínas de la membrana externa de las distintas cepas evaluadas se separaron por electroforesis en geles verticales de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecil-sulfato sódico (SDS), empleando el sistema de tampón discontinuo diseñado por Laemli²⁰⁵. La electroforesis se realizó en una cubeta Mini-Protean 3 Cell (BioRad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos). En este caso todos los reactivos empleados fueron suministrados por BioRad Laboratories (Richmond, CA, Estados Unidos).

Para el desarrollo de la técnica se utilizaron geles concentradores y separadores. El gel concentrador estaba compuesto por poliacrilamida al 4% (p/v), con una relación de acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida de 36,5 (p/p) y SDS al 0,1% (p/v) en tampón Tris (hidroximetil) aminometano-HCl (Tris-HCl) 0,125 M, pH 6,8 (apéndice 3). El gel separador se utilizó bien al 12%, o bien, en gradiente lineal del 4-5 al 15% de poliacrilamida en tampón Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, con SDS al 0,1% (p/v) (apéndice 3). En ambos geles se empleó como sistema catalizador de la polimerización el persulfato amónico al 0,05% (p/v) y TEMED al 0,05% (v/v).

Los geles con gradiente lineal de poliacrilamida se elaboraron con el sistema de Gradient Former Model 395 (BioRad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos) en una Mini Protean[®] II Multi-Casting Chamber (BioRad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos).

²⁰⁵ **Laemli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685

Las muestras de electroforesis se prepararon diluyendo las alícuotas 1:1 en tampón de muestra [glicerol al 10% (v/v), SDS al 2% (p/v), 2-β-mercaptoetanol 0,7 M y azul de bromofenol al $1,25 \times 10^{-3}$ % (v/v)] (apéndice 3) y se calentaron a 95°C o a 37°C entre 10 o 30 minutos, según el ensayo correspondiente. Una vez realizada la electroforesis a 200 V, los geles se tiñeron con Coomassie® Brilliant Blue²⁰⁶, tinción de cobre²⁰⁷ o con tinción de plata²⁰⁸ (apéndice 2). En otras ocasiones, los geles se emplearon para realizar electrotransferencia a membranas de PVDF, como se describe en el siguiente apdo.

3.2 Electrotransferencia a membranas de PVDF

Las proteínas previamente sometidas a SDS-PAGE se electrotransferieron a membranas de PVDF (difluoro de polivinilideno) Immobilon™-P con un tamaño de poro de 0,45 μm (Millipore Co., Bedford, Estados Unidos) utilizando el sistema de electro-transferencia Mini Trans-Blot® (BioRad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos), tal y como sugiere el fabricante.

Previamente, se cortaron por cada gel una membrana de PVDF y dos piezas de papel Whatman n°3 del mismo tamaño que el gel separador. La membrana PVDF se equilibró tras sumergirla en metanol 15 segundos, en agua destilada 2 minutos y, finalmente, en tampón de transferencia [Tris 48 mM, glicina 39 mM, 20% (v/v) metanol, pH 9,2] (apéndice 3) durante 15 minutos. El papel Whatman, junto con las almohadillas de fibra suministradas, se equilibraron únicamente en tampón de transferencia durante 15 minutos. Estos componentes se depositaron en el soporte de electrotransferencia a modo de “sándwich”, con las almohadillas y el papel Whatman en la parte exterior, para mantener en su interior el contacto entre el gel y

²⁰⁶ **Bollag DM, Rozycki MD y Edelstein SJ.** 1996. Briefly noted: Dot Filter Binding Assay. Bollag DM, Rozycki MD y Edelstein SJ (eds) *En: Protein Methods* p 75, Wiley-Liss Inc, New York

²⁰⁷ **Lee C, Levin A y Branton D.** 1987. Cooper staining: a five minute protein stain for sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gels. *Anal Biochem*, 166: 508-510

²⁰⁸ **Heukeshoven DC y Dernick R.** 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrilamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6: 103-112

la membrana PVDF. La transferencia se realizó a 350 mA durante 1 hora empleando únicamente el tampón de transferencia.

3.3 Inmunoblotting

Con el objeto de identificar las proteínas antigénicas electrotransferidas, las membranas se lavaron con agua destilada y se bloquearon en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM, cloruro sódico 500 mM, pH 7,5) (apéndice 3) con 5% de Blotto (p/v) (Sigma Co) durante 90 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente, se lavaron tres veces con TBS conteniendo Tween 20 al 0,05% (v/v; Sigma Co.; TBS-Tween) (apéndice 3) y se incubaron toda la noche a 37°C y en agitación, con el suero primario diluido en TBS-Tween con Blotto al 1% (v/v) a la dilución de trabajo. El exceso de anticuerpo fue retirado con 3 lavados con TBS-Tween. A continuación se añadió una solución con suero anti-Ig totales de ratón o anti IgG de conejo y avidina conjugados a peroxidasa (Sigma Co.), ambos diluidos 1×10^{-3} en TBS-Tween con Blotto al 1% (p/v), e incubándose a 37°C y en agitación para detectar la unión del anticuerpo primario y los estándares de peso molecular unidos a la membrana. Transcurridos 90 minutos, las membranas se sumergieron en una solución sustrato-indicador compuesta de 4-cloro-naftol y H_2O_2 al 0,04% (v/v) en PBS (apéndice 3) que se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo al cabo de 20 minutos, tras añadirle agua destilada en exceso. En algunas ocasiones, tras revelar la membrana, esta se lavó con agua destilada y se volvió a incubar con otro suero primario continuando el proceso de incubación descrito (inmunoblotting secuencial). El análisis de los antígenos y estándares de peso molecular se llevó a cabo con el programa Quantity One® (BioRad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos).

La dilución de trabajo para los antisueros primarios fue determinada mediante diluciones seriadas, sometiendo una cantidad conocida de la muestra de interés a SDS-PAGE y western blotting. La mayor dilución del suero que detectó los

antígenos de interés en todas las muestras de distinto origen fue considerada como dilución de trabajo.

4. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO DE 47 kDa

4.1 Extracción mediante Tritón X-114

Con la finalidad de purificar el antígeno de 47 kDa, se realizó una primera separación/extracción de las proteínas de la membrana externa del microorganismo en base a su hidrofobicidad neta, tal y como sugirió Kittelberger R y col²⁰⁹ y que se describe brevemente a continuación. Las células de las cepas Nm30 y B16B6 se hicieron crecer en 50 ml de medio líquido MH (condiciones no restrictivas), MH/Desferal (condiciones de restricción de hierro) y en medio Choc Iso (condiciones de suficiencia de hierro). Las células crecidas en medio líquido se separaron del mismo por centrifugación (10 000 x g durante 10 minutos a 4°C) y, de igual modo que las crecidas en medio sólido, se resuspendieron a razón de 1 gramo de extracto celular por 10 ml de tampón TBS conteniendo azida sódica al 0,02% y Tritón X-114 al 4% (v/v). Esta mezcla se mantuvo en agitación constante (200 rpm) toda la noche a 4°C y luego se centrifugó a 10 000 x g durante 30 minutos a 4°C, para retirar las células enteras y restos celulares.

El sobrenadante se incubó durante 3 horas a 37°C, lo cual permitió la formación de dos fases: una fase rica en detergente (ubicada en la parte inferior del tubo) y una fase acuosa, aproximadamente el 87% del volumen total de la extracción. Ambas fases se separaron cuidadosamente, eliminando la zona de contacto para evitar contaminaciones.

²⁰⁹ Kittelberger R, Hansen MF, Hilbink F y col. 1995. Selective extraction of bacterial macromolecules by temperature-induced phase separation in Triton X-114 solution. *J Microbiol Meth*, 24:81-92

4.2 Separación y detección de las proteínas extraídas con Tritón X-114

Las proteínas presentes en las fases detergente y acuosa fueron separadas mediante SDS-PAGE, electrotransferidas y enfrentadas a los sueros inmunes de ratones y conejos en un inmunoblotting, tal y como se describe en el apdo. 3. Previamente al SDS-PAGE, 3,5 µl de cada fase, diluidas en tampón de muestra de electroforesis, se calentaron a 95°C durante 10 minutos. La electroforesis se realizó en geles del 12% los cuales fueron bien teñidos con tinción de cobre, o bien, transferidos a membranas de PVDF que se incubaron con el suero de ratón homólogo a la cepa empleada. El antígeno de 47 kDa fue detectado en las membranas y en los geles teñidos tomando como referencia un patrón de masas de bajo peso molecular (BioRad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos).

Con la finalidad de analizar la solubilidad del antígeno de 47 kDa en ambas fases, una vez obtenido un suero inmune específico contra este, se realizó SDS-PAGE y western blotting de ambas fases extraídas de los cultivos en restricción de hierro y Choc Iso, en las condiciones indicadas anteriormente.

4.3 Elución a partir de geles de poliacrilamida y concentración del eluato

El antígeno de 47 kDa presente en la fase detergente del cultivo en MH/Desferal de la cepa Nm30 fue seleccionado para ser purificada tras SDS-PAGE. La porción del gel donde se situó la proteína tras la electroforesis fue extraída del mismo, desteñida y eluida según la metodología descrita previamente²¹⁰.

El desteñido se realizó mediante tres inmersiones continuadas en tampón Tris-HCl 0,25 M, pH 9,0 con EDTA 0,25 M durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante y una inmersión en una solución de Tris 20 mM, glicina 150 mM y SDS al 0,01% (p/v) durante 10 minutos. La elución de las proteínas se

²¹⁰ **Hager DA y Burgess RR.** 1980. Elution of proteins from dodecyl sulfate-polyacrilamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate and renaturation of enzymatic activity: results with sigma suunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase and other enzymes. *Anal Biochem*, 109: 76-86

realizó sumergiendo el gel, previamente homogenizado, en Tris 20 mM, Glicina 0,19 mM y SDS al 0,01% (p/v) durante 12 horas a 25°C. Los restos del gel se retiraron con una centrifugación a 13 000 x g durante 5 minutos.

La concentración del antígeno de 47 kDa eluido, se realizó según el método de precipitación de proteínas con ácido tricloracético (TCA)²¹¹. Al tampón de elución se le añadió TCA hasta alcanzar el 10% (v/v), se agitó enérgicamente y se congeló a -20°C. Transcurridos 15 minutos, el vial se centrifugó a 13 000 x g durante 5 minutos y el precipitado se ajustó a pH 7,0 con hidróxido sódico 0,1 M. La eficacia de la purificación se evaluó sometiendo el eluato a una electroforesis y posterior detección mediante inmunoblotting con suero de ratón anti-OMVs de la cepa Nm30. El concentrado se mantuvo a 4°C hasta su uso.

4.4 Identificación del antígeno de 47 kDa: Análisis por MALDI-TOF y reconocimiento de su contexto genómico

Las OMPs de la fase detergente extraídas del cultivo en medio MH/Desferal de la cepa Nm30 fueron separadas mediante SDS-PAGE en geles comerciales del 4 al 15% de acrilamida Tris-HCl (BioRad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos), como se indicó en el apdo. 4.2. Las proteínas se tiñeron continuando el protocolo de tinción de plata (apéndice 2), y el antígeno de 47 kDa fue detectado por su peso molecular mediante el patrón estándar. La porción del gel que ocupaba el antígeno se cortó y se introdujo en un vial Eppendorff estéril manteniéndose a 4°C hasta su análisis posterior.

El antígeno de 47 kDa purificado fue sometido a digestión triptica y posteriormente se obtuvo su huella peptídica por espectrometría de masas mediante la técnica de MALDI-TOF. La secuencia de los péptidos resultantes se comparó con la de otras proteínas disponibles en las bases de datos del “*GenBank*” (www.pubmed.com). La semejanza de dichas proteínas con los fragmentos

²¹¹ **Bollag DM, Rozycki MD y Edelstein SJ.** 1996. Trichloroacetic Acid (TCA) Precipitation. Bollag, DM, Rozycki MD y Edelstein SJ (eds) En: Protein Methods, p 84. Willey-Lyss INC. New York

peptídicos se analizó mediante probabilidad utilizando el método “Mowse Score”. El antígeno se identificó con la proteína que mostró un grado de similitud significativamente mayor ($p > 0.05$), y que hemos denominado como proteína P47. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid del CSIC.

A partir de la secuencia aminoacídica de la proteína identificada se obtuvo en el “GenBank” el gen que la codifica, que hemos denominado gen *p47*, y su contexto genómico en la cepa *N. meningitidis* Z2491. La correspondencia de los genes que flanquean el gen *p47* en otras especies de *Neisseria* presentes en la base de datos del “GenBank” o en el Sanger’s Institute se realizó mediante el alineamiento de secuencias con la herramienta BLASTn.

5. OBTENCIÓN DE SUEROS INMUNES

5.1 Obtención de sueros en ratón

Las OMVs extraídas de los cultivos en condiciones de restricción de hierro de las cepas Nm30 y B16B6 fueron utilizadas para inmunizar ratones Balb/c de un mes de edad, siguiendo lo descrito anteriormente²¹².

La inmunización siguió una pauta de tres dosis con un intervalo de 2 semanas entre cada una. Las dosis, compuestas de 20 µg de OMVs resuspendidos en 100 µl de adyuvante de Freund (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, Estados Unidos), se administraron por vía intraperitoneal. En la primera dosis el antígeno se emulsionó en adyuvante completo, mientras que en las siguientes se utilizó el adyuvante incompleto.

La extracción de la sangre se realizó a los cinco días de la última inmunización a través del plexo orbital del ojo. La sangre se dejó coagular durante 1 hora a temperatura ambiente y, tras un periodo de 12 horas a 4°C para retraer el coágulo,

²¹² **Sánchez S, Troncoso G, Criado MT y col.** 2002. In vitro induction of memory-driven responses against *Neisseria meningitidis* by priming with *Neisseria lactamica*. *Vaccine*, 20: 2957-63

se retiró el suero y se centrifugó a 2000 x *g* durante 10 minutos a la misma temperatura. Los antisueros se mantuvieron 30 minutos a 56°C para inactivar el complemento. A continuación, se les añadió azida sódica al 0,02%, se distribuyeron en alícuotas de 250 µl y se congelaron a -20°C hasta su uso.

5.2 Obtención de sueros en conejo

Los sueros policlonales contra la proteína P47 purificada (apdo. 4.3) y contra OMVs de la cepa Nm30 se obtuvieron en conejos de raza NeoZelandesa de 2-3 kg de peso, inmunizándolos continuando una modificación de la metodología descrita por Vaitukaitis²¹³.

Antes de iniciar la inmunización, se les extrajo sangre de la vena marginal de la oreja, cuyo suero fue considerado como suero no inmune (SNI). A continuación, se le administró a cada lote de conejos 500 µg de OMVs de la cepa Nm30 o 13 mg de P47 purificada, emulsionados en 500 µl de adyuvante completo de Freund. La dosis se administró por vía subdérmica en 50 pinchazos en la parte dorsal de los animales.

Transcurridos 54 días después de la primera inmunización se le administró por vía intramuscular al lote correspondiente, tres dosis de recuerdo cada 8 días. Las dosis estaban compuestas de 62,3 mg de proteína purificada o 500 µg de OMVs de la cepa Nm30 resuspendidas en 100 µl de PBS, pero en este caso sin adyuvante de Freund. Transcurridos doce días de la última inmunización se extrajo la sangre por punción cardíaca, se dejó coagular y se retiró el suero. El complemento se inactivó por calor y se distribuyó en alícuotas, de igual modo que los sueros de ratón precedentes.

Para valorar la eficacia de la inmunización, durante este proceso se extrajo sangre a través de la vena marginal de la oreja. La primera comprobación se realizó

²¹³ **Vaitukaitis JL.** 1981. Production of antisera with samall doses of immunogen: multiple intradermal injections. Langone JJ, van Vunakis H (eds). En: *Methods Enzymol*, 73: p 46, Academic Press, New York

a los 49 días, y a medida que se iban suministrando las subsiguientes dosis, se valoró la producción de anticuerpos cada 7 días después de la inmunización.

La titulación de los sueros obtenidos durante el proceso de inmunización se determinó en inmunoensayos en fase sólida enfrentando 2 µg de OMVs y de la proteína P47 purificada, $1,5 \times 10^5$ células formalinizadas sin tratar con etanol de las cepas *N. meningitidis* Nm30 y NmP7, tal y como se describe en el apdo. 6.2. La reactividad cruzada de dichos sueros se analizó mediante inmuno blotting con OMVs de la cepa Nm30 sometidas a electroforesis en geles de peine continuo, siguiendo las indicaciones del apdo. 6.1.

6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN ANTIGÉNICA MEDIANTE INMUNOENSAYO EN FASE SÓLIDA

La presencia de la proteína P47 y otras OMPs en las diferentes cepas fue realizada mediante las técnicas de western blotting y dot blotting empleando los sueros policlonales de conejos anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30.

6.1 Detección de la respuesta antigénica frente a las proteínas desnaturalizadas

Las proteínas de las células formalinizadas fueron sometidas a SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas PVDF (apdo. 3.1 y 3.2). Para ello se resuspendieron 15 µl de células formalinizadas ($1,5 \times 10^7$ células) en tampón de muestra de electroforesis y se calentaron a 95°C durante 30 minutos. La electroforesis se realizó en geles del 12% de poliacrilamida.

Las proteínas, previamente transferidas, fueron incubadas según el proceso descrito en el apdo. 3.3, empleando como anticuerpo primario los sueros de conejo anti-P47 o anti-OMVs de la cepa Nm30 diluidos a la misma dilución de trabajo. Las proteínas se detectaron en las membranas utilizando como referencia

un patrón de masas estándar de bajo peso molecular conjugadas a biotina (BioRad Laboratories, Estados Unidos).

6.2 Detección de la respuesta antigénica frente a las proteínas nativas

La capacidad de los sueros de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 para reaccionar con los antígenos sobre las células enteras se realizó aplicando la técnica del dot blotting. Se recogieron 1,5 µl de células formalinizadas ($1,5 \times 10^6$ células) tratadas y no tratadas previamente con etanol y se depositaron sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro (BioRad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos), dejándose secar a temperatura ambiente y a 37°C 10 minutos. En algunas ocasiones la membrana con las células fijadas fue sometida a vapores de cloroformo durante 20 minutos y posteriormente se dejó secar 15 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a 37°C.

Los lugares reactivos de la membrana se bloquearon con TBS con Blotto al 5% (p/v) incubándose durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con TBS-Tween y se incubó durante 90 minutos con anti-P47 o anti-OMVs de la cepa Nm30 diluidos en TBS-Tween con Blotto 1% (p/v). El exceso de anticuerpo se retiró mediante tres lavados y el anticuerpo unido fue detectado con suero anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa diluido 1×10^{-3} en tampón TBS-Tween con Blotto™ al 1% (p/v). Las membranas se lavaron nuevamente y se sumergieron en una solución sustrato-indicador compuesta de 4-cloro-naftol y H_2O_2 al 0,04 % (v/v) en PBS que se mantuvo en agitación constante y a temperatura ambiente durante 20 minutos. La reacción enzimática se detuvo tras añadirle agua destilada en exceso.

La dilución de trabajo del suero anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 se determinó previamente depositando una cantidad conocida de células formalinizadas e incubadas con distintas diluciones de cada suero. La mayor

dilución que permitió observar perfectamente la reacción en todas las cepas estudiadas fue considerada como dilución de trabajo.

7. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

7.1. Unión del antisuero a células enteras

Para evaluar la reacción de los anticuerpos anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 obtenidos en conejos frente a las células enteras individuales se realizó un inmunoensayo de fluorescencia indirecto, modificando la metodología continuada por Welsch y col²¹⁴.

Las condiciones óptimas de reacción (temperaturas, tiempos, volúmenes y número de lavados), la solución bloqueante y diluyente, el agente fijador celular así como la concentración de los reactivos (concentración de células, tinción celular, suero inmune anti-P47 de conejo y conjugado) se determinaron utilizando controles positivos (suspensión de células enteras fijadas de las cepas Nm30, B16B6, GLD, Nm60, Nm70, Nm59, NmP7 y NmP18 enfrentadas al suero anti-OMVs de la cepa Nm30 y anti-P47) y controles negativos (células enteras fijadas enfrentadas o no al suero no inmune), tal como se describe a continuación.

Como agentes de bloqueo y diluyente se evaluaron seroalbúmina bovina (Sigma Co., BSA) diluida al 1% (v/v) en TBS-Tween al 0,05% (TBSA) (apéndice 3) y leche descremada o Blotto diluida al 5% (v/v) en TBS.

La dilución óptima del suero inmune y la concentración de células se determinaron conjuntamente utilizando diluciones de los sueros anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 (2×10^{-2} , 1×10^{-2} , 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} y 2×10^{-5}) y concentraciones de células fijadas con formaldehído al 1% (v/v) o glutaraldehído al 0,25% (v/v) (10^5 - 10^8 bacterias/ml). La menor concentración de células que produjo

²¹⁴ Welsch JA, Moe GR, Rossi R y col. 2003. Antibody to genome-derived neisserial antigen 2132, a *Neisseria meningitidis* candidate vaccine, confers protection against bacteremia in the absence of complement-mediated bactericidal activity. *J Infect Dis*, 188: 1730-1740

la mayor reactividad del suero y el agente fijador que no alteró dicha reactividad con respecto a las células vivas o inactivadas por calor fue seleccionado para el resto de ensayos. Se evaluaron complementariamente, siguiendo los mismos criterios de optimización, diluciones del anticuerpo secundario (2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , $2,5 \times 10^{-4}$ y $1,25 \times 10^{-4}$) [anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a un fluorocromo Alexa Fluor[®] 488 (Molecular Probes, Eugene, Estados Unidos)].

Finalmente, para diferenciar las células de otros eventos con similares características en tamaño o complejidad (detallado en apdo. 7.2), las células se tiñeron con una solución stock 100 μ M de BacLight[™] Bacterial Strains (Molecular Probes Inc., Eugene, Estados Unidos) diluida previamente en Dimetil sulfóxido (DMSO). La dilución óptima que permitió la tinción celular se evaluó con diluciones seriadas a partir del stock (1×10^{-2} , 1×10^{-3} y 1×10^{-4}).

Las células vivas, fijadas y/o permeabilizadas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación constante y en oscuridad. A partir de la suspensión de células bloqueadas, se recogió una parte y se resuspendió en 1 ml de solución diluyente. A continuación, se tiñeron a temperatura ambiente durante 90 min (agitación constante y oscuridad), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El exceso de tinción se retiró con un lavado en TBS mediante centrifugación (10 000 x g durante 10 minutos).

Las células teñidas se incubaron 90 minutos a 37°C en agitación constante con 1 ml de los sueros anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 y los anticuerpos no unidos se eliminaron en un lavado con TBS realizado mediante centrifugación (10 000 x g durante 10 minutos). El sedimento fue resuspendido en 100 μ l de solución diluyente que contenía el anticuerpo secundario diluido y la suspensión se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación constante. Para eliminar el solapamiento

de fluorocromos y las uniones inespecíficas de ambos sueros, se emplearon dos controles negativos por cada muestra que contenían los siguientes reactivos:

1°. Células sin teñir incubadas con suero de conejo (anti-P47 o anti-OMVs de la cepa Nm30) y solución de anticuerpo secundario.

2°. Células teñidas con BacLight™ Bacterial Strains e incubadas con suero no inmune y solución de anticuerpo secundario.

Todos los experimentos fueron realizados al menos en dos días diferentes.

7.2 Condiciones de lectura y análisis de datos

Las lecturas se realizaron en un citómetro de flujo Modelo Coulter® EPICS-XL® utilizando el programa System II para la adquisición de los datos y empleando los dos controles negativos correspondientes por cada muestra. El primer control se utilizó para eliminar el solapamiento de fluorescencia emitida por el suero conjugado sobre la emitida por la tinción celular. La unión no específica se determinó empleando el segundo control negativo a la misma dilución que el suero ensayado. Bajo estas condiciones se adquirieron los datos de cada muestra recogiendo 10000 eventos teñidos.

Para los análisis poblacionales se seleccionaron únicamente las células individuales, respecto al primer control negativo y en base a la intensidad de los ángulos de refracción “*Forward Side Scatter*” (luz reflejada a 180°, FSC) y “*Side Scatter*” (luz refractada en sentido ortogonal, SSC). La señal de los ángulos de luz es el resultado de la luz refractada y reflejada tras incidir con las células, el FSC indica la morfología y tamaño celular relativo, mientras que el ángulo de refracción SSC es un indicador del tamaño, granularidad o topografía de la superficie externa²¹⁵. Los análisis cualitativos se realizaron en gráficos biparamétricos

²¹⁵ McCoy JP. 2002. Basic principles of flow cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am*, 16: 229-243

superponiendo la intensidad de fluorescencia emitida por cada población enfrentada con los respectivos sueros.

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia recogida a partir de las células individuales y teñidas se expresó como la media de la intensidad de fluorescencia relativa al suero no inmune, la variabilidad entre ensayos como error estándar y la variabilidad intrapoblacional como coeficiente de variación. Los datos fueron analizados con el programa WinMDI® versión 2.8 y los análisis estadísticos con Grafpad® Prims versión 3.0. El análisis de las diferencias significativas entre las distintas poblaciones evaluadas se realizó con el Test de Mann Whitney-Wilconson.

8. ENSAYOS DE “CROSSLINKING” CON FORMALDEHIDO

La unión del suero anti-P47 a la proteína P47 asociada a otras OMPs se analizó mediante la técnica del “cross-linking” con formaldehído y posterior SDS-PAGE. La unión se determinó posteriormente en un inmunoblotting. El ensayo se realizó tanto en células enteras y OMVs fijadas con formaldehído como en células sin fijar, tratando las muestras con diferentes condiciones para establecer la posible rotura de enlaces entre proteínas²¹⁶. Las células sin fijar y formalinizadas se calentaron a 37°C durante 20 minutos y a 95°C durante 10, 20 y 30 minutos y las OMVs formalinizadas se calentaron a 37°C y a 95°C durante 20 minutos, respectivamente.

La electroforesis se realizó en geles con un gradiente lineal de poliacrilamida del 4-5% al 15% y las proteínas fueron fijadas y teñidas con tinción Coomassie Brilliant Blue G-250 o transferidas a membranas PVDF, como se describió en el apdo. 3.2. Las proteínas antigénicas unidas a la membrana se revelaron empleando el suero de conejo anti-P47 diluido 1×10^{-3} , según lo descrito en el apdo. 3.3.

²¹⁶ Sánchez S, Abel A, Arenas J y col. 2006. Cross-linking analysis of antigenic outer membrane protein complexes of *Neisseria meningitidis*. *Res Microbiol*, 157: 136-142

Después de detectar la unión del suero anti-P47, el resto de proteínas antigénicas se revelaron mediante un inmunoblotting secuencial con el suero de conejo anti-OMVs de la cepa Nm30 diluido 1×10^{-3} y 1×10^{-4} .

9. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *p47*

La detección del gen *p47* en todas las cepas utilizadas en el presente estudio se realizó mediante una amplificación específica por PCR. Para su secuenciación completa, se amplificaron varios fragmentos solapados entre sí que, tras ser purificados y secuenciados como se describe en el apdo. 9.2 y 9.3, fueron ensamblados para obtener la secuencia completa.

Los cebadores óptimos para la reacción se diseñaron con el programa Primer3 (http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/primer3_www.cgi) basándose en la secuencia del gen *p47* de la cepa *N. meningitidis* Z2941 (NMA0281), disponible en la base de datos del “GenBank”, y de una cepa de *N. lactamica* que está siendo secuenciada por el Sanger’s Institute, y también disponible en Internet. Todos ellos fueron sintetizados y suministrados por Sigma-Aldrich Co.

9.1 Preparación del ADN

El ADN de las cepas se extrajo resuspendiendo en agua desionizada libre de proteasas y nucleasas (Sigma-Aldrich C) la mitad de un cultivo en césped en medio de cultivo sólido Choc Iso. La suspensión se trató a 100°C durante 20 minutos y posteriormente a -20°C durante 2 minutos. Tras centrifugar a $10\,000 \times g$ durante 5 minutos se recogió el sobrenadante, conteniendo el ADN, y se distribuyó en alícuotas que se conservaron a -20°C .

9.2 Reacción de amplificación

La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó en un termociclador MyCycler™ versión 1.06 (BioRad Laboratories Richmond, CA, Estados Unidos). Excepto los cebadores, todos los reactivos empleados fueron suministrados por el mismo proveedor y en todos los ensayos se empleó agua desionizada libre de proteasas y nucleasas.

Las condiciones óptimas de la reacción (temperaturas y concentración de reactivos) fueron determinadas utilizando un control positivo (todos los reactivos de la mezcla y ADN de la cepa Nm30) y un control negativo (todos los reactivos de la mezcla sin ADN), tal y como se describe a continuación.

Para cada reacción, las concentraciones óptimas de Cl_2Mg (1-4 mM) y dNTPs (5-20 μM), las unidades de BioTaq polimerasa (1-3), el volumen de ADN (0,5-2,5 μl) y la concentración de cebador (4-12 μM) se determinaron conjuntamente con diferentes temperaturas de anillamiento (56°C-67°C). La mezcla de la reacción, con un volumen final de 20 μl , contenía además $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 16 mM, Tris-Cl 67 mM (pH 8,8) y Tween 20 al 0,01% (v/v). El proceso de amplificación está recogido en la **Tabla 6**.

Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% o al 2% (p/v), según el tamaño esperado del oligonucleotido, y empleando el programa GelDoc® 2000. El tamaño de los fragmentos amplificados se calculó utilizando un patrón de oligonucleótidos estándar (BioRad Laboratories Richmond, CA, Estados Unidos).

En algunos casos una vez purificado el fragmento de interés, fue necesario realizar una segunda amplificación para obtener una mayor cantidad de producto para la secuenciación.

Tabla 6.- Condiciones del proceso de PCR utilizadas para la detección y secuenciación del gen *p47* en diferentes cepas de *N. meningitidis*, *N. sicca*, *N. subflava* y *N. lactamica* utilizadas en el presente estudio

Proceso	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización	5 minutos	94°C	1
Amplificación			
<i>desnaturalización</i>	30 segundos	94°C	27
<i>anillamiento de cebadores</i>	30 segundos	V*	
<i>síntesis</i>	1 minuto	72°C	
Síntesis final	4 minutos	72°C	1

* Dependiente de cada cebador y cepa bacteriana

9.3 Purificación del producto amplificado

Con el objeto de eliminar de los productos de la reacción de amplificación las sales, enzimas, nucleótidos y oligonucleótidos de pequeño tamaño que pudiesen interferir en las reacciones de secuenciación, se utilizaron los kits de limpieza “Quick-clean®” (BioRad Lab) o “QIAquick Gel Extration Kit®” (QIAGEN Lab), siguiendo los protocolos establecidos por los fabricantes.

El primero se empleó cuando se obtuvieron productos específicos en la reacción de PCR. Para ello, se mezcló el mismo volumen del producto de reacción con la solución de lavado, agitando vigorosamente y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se centrifugó (13 000 x g durante 15 min) y al sedimento resultante se le añadió etanol al 70% (v/v), agitando vigorosamente durante 30 segundos para precipitar el ADN. La suspensión se centrifugó en las mismas condiciones, y tras desechar el sobrenadante, el sedimento se mantuvo a temperatura ambiente hasta eliminar los restos de etanol.

El kit “QIAquick Gel Extration Kit®” se utilizó cuando fue necesario purificar el fragmento de interés a partir del gel. En estos casos, el producto se extrajo de la

zona del correspondiente al fragmento deseado, añadiendo 3 volúmenes de tampón QC por volumen de gel e incubándose a 50°C durante 10 minutos hasta solubilizar la agarosa. Posteriormente, se adicionó un volumen de isopropanol, se mezcló, y se hizo pasar por una “QIA spin column” mediante centrifugación, para unir el ADN. A continuación, a la columna se le añadieron 0,5 mL de tampón QG, se centrifugó y se le adicionó 0,75 mL de tampón PE que se mantuvo durante 5 minutos. Después de dos centrifugaciones sucesivas para retirar los restos de etanol, el ADN unido a la columna se eluyó mediante la adición de 30 µl de agua desionizada. En todos los casos el ADN se mantuvo a 4°C o -20°C hasta su secuenciación. Todas las centrifugaciones realizadas se hicieron en una centrifuga Biofuge 13 (Heraeus) a 17 900x g durante 1 minuto

9.4. Reacciones de secuenciación

La secuenciación de los productos de amplificación purificados se realizó en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Pública Carlos III (Majadahonda, Madrid) y en la empresa sistemasgenómicos (Valencia).

En algunas ocasiones, las reacciones de marcaje/amplificación de los fragmentos purificados fueron realizadas en nuestro laboratorio empleando el kit de secuenciación “Cycle DNA sequencing Kit®” (sequencing RR-100 v3.1, AB, Foster). Para ello se mezclaron 4 µL de producto amplificado y purificado, 3 µL de solución BigDye Terminador™, 1 µL de cada primer a 5 µM y 2 µL de H₂O. En la **Tabla 7** se recogen las condiciones del proceso de marcaje utilizado.

Las reacciones de amplificación/marcaje se realizaron de forma independiente para cada cadena y se repitieron al menos dos veces.

Tabla 7.- Condiciones del proceso de amplificación/marcale de diferentes productos de PCR para su secuenciación

Proceso	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización	3 minutos	94°C	1
Amplificación			
Desnaturalización	10 segundos	96°C	
Anillamiento de cebadores	5 segundos	50°C	25
Síntesis	4 minutos	60°C	

9.5 Reconstrucción y análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *p47*

Para cada cepa, las secuencias de cada fragmento se editaron con el programa Chromax (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y se ensamblaron con el programa SeqMan v.II (DNASoft, Inc, Madison, Wis). Las ORFs se determinaron a partir de las definidas para las cepas *N. meningitidis* Z2491 y MC58, disponibles en el “GenBank”. Todas las secuencias de los genes completos, así como las disponibles en el “GenBank” (*N. meningitidis* Z2491 y MC58 y *N. gonorrhoeae* NG1090) y la de *N. lactamica* depositada por el Sanger’s Institute, se alinearon por el programa CLUSTALW²¹⁷ (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) y MEGA3.v1 (<http://www.megasoftware.net/>).

El grado de similitud entre los alelos identificados se representó mediante la construcción de árboles filogenéticos utilizando el método de Neighbor-joining²¹⁸.

²¹⁷ Higgins D y Sharp R. 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci*, 5: 151-153

²¹⁸ Saitou N y Nei M. 1987. Neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406-425.

10. PREDICCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA PROTEÍNA P47

10.1 Estructura primaria

La estructura primaria de la proteína fue obtenida a partir de las secuencias nucleotídicas de los distintos alelos identificados del gen *p47*, mediante el programa Gentle (<http://GENTle/.htm>) y utilizando el mismo patrón de traducción que el utilizado en las bases de datos del “GenBank” para el gen NMA0281.

Las secuencias proteicas obtenidas a partir de cada alelo fueron alineadas y analizadas con los programas citados en el apdo. 9.5. De igual modo que con las secuencias nucleotídicas, el grado de similitud entre las variantes proteicas identificadas se representó mediante árboles filogenéticos.

10.2 Reconocimiento de estructuras superiores

Algunas características estructurales de la proteína P47 (estructura secundaria, motivos, dominios, lugares de unión, localización, regiones transmembrana o hidrofobicidad) fueron deducidas a partir de la secuencia primaria de las distintas variantes identificadas para la proteína P47. Para ello, se han utilizado diversos servidores de acceso libre vía Internet, basados en patrones de reconocimiento de estructuras ya conocidas en otras proteínas o de diferentes algoritmos que reconocen regiones internas en la secuencia facilitada (**Tabla 8**).

10.3 Predicción de epítomos lineales

Los epítomos lineales de las distintas variantes proteicas fueron calculados utilizando el algoritmo de Kolaskar y Prasad²¹⁹ introduciendo las diferentes secuencias en el servidor disponible en Internet (<http://www.mifoundation.org/>).

²¹⁹ Kolaskar AS y Tongaonkar PC. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*, 276: 172-174

Tabla 8.- Servidores utilizados para el reconocimiento de diversas estructuras y características moleculares del antígeno de 47 kDa

Servidor/programa	Utilidades	Dirección en Internet
NPS@: Network Protein Sequence Analysis ²²⁰	Predicción de la estructura secundaria mediante diferentes algoritmos (DSC, HNNC, MLRC, PHD, PREDATOR)	http://pbil.ibcp.fr/
Gentle	Patrón de hidrofobicidad	http://GENTle/htm
DAS Transmembrane Prediction Server	Predicción de segmentos transmembrana	http://www.sbc.su.se
Pubmed	Identificación de dominios, motivos y lugares de unión	http://www.ncbi.nlm.nih/html
PROSITE ²²¹		http://myhits.isb-sib.ch/html
Lipo 1.0 server ²²²	Predicción de lipoproteínas y péptidos señal	http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP-1.0/LipoP1.0server.html
Signal IP3.0	Predicción de distintos tipos señales en lipoproteínas	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
PSORT	Predicción de los lugares de localización de proteínas	http://psort.nibb.ac.www.html
PHYRE	Predicción de estructuras terciarias y lugares reactivos	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/
Multicoil v.1.0	Predicción de conformaciones superhelicoidales	http://theory.lcs.mit.edu/~elwolf/multicoil.html

²²⁰ Combet C, Blanchet C, Geourjon C y col. 2000. NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS*, 3: 147-150

²²¹ Falquet L, Pagni M, Bucher P, y col. 2002. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* 30: 235-238

²²² Sierakowska A, Willenbrick H, Heijne G y col. 2003. Prediction of lipoprotein signal peptides in gram-negative bacteria. *Protein Sci.*, 12: 1652-1662

11. ENSAYO DE ACTIVIDAD BACTERICIDA

El ensayo de actividad bactericida se realizó con los sueros de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 frente a las cepas Nm30, B16B6, NMB, Nm9, Nm62, Nm63, Nm68 y NmP19, según describe Sánchez y col²²³.

Un mililitro de suspensión bacteriana ajustada a una DO_{540} de 1,6–1,8 nm se inoculó en 20 ml de medio MH/Desferal. Dicho matraz se incubó durante 10-12 horas a 37°C en agitación (110 *rpm*). Parte de la suspensión bacteriana se transfirió a un segundo matraz con 20 ml del mismo medio hasta alcanzar una DO_{540} de 0,16. Este subcultivo se incubó durante 3 horas en las mismas condiciones que las anteriores hasta alcanzar la fase exponencial del crecimiento. Posteriormente, las células se separaron del medio mediante centrifugación (2 000 x *g* 10 min) y se preparó una suspensión con $1,6 \times 10^4$ bacterias/ml en tampón GBSS [glucosa 5,5 mM, fosfato monopotásico 0,44 mM, fosfato disódico 1,3 mM, cloruro cálcico 1,3 mM, cloruro potásico 5,4 mM, cloruro sódico 137 mM, cloruro magnésico 1 mM, sulfato amnésico 0,81 mM y gelatina al 0,1% (p/v)] (apéndice 3).

En una placa de microtitulación estéril de fondo en U se mezclaron, por triplicado, 25 µl de suspensión bacteriana, 50 µl de suero diluido $2,5 \times 10^{-1}$ en GBSS y 25 µl de complemento de conejo de 3-4 semanas (Pel-Freez CS). Después de una incubación de 30 minutos a 37°C, se depositaron 25 µl de la mezcla y extendieron sobre placas de medio GC agar base suplementado con Biovitex al 1% (v/v) manteniéndolas a 37°C con atmósfera de CO₂ del 5%. El recuento de unidades formadoras de colonias se determinó a las 12 horas.

²²³ **Sánchez S, Troncoso G, Ferreirós CM y col.** 2001. Evaluation of cross-reactive antigens as determinants of cross-bactericidal activity in pathogenic and comensal *Neisseria*. *Vaccine*, 19:3390-3398

Por cada experimento se incluyeron, también por triplicado, los siguientes controles negativos:

- 1 - suspensión bacteriana, complemento y suero no inmune
- 2 - suspensión bacteriana, GBSS y suero inmune

Todos los experimentos se realizaron en tres días diferentes. La actividad bactericida se expresó en términos de porcentaje de reducción en el número de células viables con respecto al suero no inmune y la variación interensayo como el error estándar. La tasa de mortalidad para cada suero se determinó según las siguientes expresiones:

$$\text{Tasa de Viabilidad} = \frac{\text{Media de CFU* del suero} \times 100}{\text{Media de CFU del control 1}}$$

$$\text{Tasa Mortalidad} = 100 - \text{Tasa de Viabilidad}$$

* Unidades formadoras de colonia

El suero fue considerado bactericida cuando alcanzó una tasa de mortalidad superior al 50%. La expresión de la proteína P47 en las colonias viables se determinó resuspendiendo las colonias en 100 µl de agua destilada y desarrollando un inmunoensayo dot blotting, como se indica en el apdo. 6.2.

12. APÉNDICES

12.1 Medios de cultivo

*** Medio sólido Choc Iso**

El medio sólido Choc-Iso se prepara tras la mezcla de dos soluciones de igual volumen y esterilizadas de forma independiente a 121°C 10 min:

- Medio GC agar base 2X suplementado con agar hasta alcanzar 30 (g/l)
- Hemoglobina al 2% (p/v) en agua destilada.

Cuando ambas soluciones enfrían hasta alcanzar 50°C, se le añade a la solución de hemoglobina Biovitex al 1% y se mezclan convenientemente. Esta solución se vierte sobre placas Petri estériles desechables y se deja solidificar a temperatura ambiente.

*** Medio líquido Mueller Hinton**

De forma general, el medio MH se prepara tras solubilizar 21 g de medio MH en 1000 ml de agua destilada y esterilizarlo a 121°C durante 10 minutos. Para establecer las condiciones de restricción de hierro, el Desferal esterilizado por filtración debe añadirse 30 minutos antes de realizar el cultivo.

12.2 Tinciones de proteínas separadas por SDS-PAGE

*** Tinción Coomassie Brilliant Blue G-250**

Una vez retirado el gel de la carcasa de electroforesis, se lava durante unos segundos con agua destilada y se fijan las proteínas con TCA al 12% (p/v) a temperatura ambiente y en agitación suave. Al cabo de una hora se retira el TCA y se lava el gel para eliminar los restos de solución, sumergiéndolo a continuación en solución Coomassie al 0.1% (p/v) y sulfato amónico al 6% (p/v) durante aproximadamente 10-12 horas. El exceso de colorante se retira mediante lavados sucesivos en agua destilada.

*** Tinción de cobre**

Después de retirar el gel de la carcasa de electroforesis tras SDS-PAGE, se lava con agua destilada y se introduce en una solución de cloruro de cobre 0,3 M durante 5 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Una vez cortada del gel la porción correspondiente a la banda de interés, se destiñe incubándolo 10 minutos a temperatura ambiente en una solución compuesta de EDTA 0,25 mM y 0,25 M TrisHCl pH 9,0. Después de repetir el proceso tres veces se incuba durante 10 min a temperatura y agitación constante en una solución compuesta de Tris-Base 20 mM, Glicina 150 mM y SDS 0,01%.

*** Tinción de Plata**

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lava con agua destilada y se sumerge en distintas soluciones en el siguiente orden:

- 1- Fijación, 30 minutos
- 2- Sensibilización, 30 minutos
- 3- 3 lavados con agua destilada de 5 minutos
- 4- Reacción con plata, 20 minutos
- 5- 2 lavados de 1 minuto
- 6- Revelado, 2-5 minutos
- 7- Parada, 10 minutos
- 8- Tres lavado con agua destilada de 5 minutos

Soluciones:

A. Fijación	100 ml de Etanol, 25 ml de ácido acético glacial y 125 ml H ₂ O _d
B. Sensibilización	75 ml de Etanol, 10 ml de tiosulfato sódico 5% (p/v), 17 g de acetato sódico y llevar a 250 ml con H ₂ O _d
C. Solución de plata	25 ml de Nitrato de plata 2.5% (p/v) y enrasar con H ₂ O _d

D. Revelado	6,25 g de Carbonato sódico, 100 µl de formaldehído 37% (p/v) y enrasar con H ₂ O
E. Parada	3,65 g EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O en 250 ml de H ₂ O

12.3 Tampones

*** Tampón fósforo salino (PBS)**

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Agua destilada	800 ml

Se ajusta a pH 7,4 y se enrasa a 1000 ml

*** Tampón acetato**

El tampón se prepara a partir de dos soluciones:

Solución 1:

Ácido acético (99, 7%)	1,15 ml
Agua destilada	98,85 ml

Solución 2:

CH ₃ CO ₂ Na	2,72 g
Agua destilada	100 ml

Se mezclan ambas soluciones hasta alcanzar un pH 5,8 y se diluye a la mitad en agua destilada. A continuación se disuelven en 0,84 g de cloruro de litio por cada 100 ml.

* **Tampón Tris-aminometano-HCL**

Tris	6 g
Agua destilada	60 ml

Se ajusta a pH 6,8 con HCl 6N y se enrasa a 100 ml.

* **Tampón Tris-HCl**

Tris	54,46 g
Agua destilada	150 ml

Se ajusta a pH 8,8 con HCl 6N y se enrasa a 300 ml.

* **Tampón de muestra de EEF para geles de poliacrilamida 2X**

Azul de Bromofenol 0,05%	0,2 ml
2-B-mercaptoetanol	0,4 ml
Glicerol	0,8 ml
Tampón Tris aminometano-HCl	1 ml
SDS	0,16 g

* **Tampón de transferencia**

Glicina	28,83 g
Tris	6,067 g
Agua destilada	400 ml
Etanol	200 ml

Se enrasa hasta 2 litros.

* **Solución sustrato/indicador o de revelado**

4-cloro-naftol	4 ml
H ₂ O ₂	5,32 ml
PBS	16 ml

Se prepara antes de su uso manteniéndolo en oscuridad.

*** Tampón TBS y TBS-Tween**

Tris	2,42 g
NaCl	29,24 g
Agua destilada	800 ml

Se ajusta a pH 7,4 y se enrasa a 1000 ml.

Para preparar TBS-Tween antes de enrasar se añade 0,5 ml de Tween 20 y se mantiene en agitación hasta que se disuelva completamente el detergente.

*** Tampón TBSA**

Tris	2,42 g
NaCl	29,24 g
BSA	10 g
Agua destilada	800 ml

Se ajusta a pH 7,4, se añade 0,5 ml de Tween 20 y se enrasa a 1000 ml.

*** Tampón GBSS**

El tampón se prepara a partir de dos soluciones stock:

- Stock 1 10X:

Glucosa	2 g
KH_2PO_4	0,12 g
Na_2HPO_4	0,38 g
Agua desionizada	200 ml

- Stock 2 10 X:

CaCl_2	0,372 g
KCl	0,8 g
NaCl	16 g
MgCl_2	0,4 g
Mg SO_4	0,4 g
Agua desionizada	200 ml

Se mezclan 10 ml de cada stock y se enrasa a 100 ml de agua desionizada y se esteriliza por filtración manteniéndola a 4°C. Antes de su uso se recogen 20 ml de dicha solución y se le añade 1 ml de gelatina estéril al 10%.

*** Tampón TBE 10 X**

Tris-Base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 05M	20 ml
Agua destilada	800 ml

Se ajusta a pH 8,3 y se enrasa hasta 1000 ml.

RESULTADOS

1. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO DE 47kDa

1.1 Extracción de OMPs mediante Tritón X-114 y purificación por elución a partir de geles de poliacrilamida

La purificación del antígeno de 47 kDa se llevó a cabo con el fin de su posterior identificación y caracterización molecular y genética que permitió la obtención de un suero policlonal específico contra el mismo y que se utilizó como herramienta para determinar su expresión, antigenicidad y accesibilidad en un amplio número de cepas. Permitió además, valorar su potencial como candidato vacunal contra la meningitis meningocócica.

Como se observa en la **Figura 2** y **3**, la expresión del antígeno de 47 kDa fue inversamente proporcional a la concentración de hierro existente en el medio de cultivo utilizado, carácter mostrado en las dos cepas analizadas (ver Mat y Met. apdo. 4.1 y 4.2) pero fundamentalmente en la Nm30. Como indican los experimentos realizados con esta cepa, cuando se cultivó en medio MH/Desferal (condiciones de restricción de hierro), su expresión fue mucho más intensa que cuando se cultivó en un medio enriquecido en hierro como el Choc Iso (ver **Figura 2**, línea 4 y 6). Al comparar el perfil antigénico de ambas cepas se observó que la expresión de dicho antígeno fue considerablemente mayor en la cepa Nm30. Además, tras su solubilización, el antígeno fue localizado en la fase detergente, lo cual define *a priori* su carácter hidrófobo.

En lo que respecta al resto de antígenos extraídos, en los distintos cultivos de la cepa Nm30 se detectaron antígenos mayoritarios con masas comprendidas entre 67 y 31 kDa, de expresión y solubilidad variable. Algunos de ellos se expresaron mayoritariamente en condiciones de suficiencia de hierro. Al comparar el patrón antigénico de esta cepa con la cepa B16B6 se detectaron antígenos comunes y

antígenos propios de esta última cepa. No obstante, las mayores diferencias corresponden a antígenos localizados en la región de alto peso molecular de la cepa B16B6. Los antígenos de esta última cepa también se caracterizaron por una expresión variable según el medio de cultivo, sin embargo, a diferencia de la cepa Nm30, su solubilización fue esencialmente en la fase detergente.

Figura 2.- Patrón antigénico con suero de ratón homólogo anti-OMVs de la cepa Nm30 de las fases acuosa (línea 1, 2 y 3) y detergente (línea 4, 5 y 6) obtenidas tras la extracción con Tritón X-114 de OMPs cultivadas en condiciones en medio sólido Choc Iso (Fe^{++}), medio MH (Fe^+) y medio MH y MH/Desferal (Fe^-), respectivamente. Pm, estándar de peso molecular.

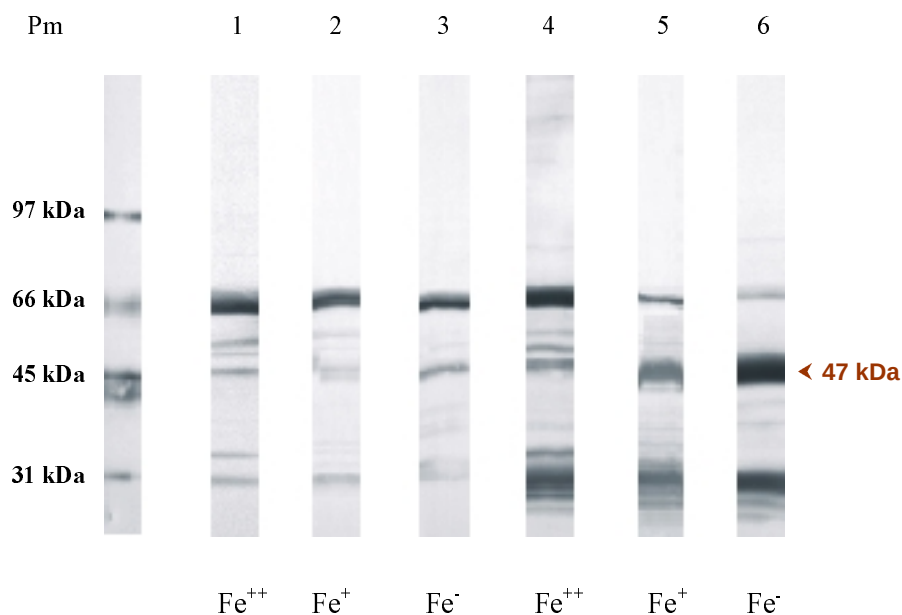
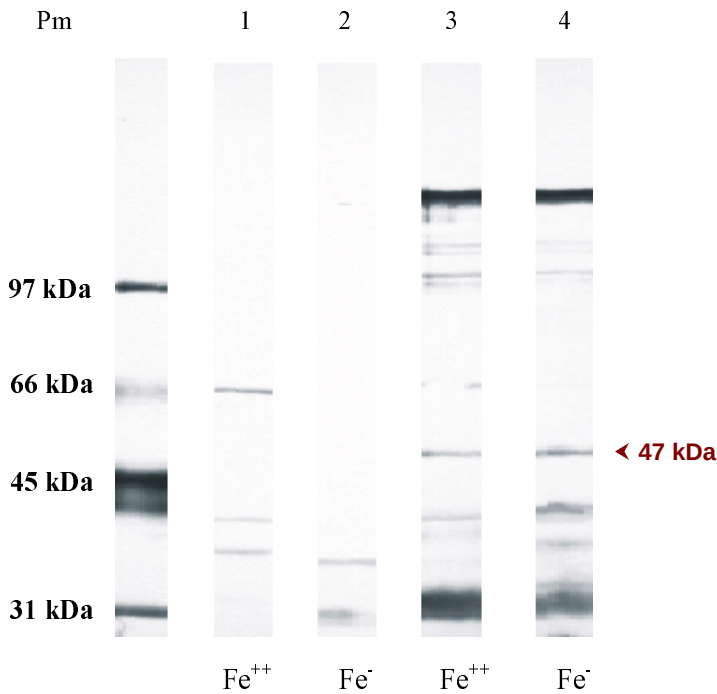
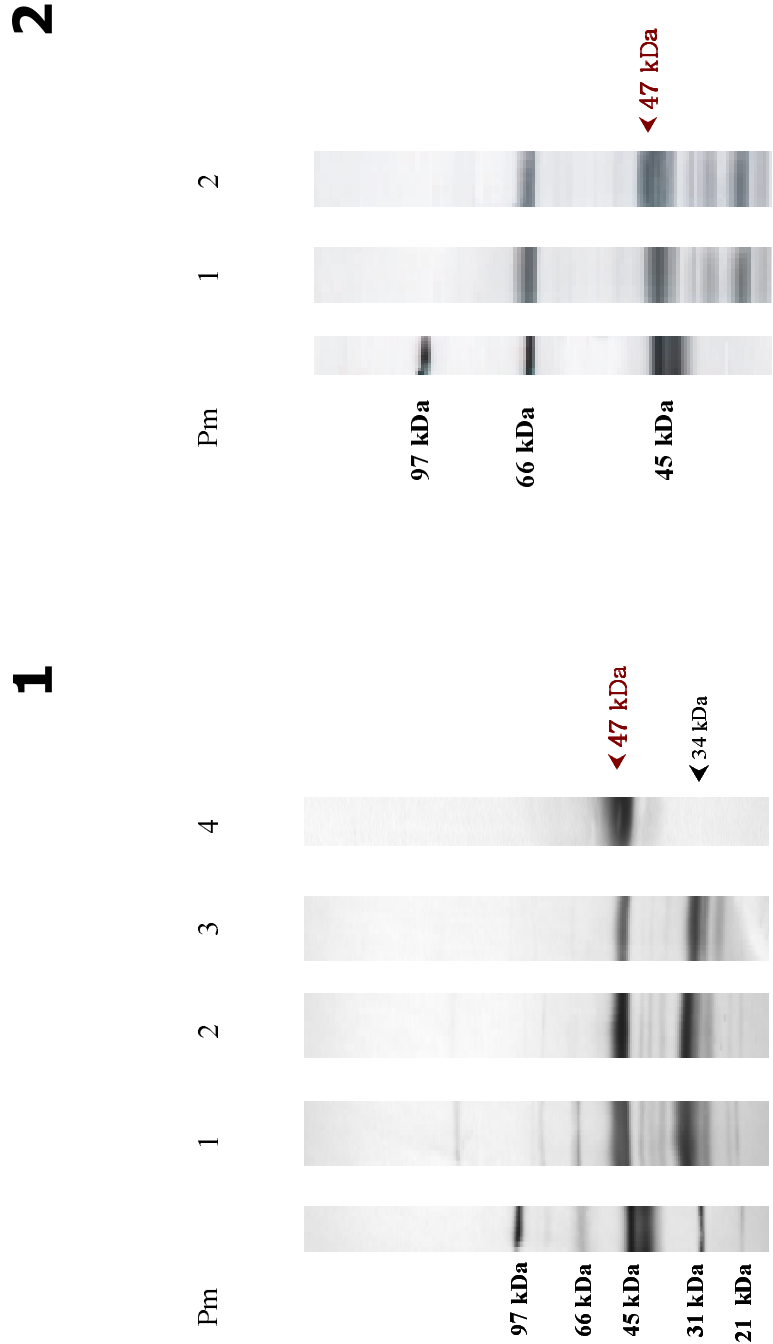


Figura 3.- Patrón antigénico con suero de ratón homólogo anti-OMVs de la cepa B16B6 de las fases acuosa (línea 1 y 2) y detergente (línea 3 y 4) obtenidas tras la extracción con Tritón X-114 de OMPs de la misma cepa cultivada en medio sólido Choc Iso (Fe^{++}) y en MH/Desferal (Fe^-). Pm, estándar de peso molecular.



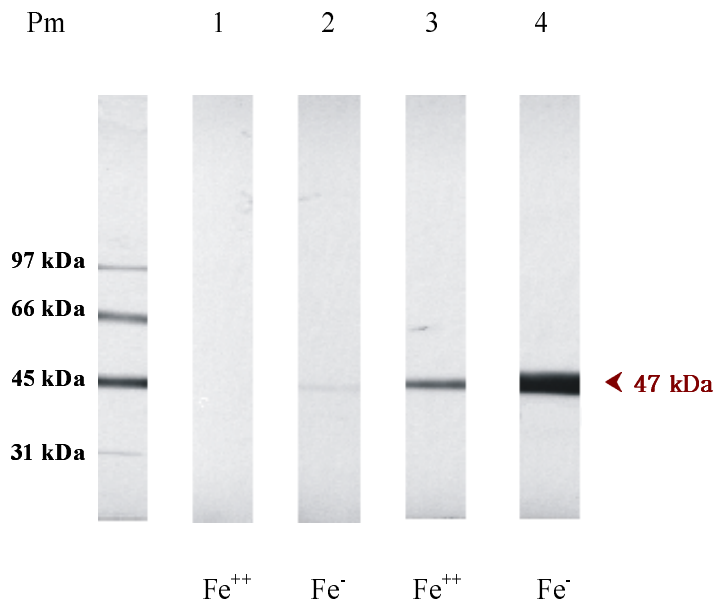
El análisis del revelado de diferentes diluciones de la fase detergente obtenida en los cultivos de restricción de hierro de la cepa Nm30 (ver **Figura 4,1**), indicó que la banda de 47 kDa observada tras la reacción con el suero homólogo anti-OMVs de la cepa Nm30 se corresponde con un único antígeno, mientras que por ejemplo, la banda de 34 kDa se corresponde con al menos dos. Estos resultados se confirmaron al someter dicha alícuota y OMVs obtenidas de la misma cepa y en las mismas condiciones a SDS-PAGE, en geles con un gradiente de acrilamida diferente (ver **Figura 4,2**). Además, la posterior purificación del antígeno a partir de dicha alícuota y su revelado con suero de ratón anti-OMVs de la misma cepa, puso de manifiesto la ausencia de otros antígenos contaminantes que se pudiesen copurificar durante el proceso (ver **Figura 4,1** línea 4).

Figura 4.- (1) Western blot, con suero de ratón homólogo anti-OMVs de la cepa Nm30, de diferentes diluciones de la fase detergente extraída con Tritón X-114 a partir de cultivos en MH/Desferal y separadas en geles en gradiente de acrilamida del 4 al 15% (línea 1: 5×10^{-2} , línea 2: 2×10^{-2} , línea 3: $1,4 \times 10^{-2}$); Línea 4: antígeno de 47 kDa purificado. **(2)** OMVs obtenidas de la cepa Nm30 cultivada en MH/Desferal (línea 1) y OMVs obtenidas de la fase detergente (línea 2) reveladas con un suero de ratón homólogo anti-OMVs de la cepa Nm30 y separadas en geles con un gradiente de acrilamida del 6 al 9%. Pm, estándar de peso molecular



Una vez obtenido el suero inmune específico contra el antígeno purificado, éste se utilizó para analizar si el antígeno de 47 kDa detectado en las fases acuosa y detergente se correspondían con la misma proteína. Estos análisis indicaron que ambos fueron reconocidos por el suero anti-P47, y por tanto, se demostró su solubilización parcial, aunque minoritaria, en la fase acuosa de los cultivos en restricción de hierro (ver **Figura 5**).

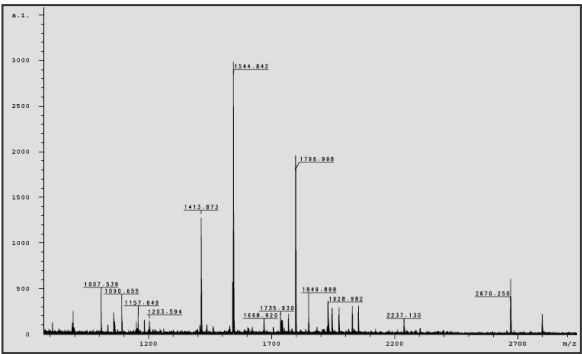
Figura 5.- Reacción antigénica del suero de conejo específico anti-P47 con las fases acuosa (línea 1 y 2) y detergente (línea 3 y 4) obtenidas tras la extracción con Tritón X-114 de OMPs de la cepa Nm30 cultivada en medio sólido Choc Iso (Fe^{++}) y en MH/Desferal (Fe^-)



1.2 Identificación del antígeno de 47 kDa

La identificación del antígeno de 47 kDa se realizó mediante la huella molecular de fragmentos peptídicos procedentes de su digestión con tripsina, y posterior análisis por MALDI-TOF (ver **Figura 6**). La comparación de la secuencia de dichos fragmentos con la de otras proteínas de secuencia conocida estableció una relación de 10 proteínas similares, cuya semejanza se analizó mediante probabilidad “Mowse Score”. La semejanza de estas proteínas con el antígeno se resume en la **Tabla 9**.

Figura 6.- Espectro y cota de masas obtenidas por MALDI-TOF de los fragmentos peptídicos resultantes de la digestión triptica del antígeno de 47 kDa purificado



Observado	Mr (exp)	Mr (calc)	Delta	Inic-Fin	Miss	Péptido
1034.60	1033.59	1033.54	0.05	145-153	0	LSQPLADYK
1058.68	1057.67	1057.62	0.05	77-84	1	KLWEILK
1150.64	1149.63	1149.64	-0.00	124-134	1	GKLVVTDSGFK
1157.65	1156.64	1156.61	0.03	262-272	0	EIDALAFPPGK
1203.59	1202.59	1202.55	0.04	349-358	1	TKDGFETYDK
1413.87	1412.87	1412.84	0.03	314-325	0	IVDLFRPLIEAK
1441.96	1540.95	1540.93	0.02	313-325	1	IVDLFRPLIEAK
1544.84	1543.84	1543.81	0.03	273-288	0	VVGGAELIEEVAGSK
1735.93	1794.92	1734.92	0.00	232-246	1	IEYALWVEKDVSGVK
1797.00	1795.99	1795.98	0.01	366-382	0	ALQASINALAEDLAQLR
1883.88	1882.87	1882.83	0.04	296-312	0	YSHTDLSDFQANVDGSK
1928.98	1927.97	1927.97	0.01	85-102	1	GVMVVDERENIAPGLSDK
1944.99	1943.98	1943.96	0.02	85-102	1	GVMVVDERENIAPGLSDKM
2027.05	2026.04	2026.06	-0.02	196-213	0	IEPIAELFSELDPVIDAR
2052.01	2051.01	2051.01	0.00	126-144	1	LVVTDSGFKDTANEADLEK
2670.25	2669.24	2669.18	0.06	289-312	1	ISGEEDRYSHTDLSDFQANVDGSK

Tabla 9.- Semejanza entre proteínas identificadas, secuenciadas y anotadas en el “GenBank” y los péptidos digeridos del antígeno de 47 kDa de la cepa *N. meningitidis* Nm30

Nº identificativo	Masa (kDa)	Puntuación	Descripción / especie
01. gi 15675975	42,3	203	proteína hipotéticamente conservada (<i>N. meningitidis</i>)
02. gi 15793298	42,4	168	probable lipoproteína (<i>N. meningitidis</i>)
03. gi 11877796	10,4	55	maturasa (<i>Voyriella parviflora</i>)
04. gi 15232144	16,0	54	proteína de expresión (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
05. gi 18977088	31,4	51	3-hydroxyisobutyrate dehidrogenase (<i>Pyrococcus</i> sp)
06. gi 28378220	7,5	50	probable regulador de la transcripción (<i>Lactobacillus</i> p)
07. gi 45515464	10,2	50	COG2924 proteína protectora de cluster (<i>Ralstoni</i> sp)
08. gi 19076014	78,2	50	probable metalopeptidasa (<i>Schizosaccharomyces</i> sp)
09. gi 38346484	122,8	49	OSJNBa0021f22.17 (<i>Oriza sativa</i>)
10. gi 18655670	169,4	48	Cadena A de Desoxy hemoglobina

Las características de las dos proteínas con mayor similitud con el antígeno de 47 kDa, según la información actualmente disponible en las bases de datos del “GenBank”, son las siguientes:

» gi|15675975: proteína hipotéticamente conservada presente en la cepa *Neisseria meningitidis* MC58 (serogrupo B).

Locus= NP_273101; NMB0035; codificada por NC003112.1:33283..34449

Gen= 902138

» gi|15793298: probable lipoproteína presente en la cepa *Neisseria meningitidis* Z2491 (serogrupo A)

Locus=NP_283120; NMA0281; codificada por NC_003116.1:266408.

267574

Gen= 906289

La proteína designada como gi:|15675975 mostró un grado de similitud significativamente mayor con el antígeno de 47 kDa ($p < 0,05$) que la proteína gi:|15793298. Sin embargo, la equivalencia de la secuencia aminoacídica de ambas proteínas y su correspondencia en peso molecular indican que se trata de la misma molécula, correspondiéndose con el antígeno de 47 kDa. La información disponible para esta molécula en la citada base de datos señala que se trata de una proteína periplasmática implicada en el transporte de hierro (COG 2822), perteneciente al grupo de proteínas metabólicas y de transporte de iones inorgánicos.

1.3 Contexto genómico de la proteína P47

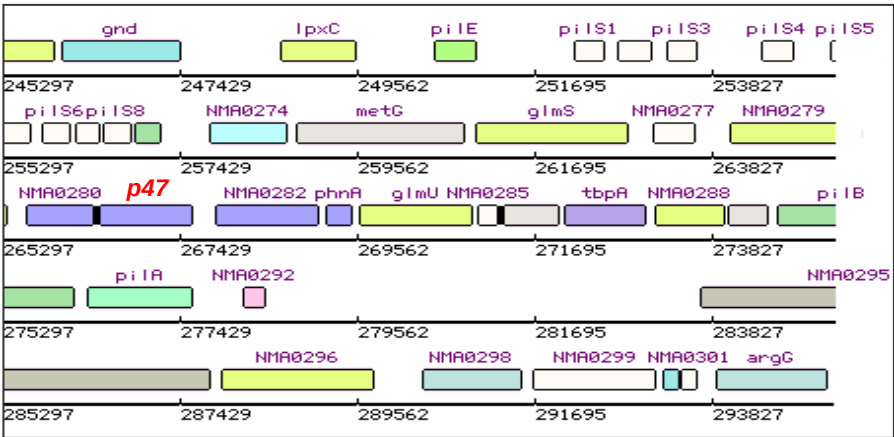
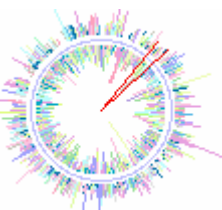
El gen *p47* se ubica en la cepa *N. meningitidis* Z2491 (denominado NMA0281) entre los nucleótidos 266408 y 267574 y se encuentra flanqueado por los genes denominados NMA0280, extremo 3', y NMA0282, extremo 5' (ver **Figura 7**). El primero codifica para una proteína integral de 279 aminoácidos perteneciente a la familia de proteínas FTR1, implicadas en el metabolismo del hierro (COG 4280), y con dominios similares a una permeasa con elevada afinidad por iones Fe^{+2} y Pb^{+2} . El gen NMA0282, separado del gen *p47* por una región no codificante compuesta por 262 pb, codifica para una proteína hipotéticamente conservada de 421 aminoácidos, perteneciente a la familia de las peroxidasas tipo Dyp (COG 2837). La disposición de los tres genes es similar en la cepa *N. meningitidis* MC58 también disponible en el "GenBank" (denominados como NMB0034-NMB0035-

NMB0036, respectivamente) y en la cepa de *N. lactamica* secuenciada por el Sanger's Institute. La cepa *N. gonorrhoeae* FA1090 presenta la misma disposición para los genes *p47* y NMA0282 igual que *N. meningitidis* y *N. lactamica* (denominados NG02050 y NG02051, respectivamente), aunque carece del gen correspondiente al NMA0280. La comparación de la secuencia nucleotídica de los genes indicados mediante alineamientos indica un alto grado de similitud entre ellos y entre las proteínas resultantes.

Figura 7.- Ubicación del gen *p47* (denominado NMA0281) según el mapa genómico de la cepa *Neisseria meningitidis* Z2491 disponible en el "GenBank"

Mapa genómico
de la cepa Z2491

Disposición de los locus situados entre los nucleótidos
245297-283827



2. CARACTERIZACIÓN DE SUEROS INMUNES

2.1 Titulación de los sueros de ratón

Los sueros de ratón anti-OMVs de las cepas Nm30 y B16B6 se obtuvieron para identificar proteínas antigénicas de la membrana externa solubilizadas en las fases resultantes de la extracción con Tritón X-114. La dilución de trabajo para ambos sueros, determinada mediante inmunoblotting, fue de 1×10^{-3} .

2.2 Titulación de los sueros de conejo

Con objeto de analizar la estimulación del sistema inmune de los conejos durante el proceso de inmunización con la proteína P47 purificada y OMVs de la cepa Nm30, se extrajo sangre de la vena marginal de la oreja en diferentes periodos de tiempo. La eficacia de la inmunización se determinó por titulación del suero extraído aplicando las técnicas de dot blotting (ver **Figura 8**) y western blotting utilizando como antígenos la proteína P47 purificada, OMVs de la cepas Nm30 y células enteras fijadas con formaldehído de las cepas Nm30 y NmP7. Los títulos obtenidos por dot blotting con las diferentes extracciones de sangre se muestran en la **Tabla 10**. Como puede observarse, los títulos obtenidos con los sueros anti-OMVs de la cepa Nm30 incrementaron progresivamente a medida que aumentaron los días de administración. Por el contrario, en el caso de los sueros anti-P47 sus títulos incrementaron a partir del día 70 de administración y, comparativamente, el título del suero final fue muy inferior con respecto al obtenido con el suero anti-OMVs.

Figura 8.- Titulación en dot blotting de los sueros de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 correspondientes a la tercera y última extracción de sangre frente a OMVs de la cepa Nm30, células formalinizadas de las cepas NmP7 y Nm30 y a la proteína P47 purificada a partir de la cepa Nm30. *Cf= célula formalinizada

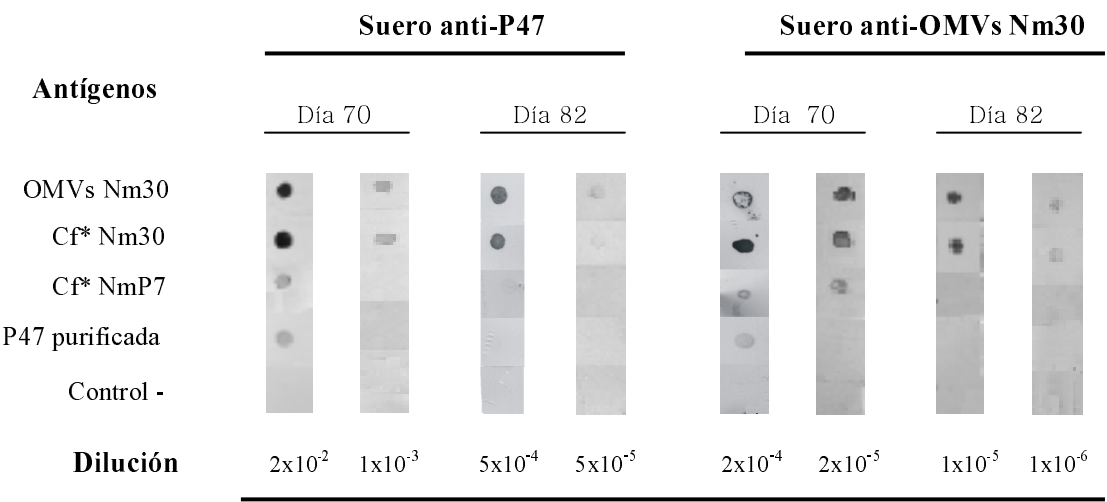


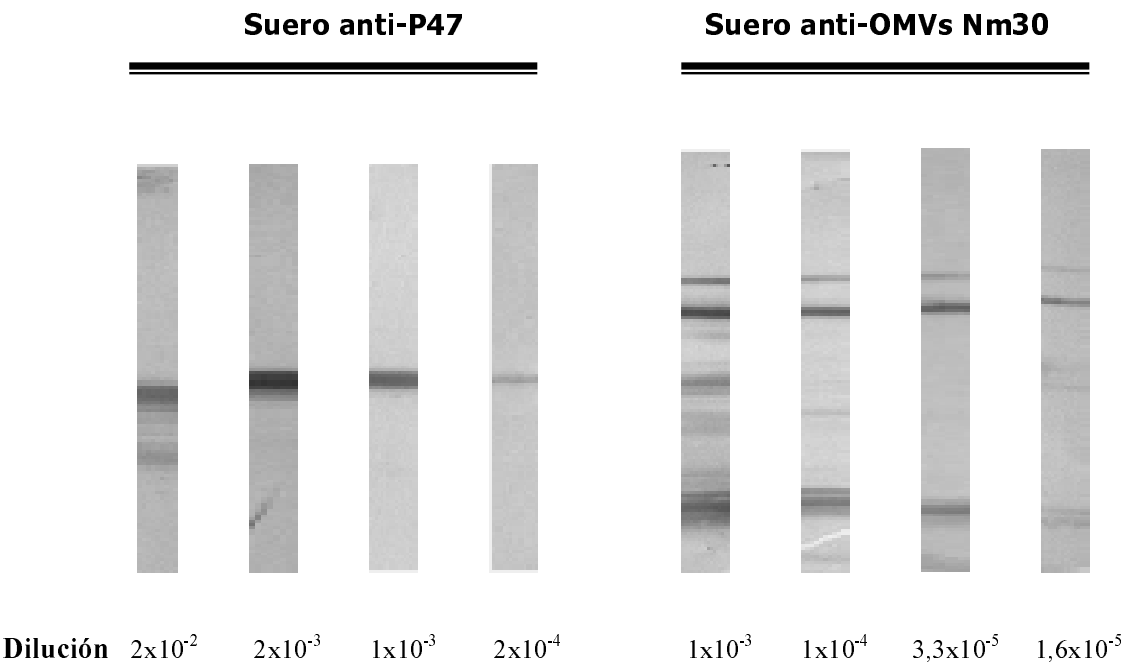
Tabla 10.- Titulación por dot blotting de los sueros de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30. *Cf = célula formalinizada

	<i>Suero anti-OMVs de la cepa Nm30</i>			
Antígenos	Día 49	Día 62	Día 70	Día 82
Cf* NmP7	$>5 \times 10^{-4}$	5×10^{-5}	2×10^{-5}	2×10^{-5}
Cf* Nm30	$>5 \times 10^{-4}$	2×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-6}
OMVs Nm30	$>5 \times 10^{-4}$	2×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-6}
P47 purificada	$>5 \times 10^{-4}$	2×10^{-4}	2×10^{-4}	-
	<i>Suero anti-P47</i>			
Cf* NmP7	2×10^{-2}	2×10^{-2}	1×10^{-2}	1×10^{-3}
Cf* Nm30	2×10^{-2}	1×10^{-2}	1×10^{-3}	5×10^{-5}
OMVs Nm30	2×10^{-2}	2×10^{-2}	1×10^{-3}	5×10^{-5}
P47 purificada	2×10^{-2}	2×10^{-2}	2×10^{-2}	1×10^{-3}

Al enfrentar los sueros anti-OMVs de la cepa Nm30 obtenidos en las sucesivas extracciones de sangre con OMVs de dicha cepa cultivada en restricción de hierro, se observó reactividad contra gran número de antígenos, inclusive la proteína P47 purificada. La especificidad del suero anti-P47 con la proteína se detectó a partir de la tercera inmunización.

La dilución óptima de trabajo con los sueros anti-OMVs de la cepa Nm30 y anti-P47 obtenidos en la extracción final del suero fue de 1×10^{-4} y 1×10^{-3} , respectivamente (ver **Figura 9**).

Figura 9.- Determinación de la dilución de trabajo de los sueros de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 obtenidos después del sangrado final frente OMVs de la misma cepa.



3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y ANTIGENICIDAD DE LA PROTEÍNA P47

3.1 Reactividad contra proteínas de la membrana externa desnaturalizadas

El suero anti-P47 nos permitió detectar la proteína y valorar su antigenicidad en aislados de *N. meningitidis*, *N. subflava*, *N. sicca* y *N. lactamica*. Este análisis se realizó mediante inmunoensayo en fase sólida tras someter células formalinizadas a SDS-PAGE y electrotransferir las proteínas a una membrana PVDF. Su amplia cross-reactividad y expresión en un mayor número de cepas fue corroborada y demostrada utilizando la dilución de trabajo del suero. Como se indica en la **Figura 10**, dicha proteína está presente en las 33 cepas examinadas pertenecientes a las cuatro especies analizadas del género *Neisseria*. Los ensayos demuestran una fuerte expresión del antígeno en todas las cepas de *N. meningitidis*, ligeramente menor en *N. lactamica* y una baja intensidad en la respuesta de *N. sicca* y *N. subflava*. Entre las cepas de *N. meningitidis* no se apreciaron diferencias significativas en la expresión de la proteína P47, mientras que en las cepas de *N. lactamica* NLP5 y NLP9 se observó una expresión más intensa que en el resto de los aislados de la misma especie.

Al incubar OMPs desnaturalizadas de distintas cepas de *N. meningitidis* con el suero anti-OMVs de la cepa Nm30 obtenidos en conejos se detectaron antígenos mayoritarios y comunes entre cepas invasivas y de portador en un amplio rango de pesos moleculares (**Figura 11**).

Figura 10.- Especificidad de la unión del suero de conejo anti-P47 en western blotting frente a células enteras de *N. meningitidis*, *N. sicca*, *N. subflava* y *N. lactamica*, cultivadas en MH/Desferal y tratadas con formaldehído. Pm, estándares de peso molecular. Dilución del suero 1x10⁻³

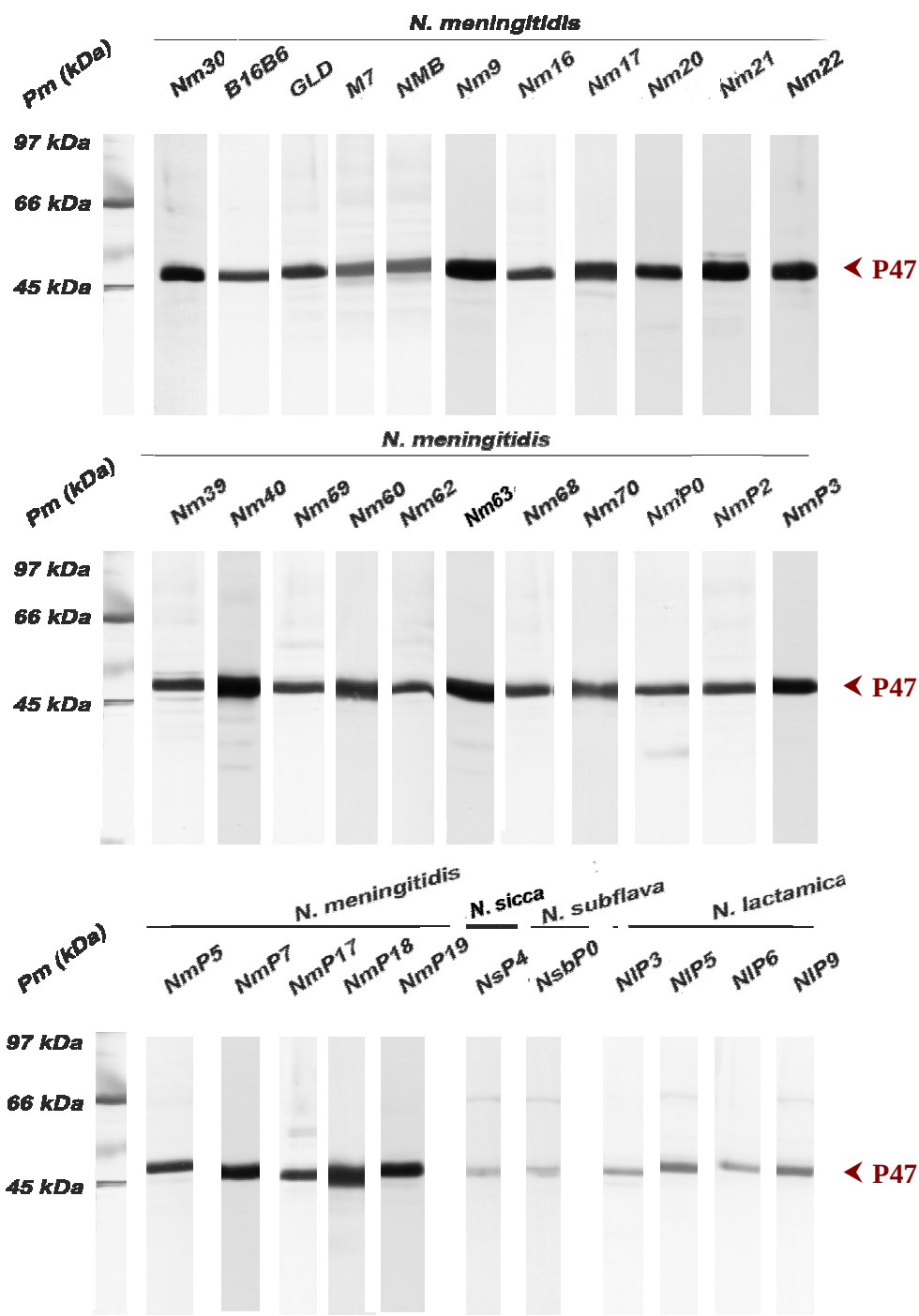
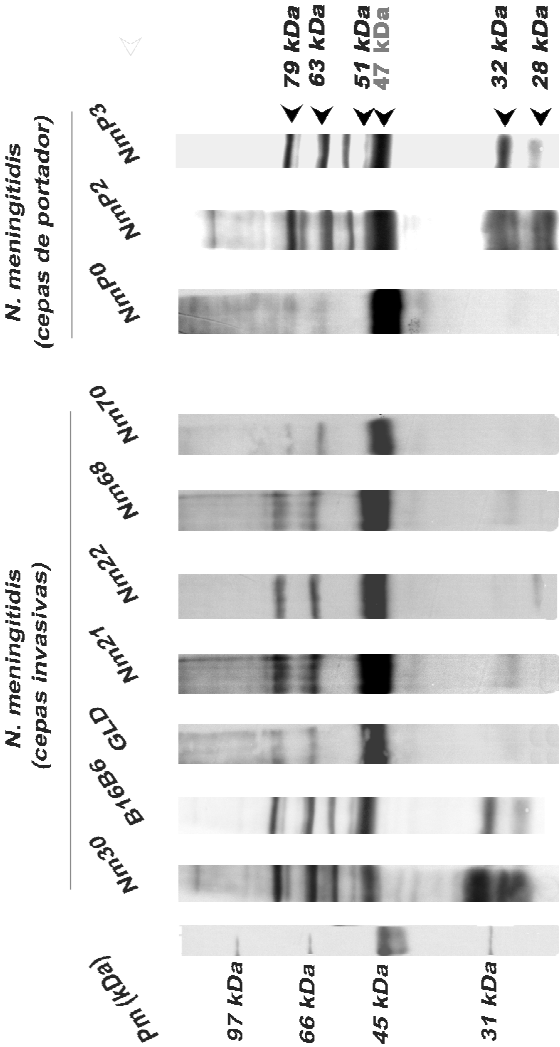


Figura 11.- Reactividad cruzada en western blotting del suero de conejo anti-OMVs de la cepa Nm30 con células enteras formalinizadas de cepas invasivas y aisladas de portadores de *N. meningitidis*, cultivadas en condiciones de restricción de hierro. Dilución del suero 1x10⁻⁴



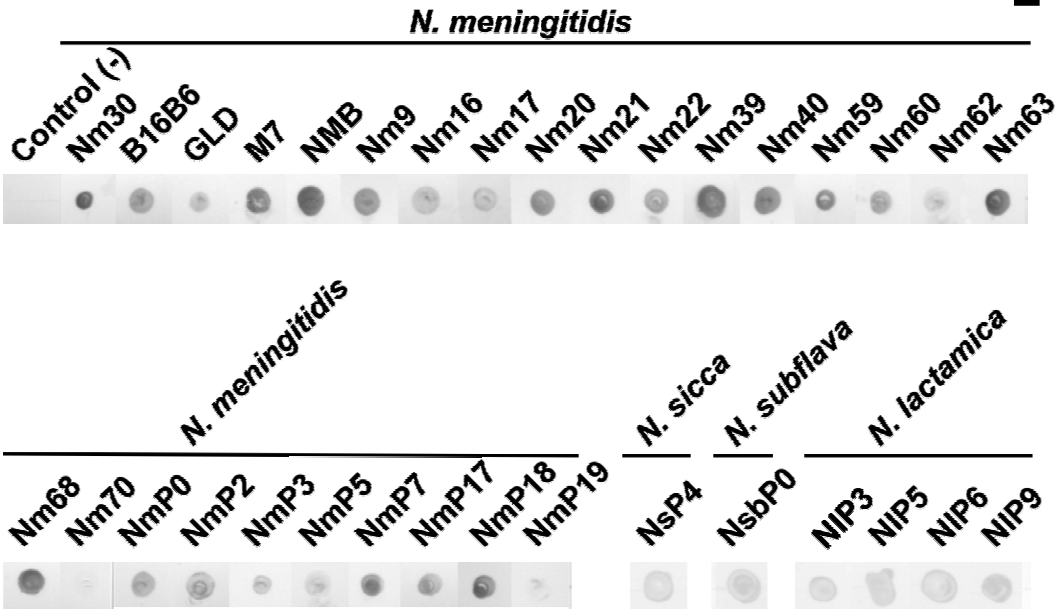
3.2 Reactividad contra proteínas de la membrana externa en condiciones nativas

La reactividad del suero anti-P47 con la proteína en condiciones nativas en dot blotting se realizó utilizando diferentes diluciones del mismo con el fin de determinar las diferencias de antigenicidad entre las cepas. Como indica la **Figura 12,1**, se observa una mayor heterogeneidad entre las distintas cepas de *N. meningitidis* con respecto a la obtenida frente a la proteína desnaturalizada (ver **Figura 10**), pero no así entre las *Neisserias* comensales. Estas diferencias de reactividad fueron observadas independientemente de la dilución del suero utilizada, mostrando cepas muy reactivas (*N. meningitidis* M7, Nm9 o Nm63, entre otras) y otras muy poco reactivas (*N. meningitidis* Nm62, Nm70 y NmP19).

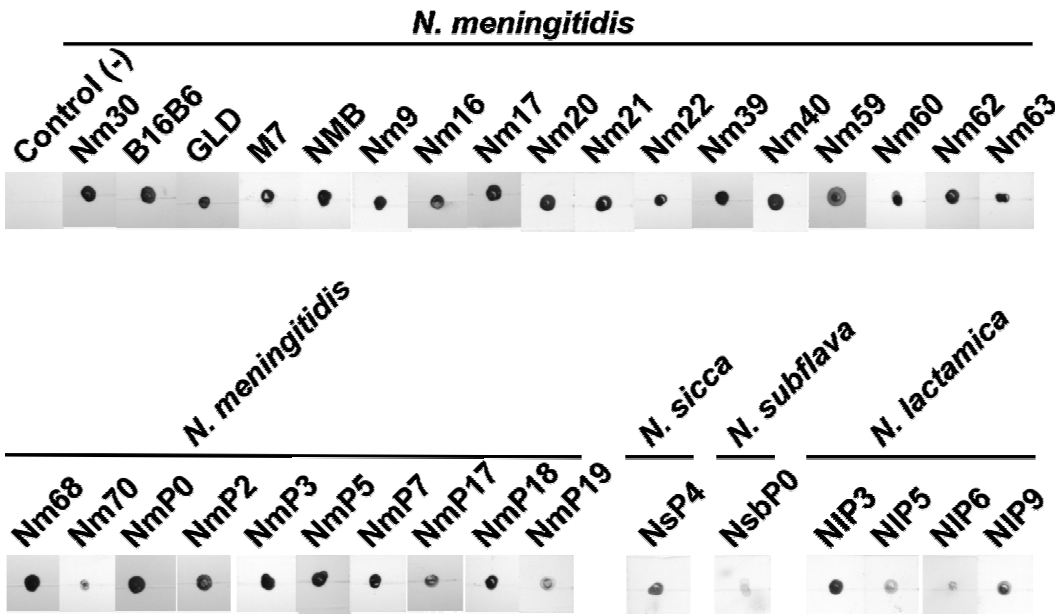
En los ensayos realizados con el suero de conejo anti-OMVs de la cepa Nm30 (**Figura 12,2**) se observa una mayor homogeneidad con todas las cepas de *N. meningitidis*, excepto con las cepas NmP19 y Nm70, cuya reacción con las mismas al igual que con el suero anti-P47 es más débil. Al contrario de lo que ocurrió con el suero anti-P47, se observó una mayor heterogeneidad en la respuesta de las *Neisserias* comensales.

Figura 12.- Detección mediante inmunoensayo en fase sólida de la unión de los sueros de conejo (1) anti-P47 y (2) anti-OMVs de la cepa Nm30 frente a células enteras formalinizadas de *N. meningitidis*, *N. sicca*, *N. subflava* y *N. lactamica*. Dilución del suero 1×10^{-3}

1



2



3.3 Ensayos de accesibilidad de la proteína P47 en dot blotting

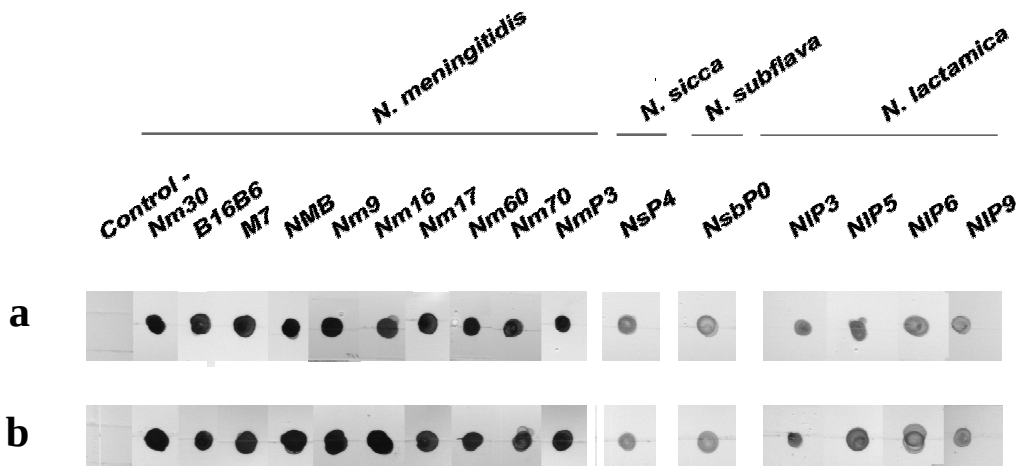
Con el fin de analizar si la heterogeneidad del suero anti-P47 observada en dot blotting era producto de la exposición diferencial de la proteína en la superficie del microorganismo, se realizaron ensayos utilizando cepas con distinta intensidad de reacción (ver Mat y Met. apdo. 6.2). Para valorar dicha exposición se enfrentó el suero con las células sometidas previamente a diferentes tratamientos:

- Fijación con formaldehído
- Permeabilización con etanol y posterior fijación con formaldehído
- Fijación con formaldehído y posterior permeabilización con vapores de cloroformo

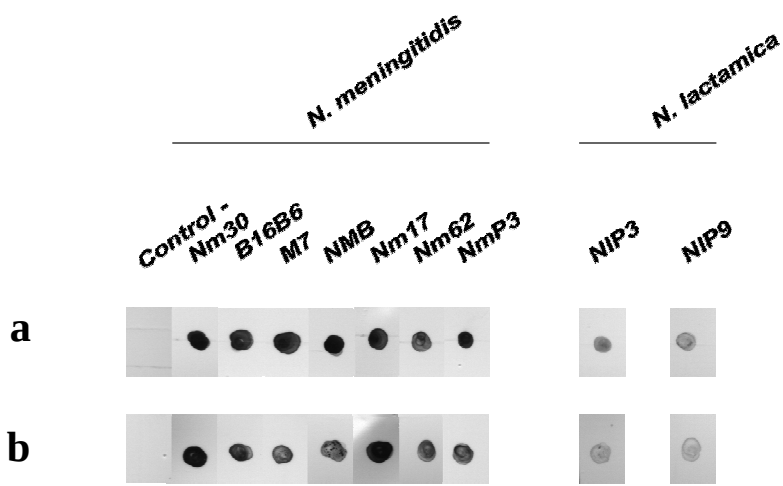
En la **Figura 13** se exponen las diferencias en la reactividad de las células permeabilizadas con etanol o vapores de cloroformo en relación con la observada con las células enteras formalinizadas. La permeabilización celular con cloroformo (**Figura 13,1**) no incrementó significativamente la reactividad de los sueros. Tras la permeabilización celular con etanol (**Figura 13,2**) se observó una reducción en la reactividad del suero con la cepa *N. meningitidis* NMB y M7 y con las dos cepas de *Neisseria lactamica* estudiadas NIP3 y NIP9, y un ligero incremento en las cepas *N. meningitidis* B16B6 y Nm17.

Figura 13.- Ensayos de accesibilidad por dot blotting de la proteína P47 en células enteras formalinizadas, permeabilizadas o no, de *N. meningitidis*, *N. sicca*, *N. subflava* y *N. lactamica*. (1) a) células enteras no tratadas y b) células permeabilizadas con vapores de cloroformo. (2) a) células enteras no tratadas y b) células permeabilizadas con etanol

1



2



4. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

4.1 Optimización del ensayo

La puesta a punto del inmunoensayo de fluorescencia indirecto para analizar la reactividad del suero anti-P47, frente a células individuales de poblaciones de *N. meningitidis* y *Neisserias* comensales por FCM, se ha realizado evaluando previamente diferentes tratamientos celulares.

Inicialmente se valoró el efecto de la composición de las soluciones de bloqueo y diluyente en los inmunoensayos. La solución con Blotto®, pese a evitar las uniones inespecíficas, favoreció la formación de agregados y el crecimiento de otras especies bacterianas, por lo que se utilizó BSA como agente de bloqueo alternativo. Aún así, dicha contaminación permitió valorar la capacidad del suero anti-OMVs de la cepa Nm30 para unirse específicamente a especies del género *Neisseria*. El suero, utilizado como control, discriminó correctamente las cepas de *N. meningitidis* de las otras especies bacterianas contaminantes. Su unión a las células de *Neisseria* se contrastó por microscopía de fluorescencia. El análisis en FCM se muestra en la **Figura 14**.

Los dos agentes fijadores valorados en los ensayos mostraron, tal como se observa en la **Figura 15**, que la reacción del suero anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 con estos difirió a diferentes concentraciones de células y en todas las diluciones del suero ensayadas. Se observa una mayor intensidad en las células fijadas con formaldehído que en las fijadas con glutaraldehído de la misma cepa y con ambos sueros. Además, la fijación con este último agente indujo la formación de grandes agregados celulares y, en consecuencia, fue excluida para posteriores ensayos.

Figura 14.- Especificidad del suero anti-OMVs de la cepa Nm30 frente a células de *N. meningitidis* B16B6 fijadas con formaldehído o con glutaraldehído bloqueadas con Blotto® mediante ensayos en FCM. → Poblaciones bacterianas contaminantes; → población bacteriana de *Neisseria meningitidis*

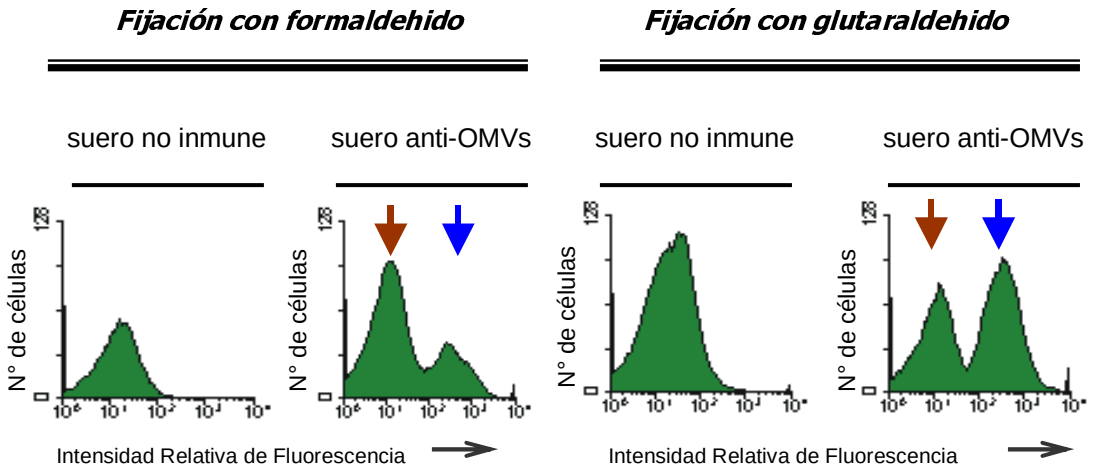
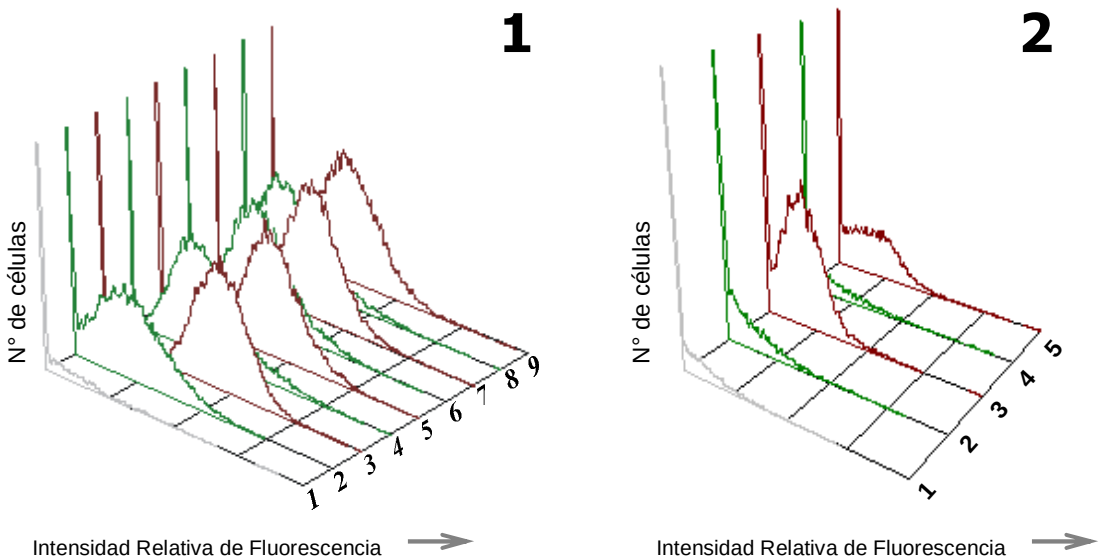
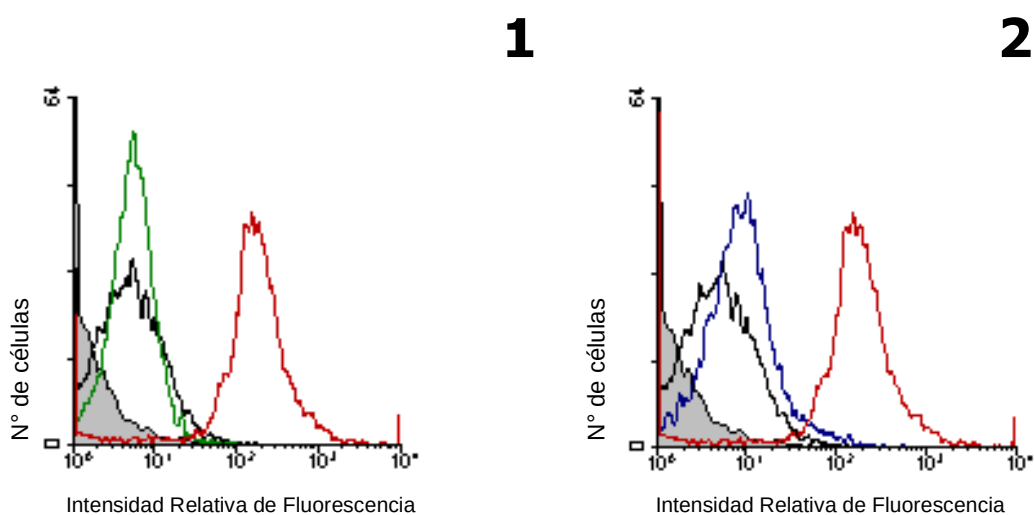


Figura 15.- Reactividad de diferentes diluciones de los sueros inmunes de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 con células fijadas con formaldehído (color granate) o glutaraldehído (color verde) de la cepa *N. meningitidis* Nm30 en ensayos en FCM. (1) suero no inmune diluido a 1×10^{-3} (línea 1, color gris); suero anti-OMVs de la cepa Nm30 diluido 1×10^{-3} (línea 2 y 3), 1×10^{-4} (línea 4 y 5), 5×10^{-5} (línea 6 y 7) 2×10^{-5} (línea 8 y 9). (2) suero no inmune 1×10^{-3} (línea 1, color gris); suero anti-P47 diluido 1×10^{-3} (línea 2 y 3), 1×10^{-4} (línea 4 y 5). La población bacteriana de ensayo fue de 10^7 células



Los ensayos posteriores realizados para comparar la reactividad de las células sometidas a diferentes tratamientos (ver Mat y Met apdo. 7.1) se indican en la **Figura 16**. Se puede observar que la reactividad de las células formalinizadas no varía substancialmente respecto a las células sin fijar o inactivadas por calor y, por lo tanto, dicho tratamiento parece adecuado para medir la reactividad del suero con el resto de las cepas del estudio.

Figura 16.- Comparación de la reactividad del suero anti-P47 en ensayos en FCM con células de la cepa *N. meningitidis* Nm30 sin fijar (color verde), fijadas con formaldehído (color negro) e inactivadas por calor y luego formalinizadas (color azul). La reactividad del suero no inmune (color gris sólido) y anti-OMVs de la cepa Nm30 (color rojo) se determinó con células fijadas con formaldehído. Dilución de los sueros 1×10^{-3} . (1) comparación de células formalinizadas con células sin fijar; (2) comparación de células formalinizadas con células inactivadas por calor y luego formalinizadas



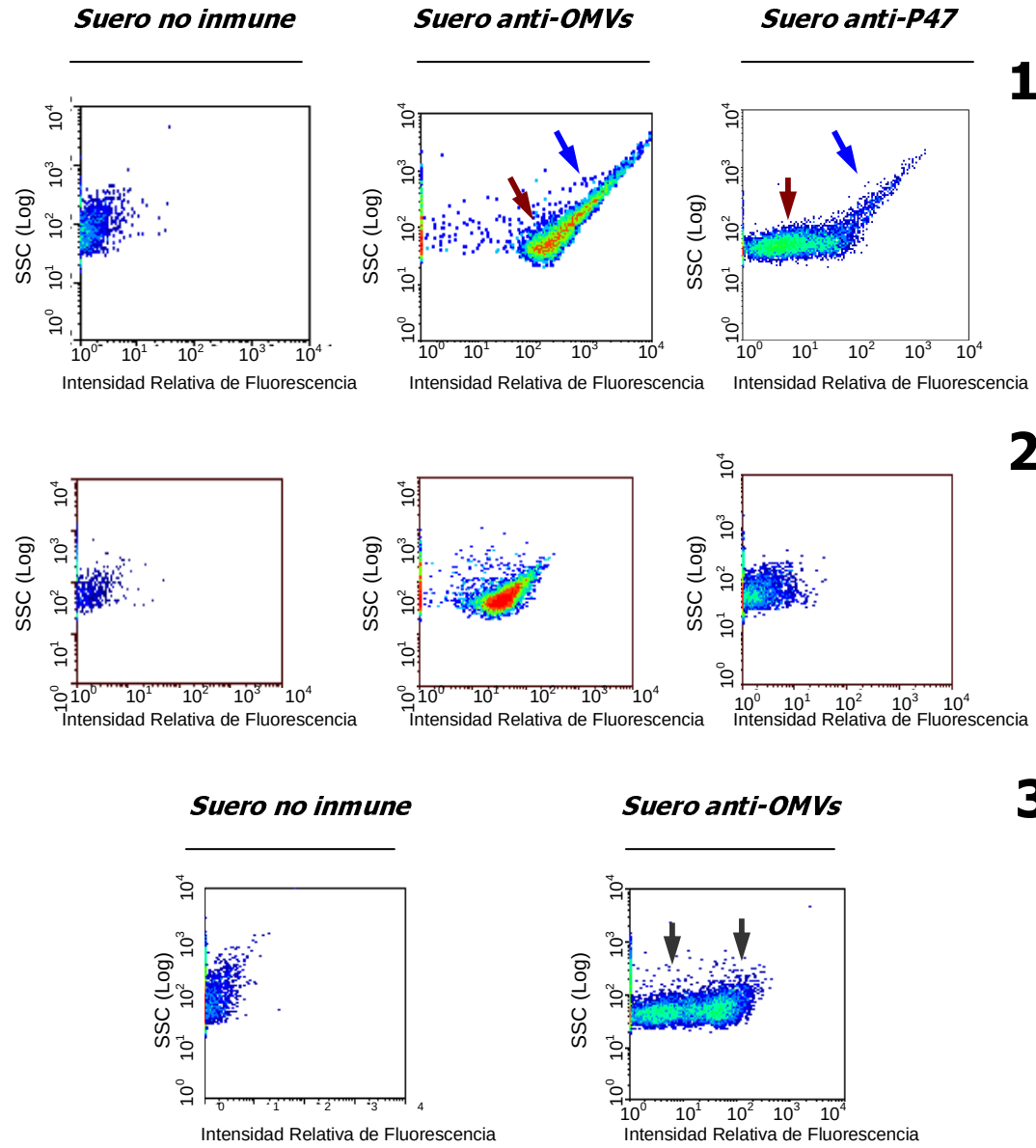
Las diferentes condiciones ensayadas para establecer la concentración de células, dilución de los sueros primario y secundario, y la concentración de tinción celular “BacLight™ Bacterial Strains” para los ensayos en FCM, fueron las siguientes: 1×10^7 , 1×10^{-3} y 1×10^{-3} , respectivamente. No se observaron globalmente diferencias significativas en la reactividad con diluciones menores del suero anti-P47 ($p < 0,05$; Mann Withney Tests).

4.2 Distribución de las poblaciones del meningococo con los sueros inmunes

La reacción de los sueros anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 dio lugar a diferentes variaciones en los ángulos de refracción (FSC y SSC) en las poblaciones evaluadas respecto a la del suero no inmune. Los tres modelos de distribución poblacional observados se muestran en la **Figura 17** con las cepas *N. meningitidis* Nm30, NMB, Nm62 y Nm9.

Se pudieron observar con ambos sueros, bien la formación de agregados celulares debido a la intensa reacción antígeno-anticuerpo (Ej.: cepa Nm30 y NMB, **Figura 17,1**) o bien, en la mayoría de las cepas una distribución homogénea (Ej.: cepa Nm9, **Figura 17,2**). Además, con una mayor dilución a 1×10^{-4} el suero anti-OMVs de la cepa Nm30 se observó un tercer tipo de distribución, en el cual se apreciaron subpoblaciones celulares en función de su reactividad (Ej.: cepa Nm62, **Figura 17,3**).

Figura 17.- Modelos de distribución de poblaciones de *N. meningitidis* tras la reacción con los sueros de conejo en función de la fluorescencia emitida y el ángulo de refracción SSC. **(1)** Formación de agregados celulares tras la reacción de la cepa Nm30 con el suero anti-OMVs de dicha cepa y de la cepa NMB con el suero anti-P47 diluidos a 1×10^{-3} ; células individuales (flecha granate); agregados celulares (flecha azul). **(2)** poblaciones homogéneas tras la reacción de la cepa Nm9 con los sueros anti-OMVs de la cepa Nm30 y anti-P47 diluidos 1×10^{-3} . **(3)** subpoblaciones celulares de diferente reactividad tras la reacción de la cepa Nm62 con el suero anti-OMVs de la cepa Nm30 a dilución 1×10^{-4} . Ubicación de las subpoblaciones (flecha negra)



4.3 Respuesta cualitativa de las poblaciones a los sueros de conejo

La unión específica a las poblaciones celulares se determinó evaluando la reactividad de ambos sueros respecto al suero no inmune a la misma dilución de trabajo, y se expresó en forma de desplazamiento de picos de fluorescencia representándose en gráficos biparamétricos. En la **Figura 18** se recogen los casos más representativos.

Como puede observarse, al igual que en dot blotting, la reactividad del suero anti-P47 fue diferente en las cepas de *N. meningitidis* y en las especies comensales. Estos ensayos también indicaron la existencia de heterogeneidad en la unión del suero dentro de las poblaciones y similar entre las cepas analizadas con algunas excepciones, aunque independientemente de su intensidad de reacción. Las cepas *N. meningitidis* Nm9 y NmP5 mostraron menor variabilidad respecto al resto de cepas y las cepas *N. meningitidis* Nm30, GLD y Nm22 una variabilidad superior.

Como ya habían señalado los resultados del dot blotting, la reactividad del suero anti-OMVs de la cepa Nm30 fue superior a la del anti-P47 en la totalidad de las cepas analizadas, resultante de una mayor cantidad de anticuerpos unidos por unidad celular. No obstante, las características cualitativas de tal reactividad fueron similares a las mostradas por el suero anti-P47, a excepción de un porcentaje minoritario de cepas, como la B16B6 o Nm22 entre otras, en las cuales difirió considerablemente con la del suero anti-P47. También se observó heterogeneidad intrapoblacional pero, a diferencia del suero anti-P47, prácticamente la totalidad de los componentes de cada población de *N. meningitidis* reaccionaron con el suero.

Figura 18.- Reactividad de los sueros de conejo anti-P47 (línea verde), anti-OMVs de la cepa Nm30 (línea granate) y suero no inmune (sombreado) frente a diferentes células fijadas con formaldehído de diferentes cepas de *N. meningitidis* analizada en FCM. Dilución de trabajo 1×10^{-3}

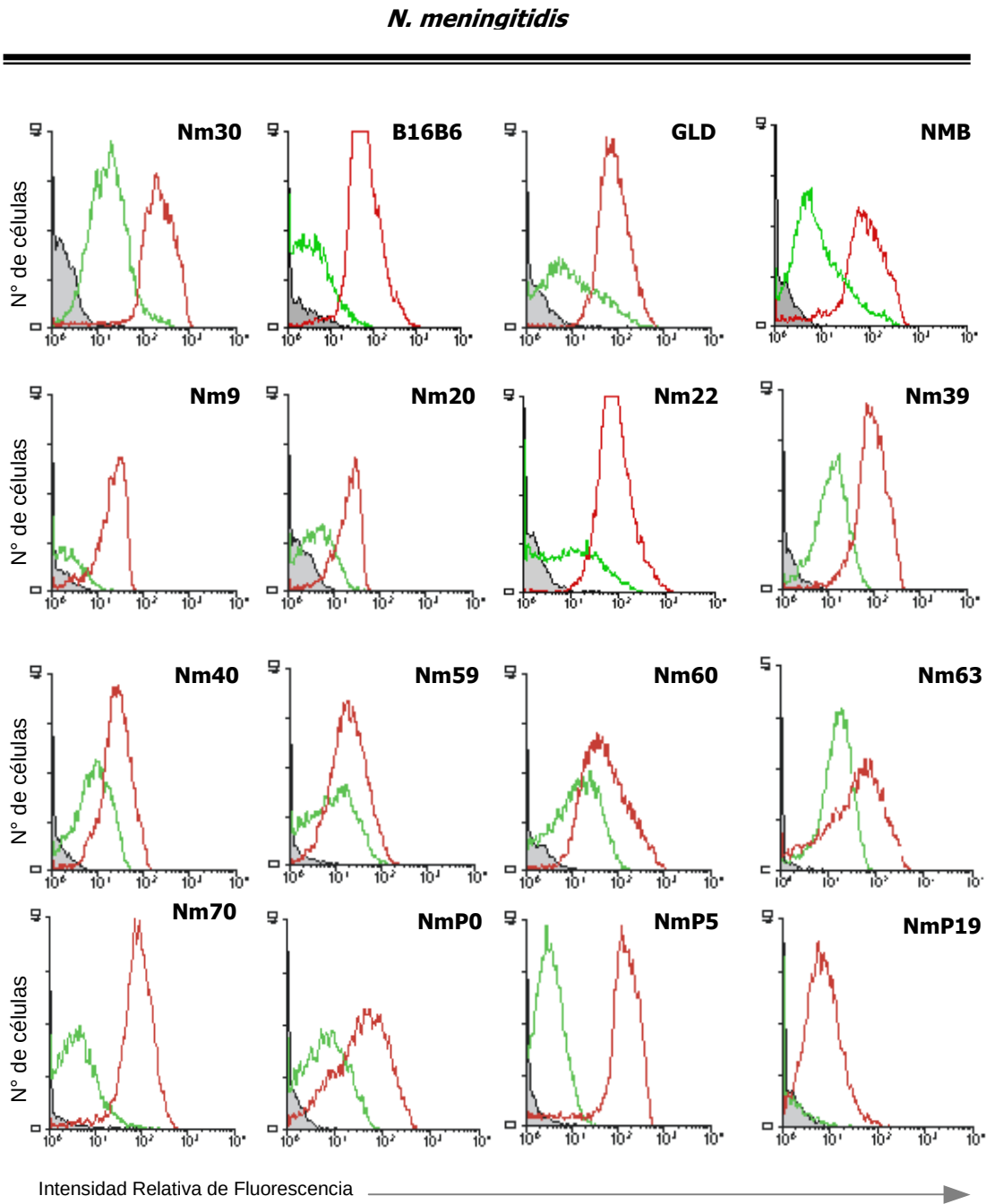
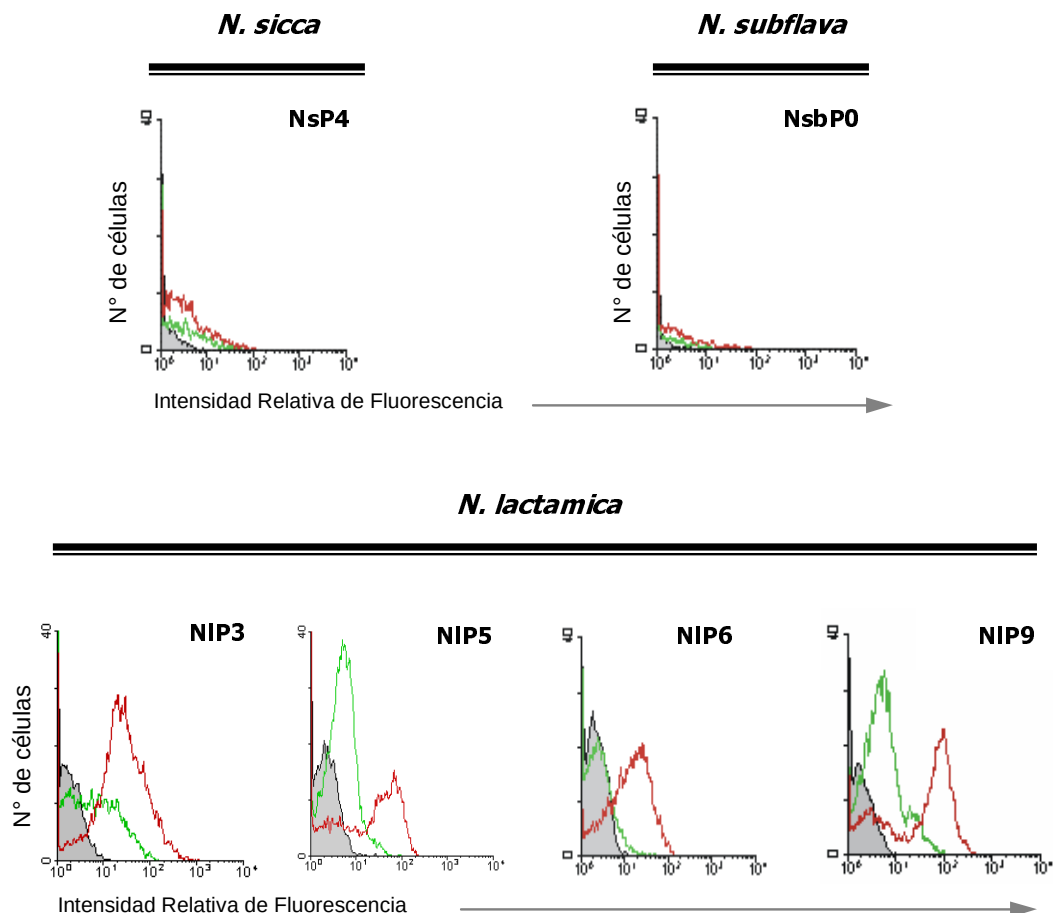


Figura 18.- bis Reactividad de los sueros de conejo anti-P47 (línea verde), anti-OMVs de la cepa Nm30 (línea granate) y suero no inmune (sombreado) frente a células fijadas con formaldehído de diferentes cepas de *N. sicca*, *N. subflava* y *N. lactamica* analizada en FCM. Dilución de trabajo 1×10^{-3} .

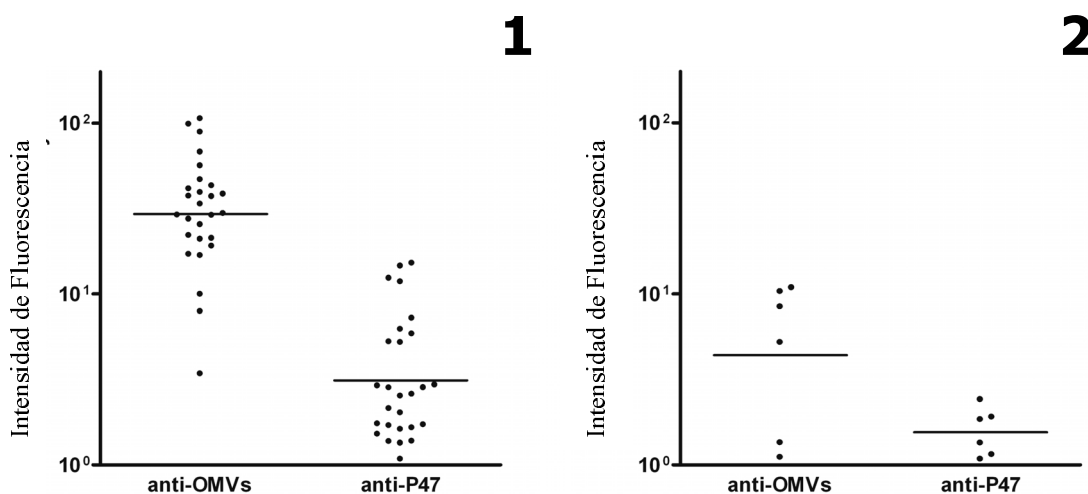


Los resultados globales obtenidos indican que existe unión específica y muy variable del suero anti-P47 a todas las cepas de *Neisseria*, excepto las cepas *N. meningitidis* Nmp19 y *N. lactamica* NIP6 donde su unión fue similar al suero no inmune. Por otra parte, la unión es aparentemente menor en las cepas comensales, especialmente en *N. sicca* y *N. subflava*, donde, y al igual que las anteriores, también es muy similar a la del suero no inmune.

4.4 Cuantificación de la reactividad de la totalidad de la población

La cuantificación de la unión de los sueros de conejo anti-P47 y anti-OMVs de la cepa Nm30 a las distintas poblaciones se estableció mediante la media geométrica de la intensidad de fluorescencia emitida en al menos dos ensayos realizados en días diferentes. El promedio de unión de los sueros a las poblaciones de *Neisseria meningitidis* y *Neisserias* comensales se muestra en la **Figura 19**. Se observa claramente que la unión del suero anti-OMVs de la cepa Nm30 fue muy superior a la del suero anti-P47 tanto en las cepas de *N. meningitidis* como en las comensales y que las diferencias observadas entre ambas especies fueron superiores con el suero anti-OMVs de la cepa Nm30.

Figura 19.- Promedio de la intensidad de fluorescencia emitida por las poblaciones celulares fijadas con formaldehído y analizada por FCM de (1) *Neisseria meningitidis* y (2) *Neisserias* comensales con ambos sueros de conejo



Con la finalidad de comparar la heterogeneidad interpoblacional observada entre ambos sueros inmunes, esta se expresó como porcentaje de la fluorescencia emitida relativa a la cepa Nm30 (**Figura 20**). Como se observa en el apdo. 20,1 existe una similitud en la unión del suero anti-P47 en un 70% de las cepas de *Neisseria meningitidis*. No obstante, la cepa a partir de la cual se purificó la proteína (*N. meningitidis* Nm30) y otras cepas como la NMB o Nm63, entre otras, mostraron valores de intensidad superiores a la media global de todas las cepas del meningococo, mientras que cepas de la misma especie como es el caso de la B16B6 o Nm20, también entre otras, presentaron valores inferiores al resto de la población. Estos resultados se correlacionan, en parte, con lo observado en el dot blot, con algunas excepciones como es el caso de la cepa Nm9 que mostró una fuerte reactividad o la cepa Nm70 que prácticamente no mostró señal en dot blot. La reactividad del suero con las cepas comensales es comparable con la de muchas cepas de *N. meningitidis*, no observando diferencias significativas entre ambas, siendo la NIP6 la de menor unión.

La heterogeneidad del suero anti-OMVs de la cepa Nm30 no se correlacionó con la observada con el suero anti-P47 (**Figura 20,2**), aunque se mantuvieron las mismas excepciones respecto a los datos observados en el dot blot. Al comparar la media de las intensidades de fluorescencia emitidas por las cepas para ambos sueros (según los datos relativos) se observa que, proporcionalmente la unión del suero anti-P47 es considerablemente mayor que la del suero anti-OMVs de la cepa Nm30, tanto en *N. meningitidis* como en las *Neisserias* comensales.

La cuantificación de la variabilidad intrapoblacional se expresó mediante el coeficiente de variación indicado en la **Figura 21**. Los datos indican diferencias importantes entre los aislados, las cepas más reactivas mostraron menor variabilidad intrapoblacional y viceversa, excepto en las cepas Nm9, Nm20, Nm21,

NmP3 y NmP19 donde fue superior respecto a otras de unión similar, resultado no observado con el suero anti-OMVs de la cepa Nm30. La variabilidad intrapoblacional con este último suero fue muy inferior a la observada con el suero específico anti-P47 y similar entre los aislados, independientemente de su intensidad de unión. Las cepas que mayor variabilidad intrapoblacional mostraron fueron las cepas comensales.

4.5 Análisis de la accesibilidad de la proteína P47 en FCM

Para averiguar si la heterogeneidad inter/intra poblacional era inducida por la exposición del antígeno de 47 kDa se realizaron experimentos con cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica* seleccionadas en función de su mayor o menor reactividad con el suero. Estos ensayos se orientaron a modificar la exposición del antígeno sometiendo las células a un tratamiento con agentes permeabilizantes de un modo similar al realizado en dot blotting, excepto que en este caso no se empleó cloroformo. La unión de los anticuerpos y la variación intrapoblacional se expresaron como el porcentaje de la intensidad de la fluorescencia emitida relativa a la cepa Nm30 sin permeabilizar y el coeficiente de variación, respectivamente. La accesibilidad se estudió utilizando las células permeabilizadas posteriormente fijadas con formaldehído ya que, como indica la **Figura 22**, en el 80% de los casos la reactividad de los sueros fue superior cuando las células se fijaron tras la permeabilización.

La reactividad del suero anti-P47 con las cepas *N. meningitidis* Nm30, M7 y NMB y de *N. lactamica* NIP3 y NIP9 es inferior tras la permeabilización celular (ver **Figura 23.1** y **23.2**), aunque en estas últimas la diferencia es mínima. En las restantes cepas dicho tratamiento incrementa la accesibilidad del antígeno de forma significativa ($p < 0.05$; Mann Whithney Tets). La variabilidad intrapoblacional

decreció de forma significativa en las cepas que incrementaron su reactividad al ser permeabilizadas, hecho no observado en las restantes. Los resultados observados en las cepas de *N. meningitidis* NMB, B16B6 y Nm17 coinciden con los ensayos de accesibilidad realizados en dot blots en las mismas condiciones.

El comportamiento en la reactividad con el suero anti-OMVs de la cepa Nm30 fue similar al del suero anti-P47 como indica la **Figura 23.3 y 23.4**. Las cepas formalinizadas de mayor reactividad unieron menos anticuerpos cuando se permeabilizaron y viceversa. Como puede observarse no se aprecian diferencias en la reactividad de *N. lactamica* antes o después de dicho tratamiento. La variabilidad intrapoblacional no sufrió cambios significativos al someter las células a la permeabilización.

Figura 20.- Variabilidad interproblacional en la reactividad de los sueros (1) anti-P47 y (2) anti-OMVs de la cepa Nm30 con células enteras fijadas con formaldehído de *N. meningitidis*, *N. sicca*, *N. subflava* y *N. lactamica*, expresada como porcentaje de intensidad de fluorescencia emitida relativa a la cepa Nm30 y evaluada en ensayos de citometría de flujo.

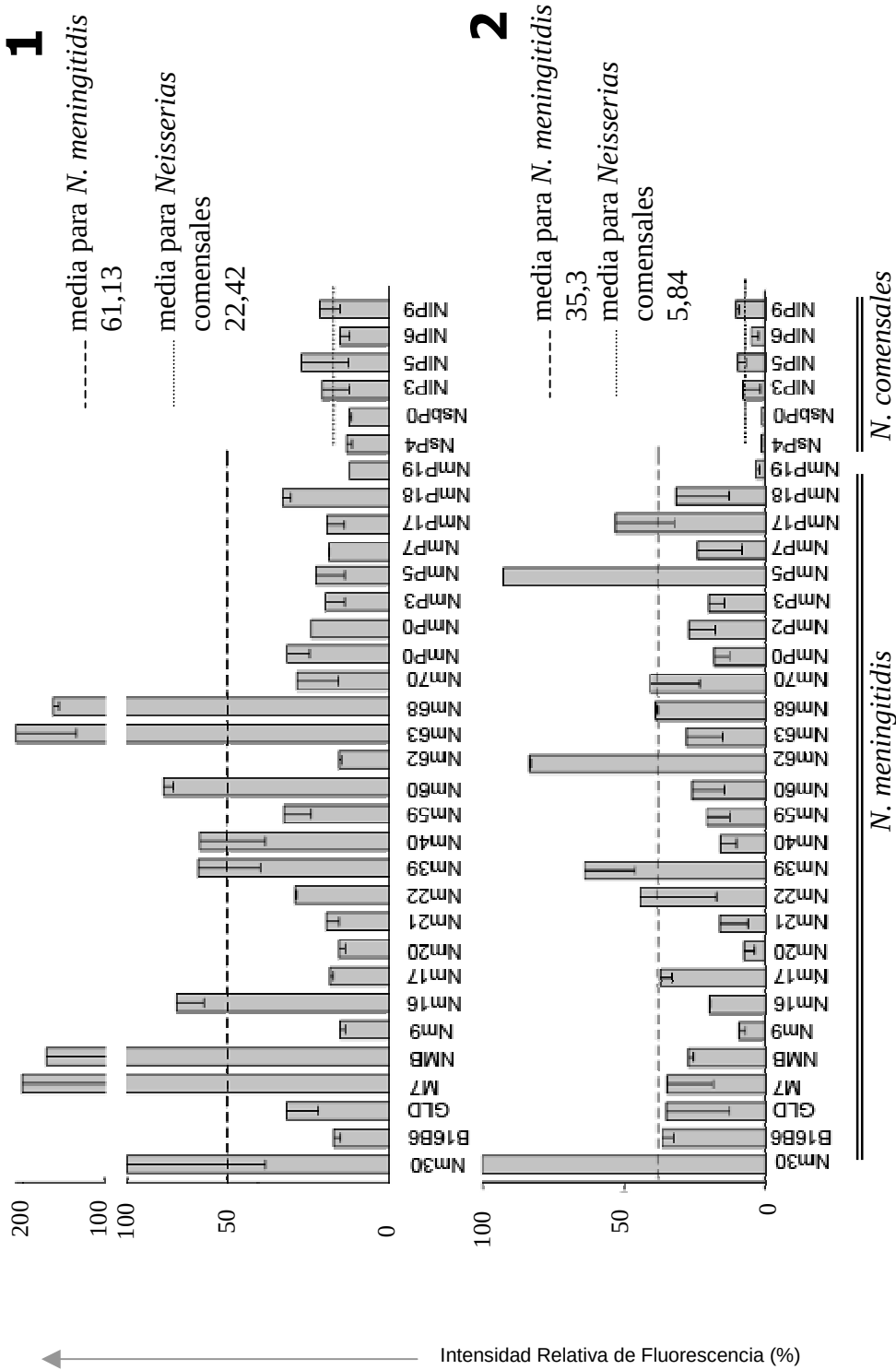


Figura 21.- Variabilidad intrapoblacional en la reactividad de los sueros (1) anti-P47 y (2) anti-OMVs a células enteras fijadas con formaldehído de *N. meningitidis*, *N. sicca*, *N. subflava* y *N. lactamica*, expresada como coeficiente de variación de la fluorescencia emitida evaluada en ensayos FCM

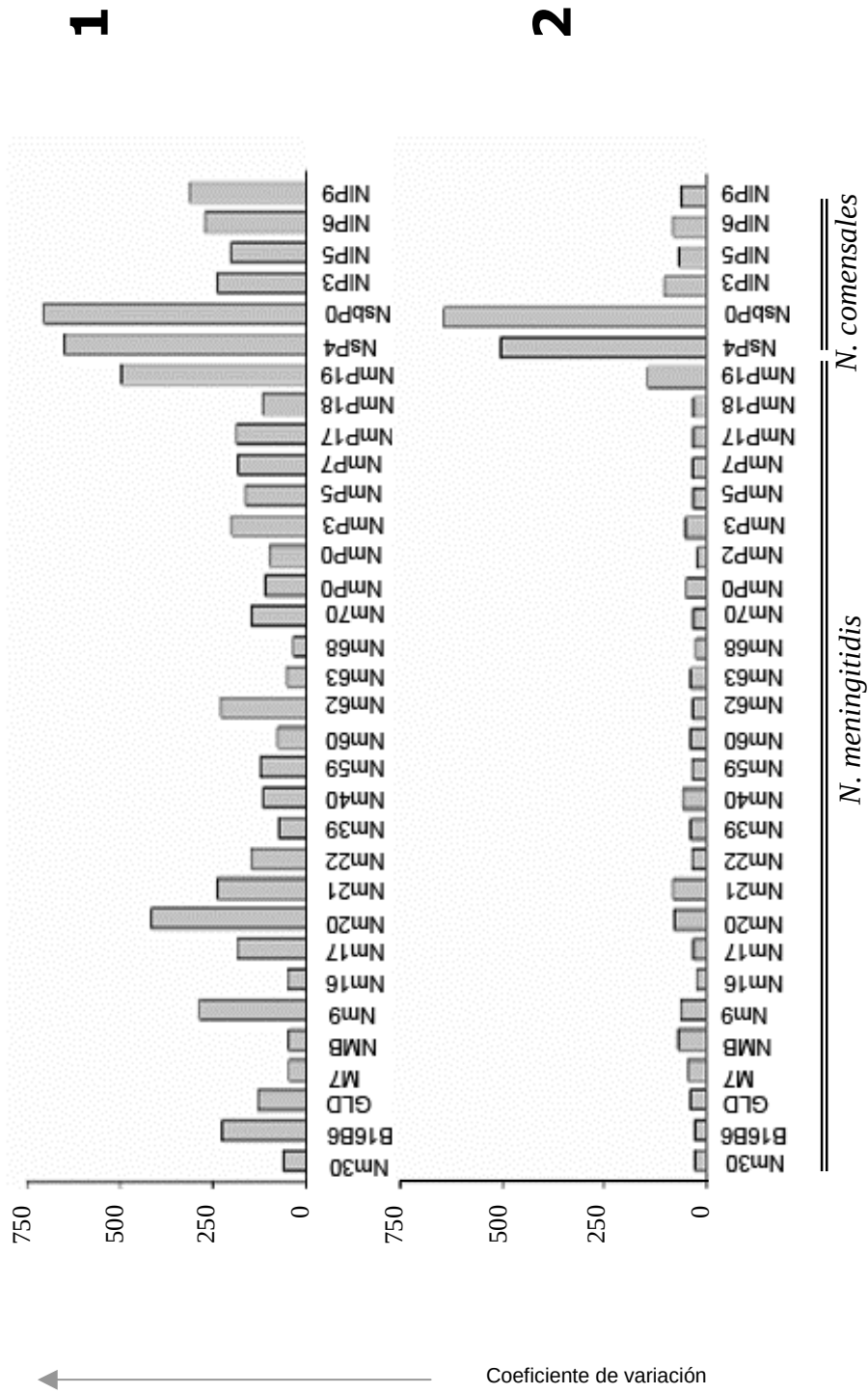


Figura 22.- Efecto de la fijación (granate) o no (azul) con formaldehído tras la permeabilización de las células de *N. meningitidis* en la unión de los sueros (1) anti P47 y (2) anti-OMVs de la cepa Nm30 expresada como la intensidad de fluorescencia en ensayos FCM

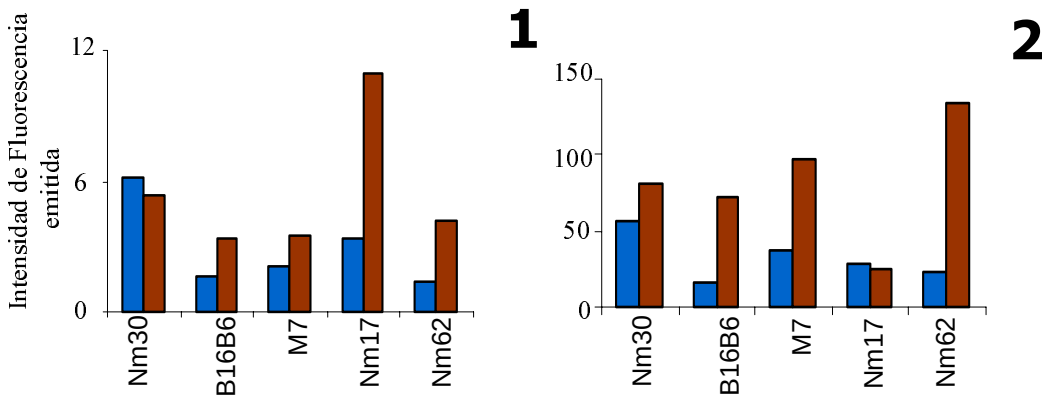
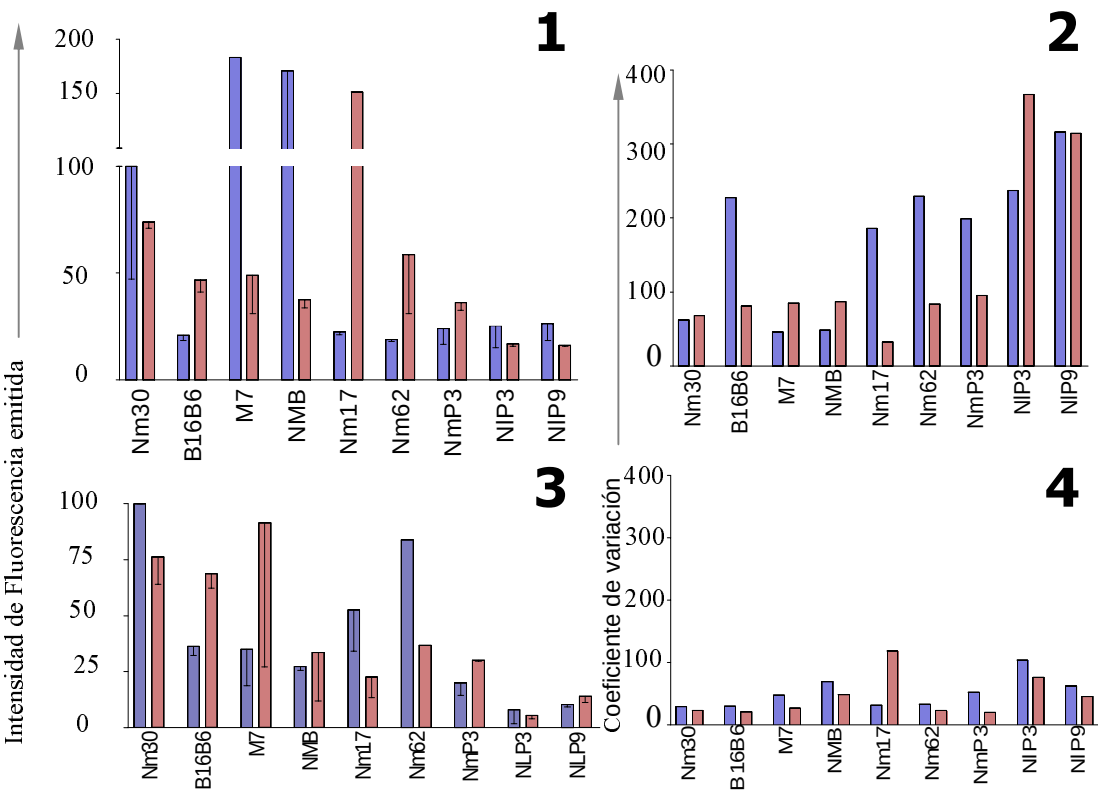


Figura 23.- Diferencias en la accesibilidad del antígeno entre células enteras de *N. meningitidis* y *N. lactamica* permeabilizadas (color granate) o no (color azul) con etanol y posteriormente fijadas con formaldehído, evaluada frente a los sueros de conejo (1, 2) anti-P47 y (3, 4) anti-OMVs y expresada como porcentaje de la intensidad y coeficiente de variación de fluorescencia emitida en ensayos FCM



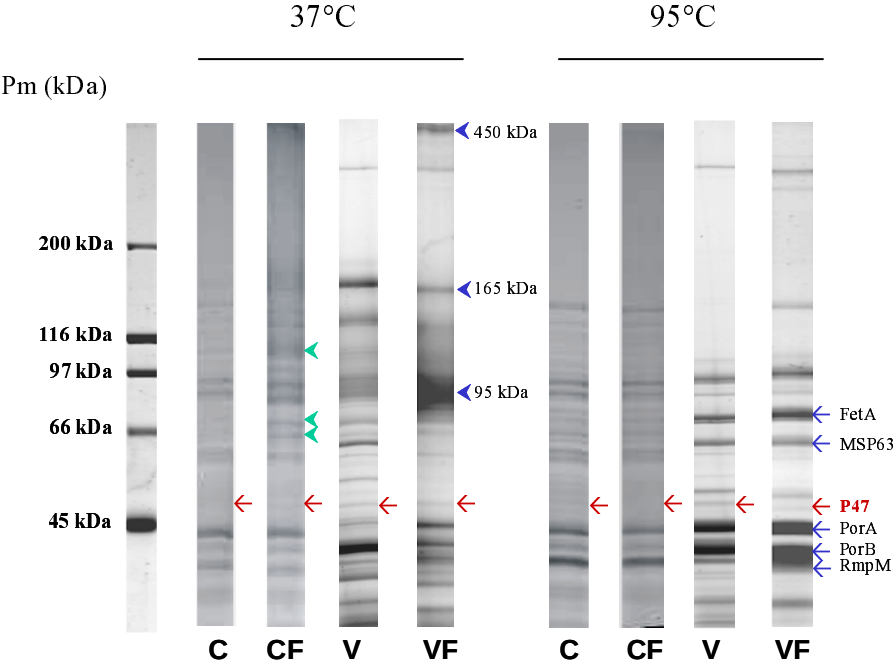
5. ENSAYOS DE “CROSSLINKING” CON FORMALDEHIDO

El comportamiento electroforético de las células enteras fijadas y no fijadas con formaldehído (**Figura 24.1**) no muestra diferencias apreciables en la proteína P47 después de los tratamientos a 37°C y 95°C. Tampoco se observaron diferencias significativas en otras proteínas, a excepción de al menos tres bandas (indicadas con una flecha verde). Sin embargo, la fijación de OMVs generó cambios significativos en el patrón electroforético tras el tratamiento de la muestra a 37°C. Así, como consecuencia de la fijación se produce la formación de tres complejos de 450, 165 y 95 kDa respectivamente. El tratamiento de la muestra a 95°C, electroforesis diagonales, la utilización sueros específicos y la identificación de proteínas por MALDI-TOF permitió identificar los principales componentes de esos tres complejos. Así, el complejo de 450 kDa está formado por unidades de la chaperonina denominada MSP63, el complejo de 165 kDa está formado principalmente por las proteínas FetA, PorA, PorB y RmpM y finalmente, el complejo de 95 kDa constituido únicamente por las proteínas PorA, PorB y RmpM. El patrón electroforético no nos permitió detectar la proteína P47 en ninguno de estos complejos.

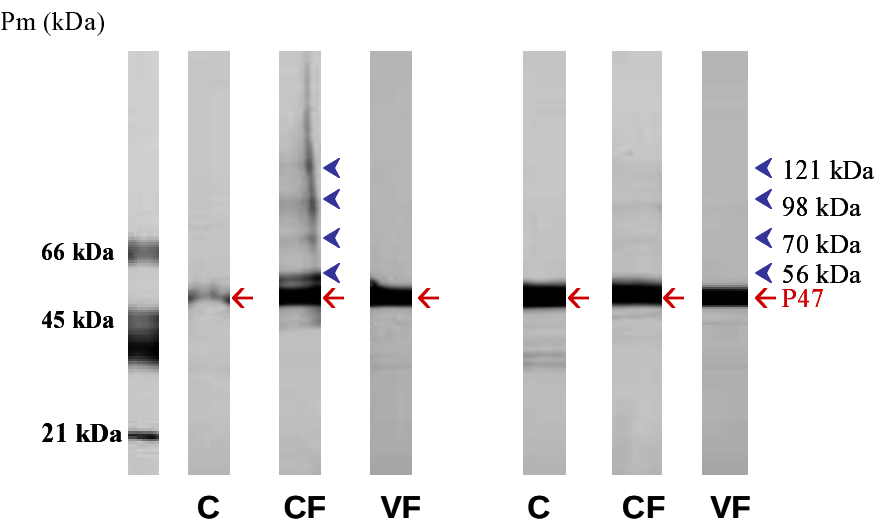
La **Figura 24.2** muestra el patrón antigénico obtenido con el suero anti-P47 tras la fijación o no con formaldehído de células enteras y OMVs. La proteína objeto de este estudio fue detectada en todos los casos si bien, únicamente en las células fijadas incubadas a 37°C el suero reaccionó con bandas de un peso molecular superior a 47 kDa y, que por lo tanto, puedan tratarse de complejos en los pueda estar implicada. Así, reaccionó principalmente con una banda de 56 kDa y de forma más débil con otras tres bandas de 121, 98 y 70 kDa respectivamente. Tras el calentamiento de la muestra a 95°C. Estas reacciones disminuyen de intensidad hasta casi desaparecer y no fueron detectadas en OMVs fijadas.

Figura 24.- Patrón electroforético de células enteras y OMVs fijadas (CF, VF) o no (C, V) con formaldehído de la cepa *N. meningitidis* Nm30 (1) tratadas previamente a 95°C y a 37°C durante 20 minutos. ←, proteína P47; <, complejos proteicos. (2) revelado con suero de conejo anti-P47 a diluición de trabajo 1x10⁻³; ←, proteína P47; <, posibles asociaciones de la P47 a otras proteínas.

1



2



6. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *p47*

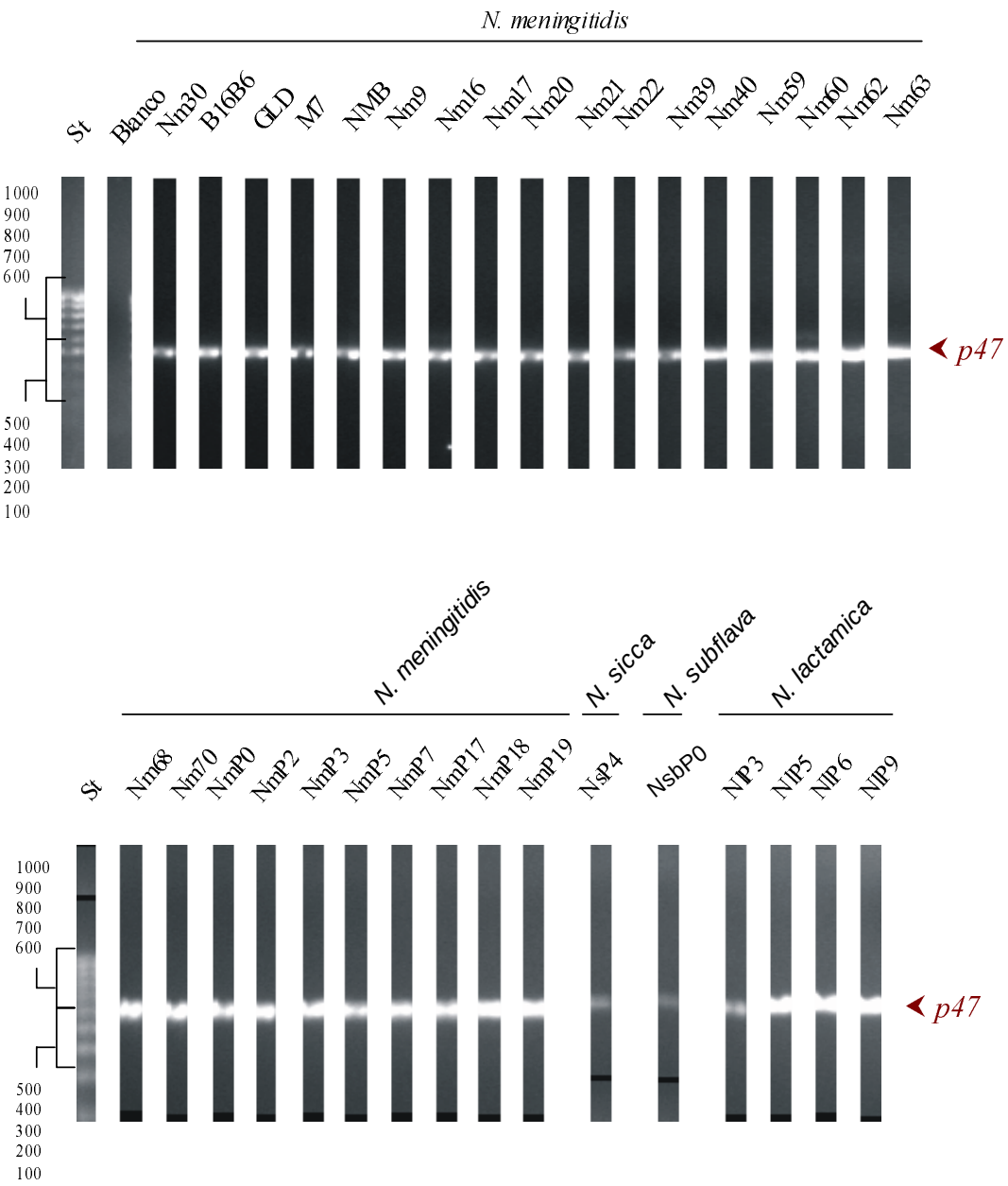
6.1 Detección del gen

Una vez identificada la proteína P47 y detectado el contexto genómico del gen que la codifica en las diferentes cepas del género *Neisseria* cuyo genoma está depositado en las bases de datos de Internet (ver apdo. 1.3), se procedió a detectar el gen mediante una reacción de amplificación en todas las cepas incluidas en este estudio. Para ello, y utilizando la secuencia del gen NMA0281 de la cepa *N. meningitidis* Z2491 (ver Mat y Met. apdo. 9), se diseñaron cebadores que hibridasen en una región interna del mismo y común entre todas las cepas.

Como se puede observar en la **Figura 25**, los cebadores P47-Left y P47-Right (detallados en la **Tabla 11** y **Figura 26**) permitieron la amplificación específica de un fragmento interno del gen *p47* de aproximadamente 500-600 pb en todas las cepas evaluadas, correspondiéndose con su tamaño teórico. No obstante, en las cepas de *N. sicca* y *N. subflava* este fragmento se caracterizó por un tamaño ligeramente superior al resto de cepas evaluadas. Estos resultados confirmaron la presencia del gen codificante para la proteína P47 en todas las cepas de estudio.

Tras diferentes ensayos, se establecieron las concentraciones óptimas de Cl_2Mg , dNTPs, y oligonucleótidos en: 1,5 mM, 10 μM y 0,8 μM , respectivamente. Las unidades de BioTaq y la cantidad de ADN determinadas como óptimas fueron de: 1 y 0,25 μl respectivamente por cada 10 μl finales. En la **Tabla 12** se recogen las condiciones óptimas de anillamiento que permitieron la amplificación específica del fragmento esperado.

Figura 25.- Detección del gen *p47* en cepas de *N. meningitidis*, *N. sicca*, *N. subflava* y *N. lactamica* mediante amplificación por PCR con los cebadores P47 Right y P47 Left y análisis del producto mediante electroforesis en geles de agarosa



6.2 Optimización del ensayo de secuenciación

La secuencia completa del gen *p47* en las diferentes cepas estudiadas se obtuvo mediante la amplificación y posterior secuenciación de cinco fragmentos superpuestos del gen con un tamaño no superior a 600 pares de bases. Los distintos cebadores utilizados para la amplificación de cada uno de esos fragmentos en las condiciones previamente establecidas se recogen en la **Tabla 11** y **Figura 26**. Con objeto de amplificar los extremos del gen fue necesario diseñar cebadores que hibridasen en las regiones nucleotídicas flanqueantes al mismo (gen NMA0280, región no codificadora y gen NMA0282). Los distintos fragmentos fueron denominados, basándose en su localización en sentido 3'→5' en el gen NM0281, como: P47.1, P47.1-2, P47.2, P47.3 y P47.4 (ver **Tabla 12**). Como queda reflejado en dicha tabla, para amplificar los fragmentos P47.1, P47.2 y P47.3 se utilizó la misma pareja de cebadores en cada caso para todas las cepas de estudio, mientras que para amplificar el fragmento P47.1-2 se utilizaron tres parejas de cebadores dependiendo de la especie de *Neisseria* y, para amplificar el fragmento P47.4 fueron necesarias hasta cinco parejas de cebadores dependiendo de las cepas de origen del ADN.

Las concentraciones óptimas de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción son las mismas que las indicadas en el apdo. 6.1, no obstante, la temperatura óptima de anillamiento para cada pareja de cebadores varió en función de la cepa de origen del ADN.

En la **Figura 27** y **28** se muestra el patrón electroforético más representativo de los productos de amplificación de diversos fragmentos del gen *p47* con distintos cebadores.

Tabla 11.- Características de los cebadores utilizados para la detección (Det) y secuenciación (Sec) del gen *p47* en las cepas utilizadas en el presente estudio

Cebadores	Secuencia Nucleotídica 5' → 3'	Localización ^a	Aplicación	Fragmento amplificado ^b (pb)
P47-Left	gttgccggcggaatacgaatgactt	322-348	Det	514
P47-Right	gacgcgccgccgaccacctt	815-804	Det	
P47-1 Left	gtgtgtctgtcgcgcgatttttc	(-)146-(-)124	Sec	380
P47-1 Right	gcttgccggccgctgttgttttta	233-210	Sec	
P47-1-2 Left	agtatgcccgtaacgaca	138-156	Sec	228
P47 -1-2 Right	attggtcaaaagaccgcaag	365-346	Sec	
P47 1-2b Left	ctgcgaacctggaact	161-178	Sec	136
P47 1-2b Right	acggtcattttgtcggaaag	304-284**	Sec	*
P47 1-2c Left	gagccgatggaactgactgt	390-410**	Sec	127
P47-2 Left	gccgcaagctcgaatgggaaac	225-247	Sec	228
P47-2 Right	cggcgagcggttgggacagtt	453-433	Sec	
P47-3 Left	ttgccggcggaatacgaatgact	323-347	Sec	512
P47-3 Right	gacgcgccgccgaccac	815-801	Sec	
P47-4 Left	aaagatgccggrtttacyg	665-682	Sec	993
P47-4 Right	aggcgcacataatcgaaaa	(+)283- (+)263	Sec	
P47-4c Left	gaaggaaattgcagcgaac	737-756	Sec	515
P47 4d Left	gacgactgttgataaccatgc	643-644	Sec	486
P47-4A Right	attaaccgatagcgcaggt	(+)208- (+)188	Sec	638
P47-4b Right	gcaatgccgtactgttttt	(+)83- (+)63	Sec	*
P47-4H Left	agcttttgarcgaactcgac	602-621	Sec	1304
P47-4H Right	gcgggtgtgttgatgatgty	(+)739- (+)719	Sec	

a. número de nucleótidos referido a la secuencia NMA0281 publicada de *N. meningitidis* Z2491 desde el inicio del gen; número de nucleótidos anteriores (-) y posteriores (+) al gen en sentido 5' →3'. ** Calculado según la secuencia de *N sicca* NsP4

b. Tamaño del fragmento amplificado según las combinaciones de cebadores expuestas en la **Tabla 12**. *El tamaño del fragmento esperado varía según el primer Left utilizado

Tabla 12.- Combinación de cebadores y temperatura óptima de anillamiento para la amplificación específica de fragmentos del gen *p47*

Cebadores	Tª anillamiento	Fragmento amplificado	Cepas
P47- Left P47- Right	67°C		<i>N. meningitidis</i> , <i>N. lactamica</i> , <i>N. sicca</i> y <i>N. subflava</i>
P47-1 Left P47-1Right	60°C	P47.1	<i>N. meningitidis</i> , <i>N. lactamica</i> , <i>N. sicca</i> y <i>N. subflava</i>
P47-2 Left P47-2 Right	68°C 64°C	P47.2	<i>N. meningitidis</i> (excepto NmP7), <i>N. lactamica</i> , <i>N. sicca</i> y <i>N. subflava</i> <i>N. meningitidis</i> NmP7
P471-2 Left P47 1-2 Right	61°C	P47.1-2	<i>N. meningitidis</i> y <i>N. lactamica</i>
P471-2b Left P471-2b Right	61°C	P47.1-2	<i>N. subflava</i>
P471-2c Left P471-2b Right	61°C	P47.1-2	<i>N. sicca</i>
P47-3 Left P47-3 Right	68°C 69°C	P47.3	<i>N. meningitidis</i> (excepto Nm22, Nm40 y Nm59), <i>N. lactamica</i> , <i>N. sicca</i> y <i>N. subflava</i> <i>N. meningitidis</i> Nm22, Nm40 y Nm59
P47-4 Left P47-4 Right	56°C	P47.4	<i>N. meningitidis</i> GLD, M7, NMB, Nm16, Nm22, Nm68 y NmP17
P47-4c Left P47 4b Right	58°C	P47.4	<i>N. meningitidis</i> Nm62, Nm63, NmP0, NmP2, NmP3, NmP5, NmP7, NmP18 y NmP19
P47-4c Left P47-4A Right	58°C	P47.4	<i>N. meningitidis</i> Nm59, Nm60 y Nm70
P47-4H Left P47-4H Right	63°C	P47.4	<i>N. meningitidis</i> Nm30, B16B6, Nm9, Nm17, Nm20, Nm21, Nm39 y Nm40; <i>N. lactamica</i>
P47-4d Left P47-4b Right	56°C	P47.4	<i>N. sicca</i> y <i>N. subflava</i>

Como puede verse en la **Figura 27,1 y 27,3**, las condiciones para la amplificación de los fragmentos P47.1 y P47.2 de 380 y 228 pb, respectivamente, permitieron la obtención de un producto altamente específico y de un tamaño similar al esperado en todas las cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica* (ver **Figura 27,1 y 27,3**). No obstante, si bien la amplificación de dichos segmentos en *N. sicca* y *N. subflava* también fue específica, el tamaño del segmento P47.1 en estas cepas fue superior al resto.

Como indican las **Figuras 27 y 28** la amplificación del resto de fragmentos (P47.1-2, P47.3 y P47.4) no fue específica en todas las cepas utilizadas pese a modificar las condiciones de la reacción de PCR, a excepción del fragmento P47.4 amplificado con los cebadores P47-4A Left y P47-4b Right y P47-4H Left y P47-4H Right (ver **Figura 28.2 y 28.4**). En las cepas que presentaron inespecificidades o bien, se purificó el fragmento de interés y se realizó con éste una segunda amplificación para obtener mayor cantidad de producto, o bien, se purificó el fragmento y se secuenció directamente. Respecto al tamaño de los fragmentos amplificados, los fragmentos P47.1-2 y P47.3 fueron idénticos en todas las cepas correspondiéndose aproximadamente con el tamaño esperado, a excepción del fragmento P47.3 amplificado de las cepas *N. sicca* y *N. subflava* que fue ligeramente superior al resto en función de la concentración de agarosa del gel utilizado (ver **Figura 27,4**). Por otra parte, el tamaño del fragmento P47.4 amplificado presentó un tamaño menor al esperado en las cepas M7 y NMB cuando se utilizaron los cebadores P47-4H Left y P47-4H Right (ver **Figura 28.3**).

En la **Figura 29** se recoge la secuencia nucleotídica de diferentes cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica* que representan todos los alelos del gen observados en estas especies.

Figura 27.- Perfil electroforético del producto de PCR de los fragmentos P47.1, P47.1-2, P47.2 y P47.3 en cepas de *N. meningitidis*, *N. sicca*, *N. subflava* y *N. lactamica*. Amplificación con los cebadores (1) P47-1 Left y P47-1 Right, (2) P47-1-2 Left y P47-1-2 Right (3) P47-2 Left y P47-2 Right, (4) P47-3 Left y P47-3 Right. St, estándares de oligonucleótidos. <, Fragmento esperado y utilizado para la secuenciación, <-, fragmentos inespecíficos

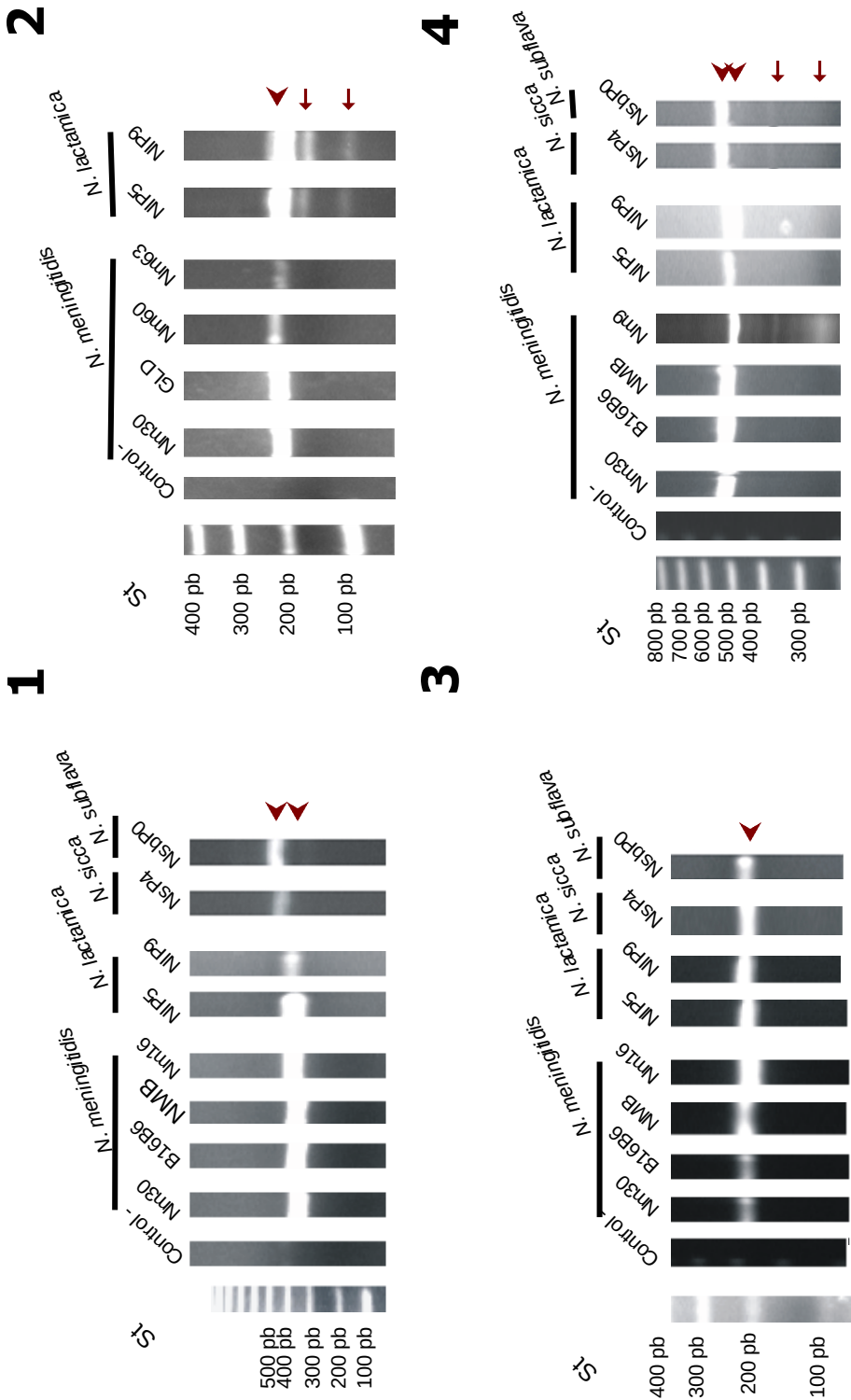
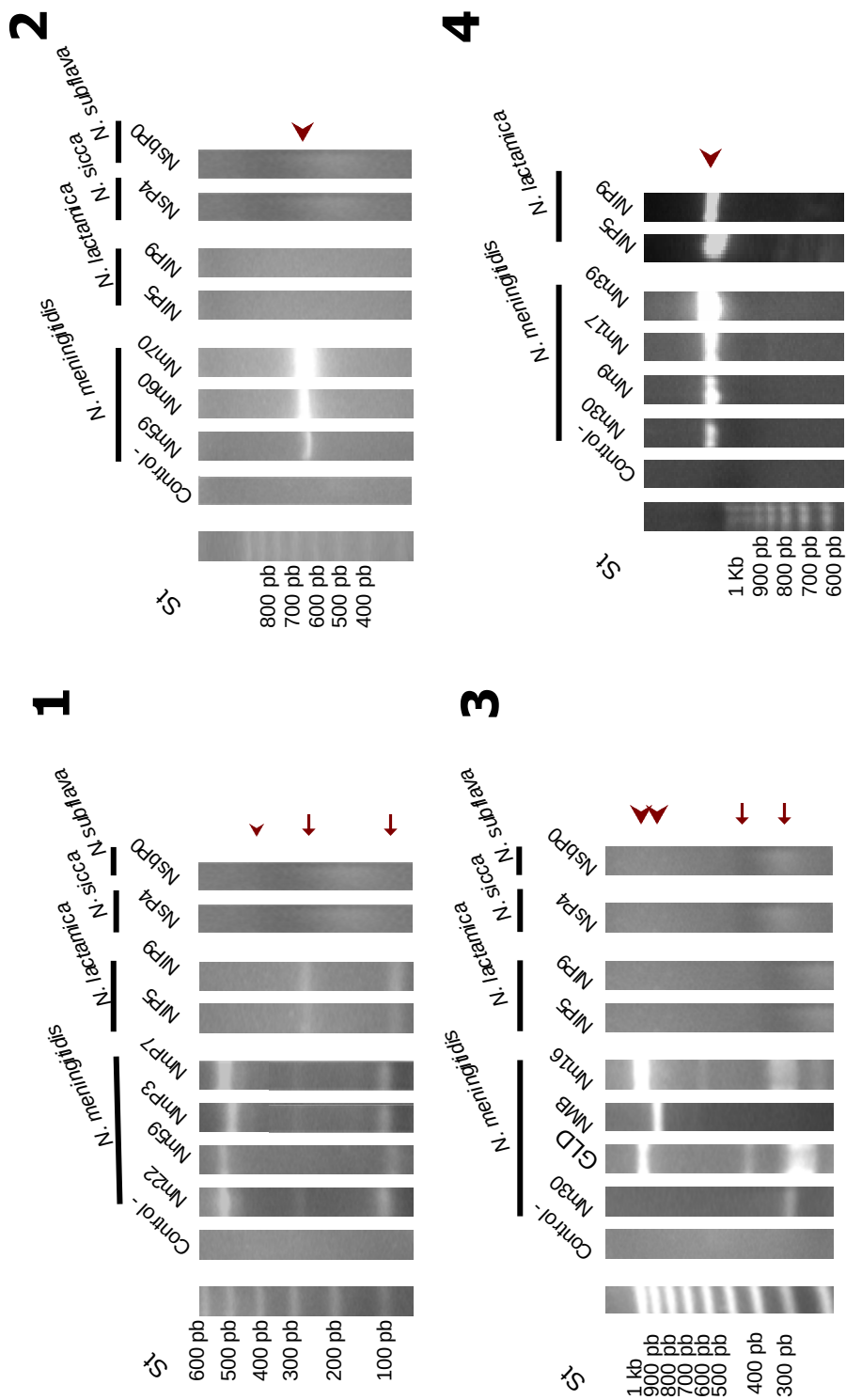


Figura 28.- Perfil electroforético del producto de PCR del fragmento P47.4 en cepas de *N. meningitidis*, *N. sicca*, *N. subflava* y *N. lactamica*. Amplificación con los cebadores (1) P47-4c Left y P47-4b Right, (2) P47-4c Left y P47-4b Right, (3) P47-4 Left y P47-4 Right, (4) P47-4H Left y P47-4H Right. St, estándares de oligonucleótidos. ◀, Fragmento esperado y utilizado para la secuenciación, ←, fragmentos inespecíficos

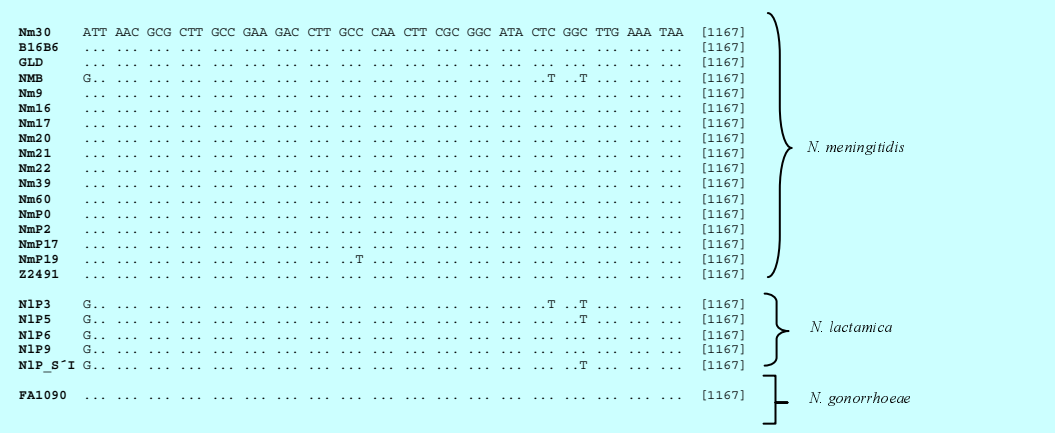


de las cepas *N. meningitidis* Z2491 y MC58 y *N. gonorrhoeae* FA1090 (obtenidas de las bases de datos del *genbank*) y una *N. lactamica* NII I'S (secuenciada por el Sanger's Institute)

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

[illegible]

Figura 29.- bis Secuencia completa del gen *p47* en distintas cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica* incluidas en el presente estudio y de las cepas *N. meningitidis* Z2491 y MC58 y *N. gonorrhoeae* FA1090 (obtenidas de las bases de datos del *GenBank*) y una *N lactamica* NII'S (secuenciada por el Sanger's Institute)



6.3 Análisis de la microheterogeneidad genética

La comparación de las distintas secuencias del gen *p47*, incluidas las disponibles en Internet (29 de *N. meningitidis*, 5 de *N. lactamica* y 1 de *N. gonorrhoeae*) indicó la existencia de 23 alelos diferentes, de los cuales 17 correspondieron a *N. meningitidis*. La composición nucleotídica de dichos alelos y las cepas portadoras de los mismos se indican en la **Tabla 13**, la similitud entre ellos y su agrupación en 7 clases o grupos se representa gráficamente en la **Figura 30** mediante un árbol filogenético. Globalmente, entre los 23 alelos el grado de similitud está comprendido entre el 99,9% y el 94,4%. Entre los alelos encontrados en *N. meningitidis* el grado de similitud fue desde el 99,9% al 95,4% y entre los de *N. lactamica* entre el 99,9 al 95,2%.

Como se puede observar, en las cepas de *N. meningitidis* existe una fuerte relación entre la divergencia genética de las clones bacterianos secuenciados y la divergencia de los alelos del gen *p47* que portan. Así por ejemplo, las cepas con los alelos 1 y 2 (pertenecientes al grupo A) pertenecen al complejo ST-32 y los alelos del 11 al 16 (pertenecientes a los grupos D y E) al ST-8. No obstante, el alelo con mayor diferencia entre las *N. meningitidis* es el 17 (grupo F) cuya cepa portadora pertenece al complejo ST-8 (grupo F) igual que los alelos del grupo D y E, con un grado de similitud menor que otros.

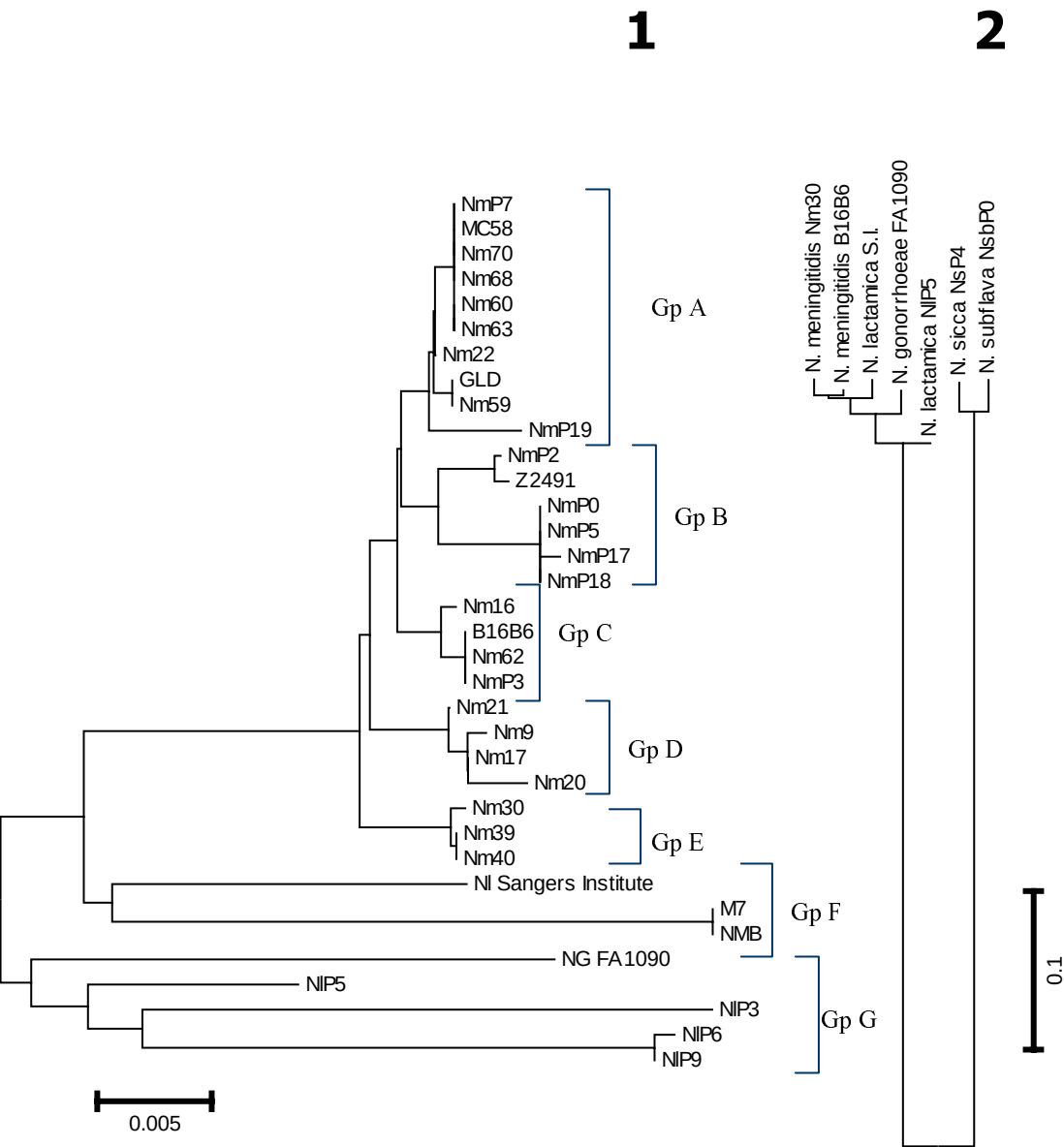
Globalmente, los alelos del gen *p47* en las cepas de *N. lactamica* presentaron mayor divergencia entre sí respecto a los de *N. meningitidis*, siendo el alelo 18 el más divergente entre ellos y próximo a las cepas *N. meningitidis* NMB y M7 (cepa secuenciada por el Instituto Sanger's). La cepa de *N. gonorrhoeae* mostró claras diferencias respecto a la mayoría de cepas de *N. meningitidis*, y resultó más cercano a *N. lactamica* (grupo G). No obstante, el grado de similitud del gen es bastante superior entre las especies hasta ahora indicadas con *N. meningitidis* que con *N. sicca* y *N. subflava* como indican los árboles realizados con las primeras 650 pb iniciales (ver **Figura 30,2**).

Tabla 13.- Relación de cepas portadoras de los distintos alelos del *gen p47*, grupos alélicos, y variantes proteicas pertenecientes a las especies de *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *N. gonorrhoeae*

Alelo <i>p47</i>	Grupo alélico ^a	Composición Nucleotídica (%)					Variantes proteicas ^b		Cepas Portadoras	ST	Complejo clonal	Especie
		T(U)	C	A	G							
1	A	18.4	26.3	27.8	27.4	I			NmP7 y Nm63	ST-33	ST32, ET5	<i>N. meningitidis</i>
2		18.3	26.4	27.8	27.4				MC58			
3		18.3	26.4	27.8	27.5				Nm70	ST-639	ST32, ET5	
4		18.5	26.4	27.6	27.5	II			Nm60 y Nm68	ST-5367	ST32, ET5	
5		18.3	26.3	28.0	27.3				Nm22	ST-32,	ST32, ET5	
6		18.3	26.4	28.0	27.3				GLD	ST-214,	ST11, ET37	
7	B	18.6	26.1	27.9	27.3	III			Nm59	ST-289,	ST22	
8		18.6	26.1	27.8	27.4				NmP19	ST-823,	ST198	
9		18.6	26.1	27.8	27.4				NmP2	ST-5365,	ST254	
10	C	18.4	26.2	27.8	27.5	IV			Z2491			
11		18.3	26.3	27.8	27.6				NmP0 y NmP18	ST-22,	ST22	
12		18.2	26.5	27.8	27.6				NmP5	ST-1251		
13	D	18.3	26.4	27.8	27.6	I			NmP17	ST-5366	ST22	
14		18.3	26.3	27.8	27.6				Nm16	ST-33	ST32, ET5	
15		18.6	26.4	27.7	27.3				B16B6	ST11	ST11, ET-37	
16	E	18.5	26.5	27.7	27.3	II			Nm62	ST-1287	ST11, ET37	
17		18.9	25.9	27.9	27.3				NmP3	ST-11	ST11, ET37	
18		17.7	27.1	27.7	27.6				Nm21	ST-8,	ST8, A4	
19	F	18.9	26.5	27.8	26.8	VI			Nm9	ST-8,	ST8, A4	
20		17.8	27.1	27.9	27.2				Nm17	ST-8,	ST8, A4	
21		18.6	26.7	27.9	26.7				Nm20	ST-8,	ST8, A4	
22	G	18.6	26.7	28.0	26.6	VII			Nm30	ST-8,	ST8, A4	
23		17.8	27.4	27.7	27.1				Nm39 y Nm40	ST-8,	ST8, A4	
									NMB y M7	ST-4609,	ST8, A4	
						VIII			Sanger's Institute	ST 640		
									NIP3			
									NIP5			
						IX			NIP6			
									NIP9			
									FA1090			
						X						
						XI						
						XII						
						XIII						

a. Los grupos alélicos han sido calculados según el grado de similitud entre distintos alelos. b. Las variantes proteicas fueron obtenidas y calculadas tal y como se describe en el apdo. 7.1

Figura 30.- Similitud del gen *p47* secuenciado completamente (1) en distintas cepas de *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *N. gonorrhoeae* y (2) del gen *p47* secuenciado parcialmente (1-650 nt) en distintas especies del genero *Neisseria* representadas mediante árboles filogenéticos realizados por el método de Neighborg-Joining. En corchetes se representan los grupos alélicos calculados en función de la similitud entre alelos



7. PREDICCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA PROTEÍNA P47

7.1 Estructura primaria: análisis de microheterogeneidad

El análisis de la secuencia primaria de los alelos identificados del gen *p47* indicó la existencia de 13 variantes proteicas. La relación entre los distintos alelos que codifican para cada variante están indicados en la **Tabla 13** y el grado de similitud entre las mismas, analizada mediante un árbol filogenético en la **Figura 31**. El grado de similitud entre todas las variantes identificadas estuvo comprendido entre el 99,7% y el 95,4%. Entre las variantes de *N. meningitidis* la similitud fue desde el 99,7% al 97,4%, mientras que entre las de *N. lactamica* desde el 99% al 97,7%. Estos datos indican que la mayoría de los cambios nucleotídicos no provocan cambios en las secuencias de aminoácidos.

La secuencia aminoacídica deducida en cepas representativas de dichas variantes se recoge en la **Figura 32**.

Como se puede ver en la tabla, existe una fuerte correlación entre el complejo clonal de las cepas secuenciadas y la variante proteica de P47 que expresan, indicando que, principalmente, cepas con una mayor proximidad genética codifican la misma variante. No obstante, algunas cepas de un mismo complejo clonal expresan variantes proteicas diferentes (ver complejos clonales ST-22 y ST-8) y viceversa (ver variante II y IV).

Los cambios aminoacídicos entre las distintas variantes se distribuyen a lo largo de toda la secuencia proteica. No obstante, existen una serie de regiones conservadas de pequeña longitud (inferiores a 30 aminoácidos) y dos regiones con una longitud superior:

- ➡ **R1**: del aminoácido 1 al 30
- ➡ **R2**: del aminoácido 75 al 125

Si excluimos del análisis la variante correspondiente a *N. gonorrhoeae*, encontramos dos regiones conservadas en *N. meningitidis* y *N. lactamica*:

- **R3**: del aminoácido 136 al 176
- **R4**: del aminoácido 255 al 322

Figura 31.- Similitud de las variantes deducidas de la proteína P47 en distintas cepas representadas mediante árboles filogenéticos realizados por el método de Neighbor-Joining

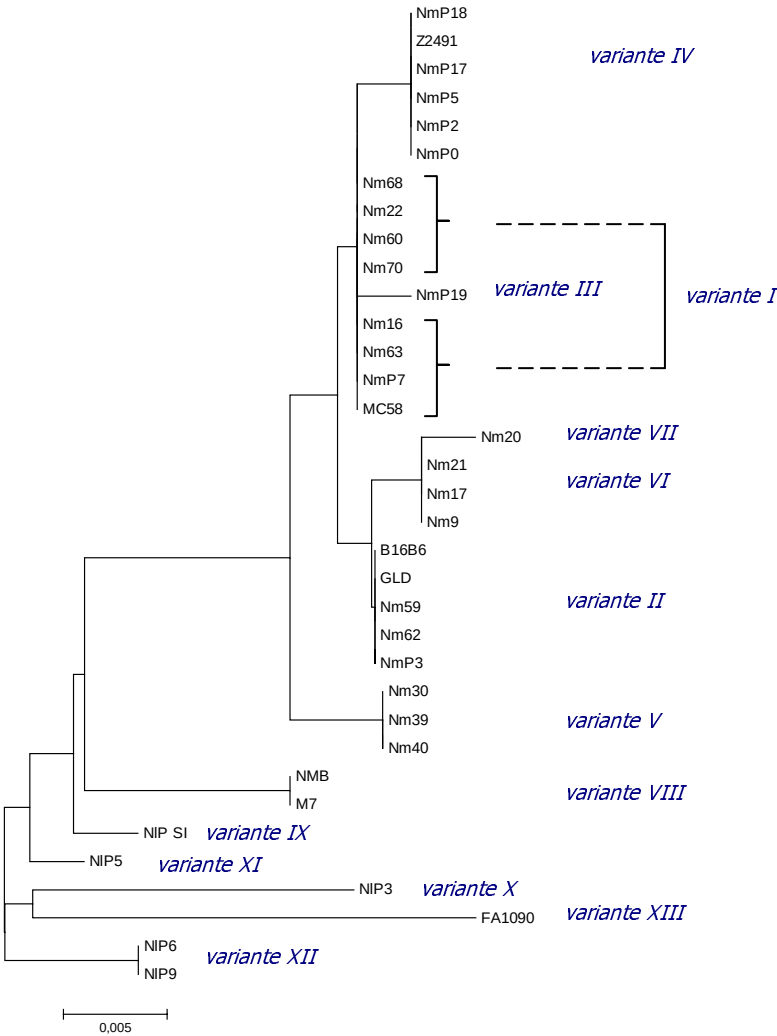


Figura 32.- Secuencia completa de la proteína P47 en distintas cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica* incluidas en el presente estudio y de las cepas *N. gonorrhoeae* FA1090 (obtenida del *GenBank*) y *N. lactamica* NII I 'S (secuenciada por el Sanger 's Institute)

Nm30	MRKFNLTLALS	VMLALGLTAC	QPPEAEKAAP	AASGETOSAN	EGGSVSIAVN	DNACEPMELT	VPSGQVVFNI	KNSGRKLEW	EILKGVNVVD	ERENIAPGLS	[100]
GLD				A..T..	..A.....						[100]
NMB				A..A..	..A.....						[100]
Nm9				A..T..	..A.....						[100]
Nm16				A..T..	..A.....						[100]
Nm20			V..A..T..	A..T..	..A.....						[100]
NmP0			A..T..	A..T..	..A.....						[100]
NmP19			A..T..	A..T..	..A.....						[100]
NlPSI			A..T..	A..T..	..A.....						[100]
NlP3				S..N..	..D.....						[100]
NlP5											[100]
NlP6											[100]
FA1090				G.....	..N.....						[100]
Nm30	DKMTVTLLPG	EYEMTCGLLT	NPRGKLVVTD	SGFKDTANEA	DLEKLSOPLA	DYKAYVQGEV	KELVAKTKTF	TEAVKAGDIE	KAKSLFADTR	IHYERIEPIA	[200]
GLD				G.....						V.....	[200]
NMB									A..		[200]
Nm9											[200]
Nm16										V.....	[200]
Nm20											[200]
NmP0										V.....	[200]
NmP19										V.....	[200]
NlPSI									A..		[200]
NlP3								M.....	A..	V.....	[200]
NlP5										V.....	[200]
NlP6									A..	V.....	[200]
FA1090			A.....		P.....		A.....		A..	V.....	[200]

Figura 32.- bis Secuencia completa de la hipotética lipoproteína P47 en distintas cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica* incluidas en el presente estudio y de las cepas *N. gonorrhoeae* FA1090 (obtenida del *GenBank*) y *N. lactamica* NII 1°S (secuenciada por el Sanger´s Institute)

Nm30	ELFSELDPVI	DAREDDFDKG	AKDAGFTGFH	RIEVALWVEK	DVSGVKEIAA	KLMTDVEALQ	KEIDALAFPP	GKVVGGASEL	IEEVAGSKIS	GEEDRYSHTD	[300]	} <i>N. meningitidis</i>
GLD											[300]	
NMB				..H...		..A...					[300]	
Nm9											[300]	
Nm16											[300]	
Nm20											[300]	
NmP0											[300]	
NmP19											[300]	
NlPSI				..H...		..T...					[300]	} <i>N. lactamica</i>
NlP3	..N...			..H...		..A...					[300]	
NlP5				..H...		..T...					[300]	
NlP6				..H...							[300]	
FA1090		..C...		..H...		..T...			..A...		[300]	} <i>N. gonorrhoeae</i>
Nm30	LSDFQANVDG	SKKIVDLFRP	LIEAKNKALL	EKTDNFKQV	NEILAKYRTK	DGFETYDKLG	EADRKALQAS	INALAEDLAQ	LRGILGLK	[388]	} <i>N. meningitidis</i>	
GLD										[388]		
NMB						..S...	..P V...			[388]		
Nm9										[388]		
Nm16										[388]		
Nm20										[388]		
NmP0		..T...								[388]		
NmP19						..T...				[388]		
NlPSI						..S...	..P V...			[388]	} <i>N. lactamica</i>	
NlP3						..S...	..P V...			[388]		
NlP5						..S...	..P V...			[388]		
NlP6			..D...	..A...		..S...	..P V...			[388]		
FA1090		..A..				..S...	..P V...			[388]	} <i>N. gonorrhoeae</i>	

7.2 Estructura secundaria y patrones de reconocimiento

* Estructura secundaria

La estructura secundaria de las diferentes variantes de la proteína P47 se determinó utilizando distintos servidores disponibles en Internet (ver Mat. y Met. apdo. 10.2). En la **Figura 33** se recoge la estructura secundaria según su composición aminoacídica a partir de la variante proteica V (expresada por la cepa *N. meningitidis* Nm30), analizada por diferentes algoritmos, y se comparan las características estructurales de diversas variantes proteicas.

La estructura secundaria de la proteína comprende dos regiones principales bien definidas. La primera, que comprende los 140 primeros aminoácidos de la región NH₂ Terminal, adquiere una conformación resultante de la alternancia de diversas colas, regiones expandidas y pequeñas hélices. La segunda región, que comprende los restantes aminoácidos, adquiere una conformación principalmente en forma de hélices de distinta longitud y alternada por colas de pequeño tamaño, que probablemente varíen la dirección especial de dichas hélices.

La comparación de la estructura secundaria entre las variantes proteicas más distantes indicó la ausencia, prácticamente, de variaciones significativas en dicha estructura respecto a la variante V (expresada por la cepa Nm30). La mayoría de las modificaciones aminoacídicas suponen una variación de un 5% en el porcentaje de estructura helicoidal respecto al total.

La proteína contiene una región hidrofóbica que abarca los primeros 20 primeros aminoácidos a partir del extremo NH₂ terminal, según indica el patrón de hidrofobicidad obtenido para las distintas variantes (ver **Figura 34,1**). No se observaron diferencias en los perfiles de hidrofobicidad entre las distintas variantes proteicas. Estos 20 aminoácidos se corresponden con una región transmembrana, como indican las predicciones realizadas con el programa “DAS Predictor (**Figura 34,2**).

*** Dominios y lugares de unión**

Todos los análisis realizados sugieren que la proteína de 47 kDa puede ser una lipoproteína ubicada en la membrana externa del microorganismo.

Como se observa en la **Figura 35,1** la lipoproteína contiene una composición aminoacídica con homología con dos dominios ya identificados:

➡ DUF451

➡ COG2822

La secuencia de la lipoproteína es similar al primero de los dominios en un 65% en su extremo C Terminal. No obstante, muestra un mayor grado de similitud, en prácticamente el 90%, con el dominio COG2822. Ambos dominios están presentes en lipoproteínas, y el COG2822 parece estar relacionado con proteínas implicadas en el transporte de hierro (también indicado en apdo. 1.3).

La identificación de una región conservada de anclaje a lípidos en la membrana de procariotas entre los primeros 10-20 aminoácidos del extremo N- terminal en las bases de datos PROSITE, también confirmó la naturaleza de la molécula. La lipoproteína P47 contiene una secuencia señal para peptidasas tipo II (SpII) ubicada entre el aminoácido 19-20 en la parte N-terminal, que se considera la zona exacta de anclaje al lípido (Ver **Figura 35,2**).

Finalmente, los análisis realizados con el programa PSORT, indican una alta probabilidad de que la molécula se sitúe en la membrana externa (0,790).

Figura 33.- Predicción de la estructura secundaria a partir de la secuencia aminoacídica de la cepa Nm30 (variante V) y comparación de los porcentajes de cada estructura con las predichas para otras variantes proteicas

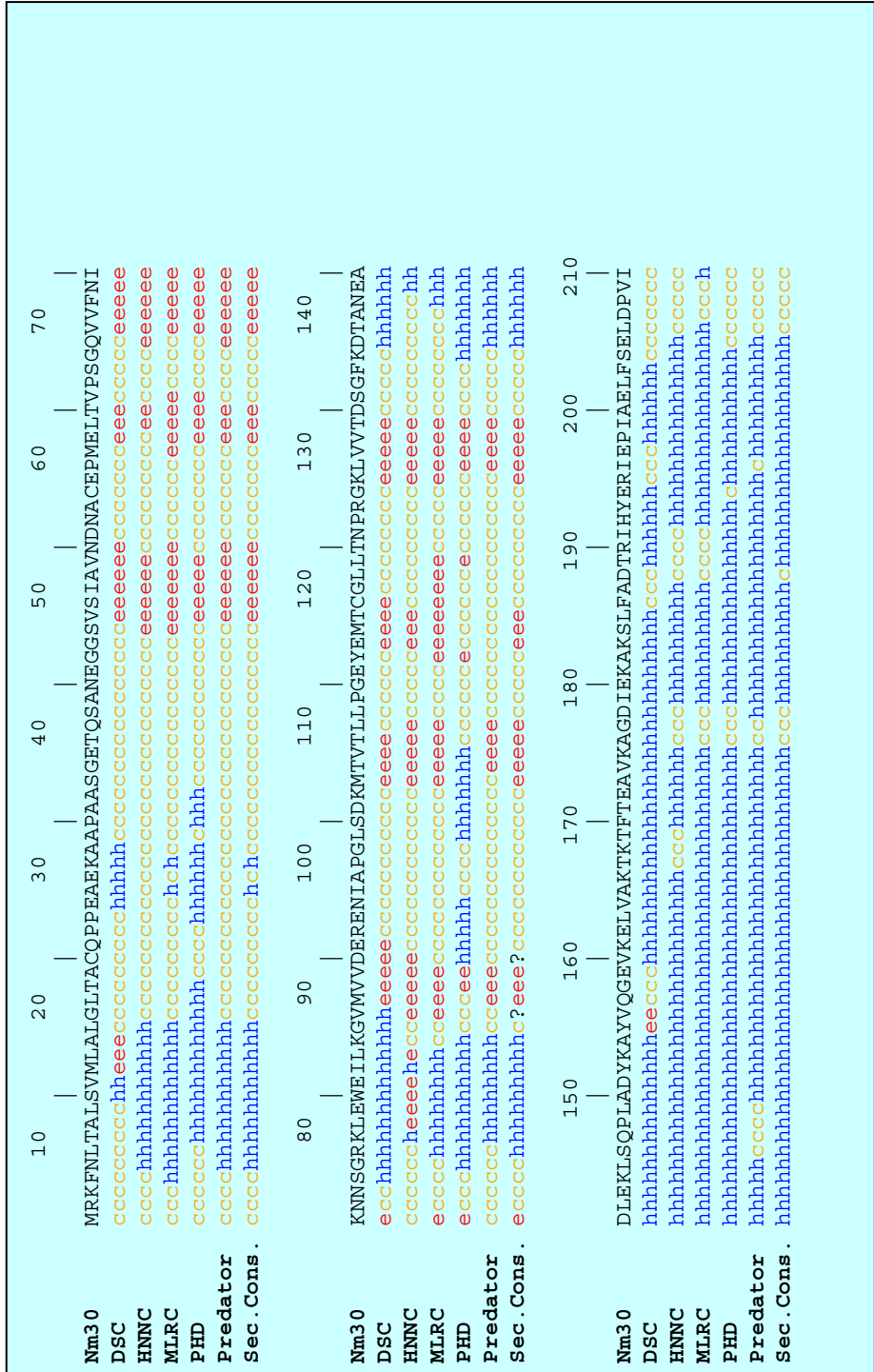


Figura 34.- (1) Perfil de hidrofobicidad realizado con el programa GenTle de diferentes secuencias aminoacídicas pertenecientes a variantes de la proteína P47. (a) Variante I, *N. meningitidis* Nm30 (b) Variante VIII, *N. meningitidis* NMB (c) Variante IX, *N. lactamica* NIP5 (d) Variante XIII, *N. gonorrhoeae* FA 1090. (2) Predicción de segmentos transmembrana mediante el servidor "DAS" en la secuencia aminoacídica de la variante V (*N. meningitidis* Nm30) de la proteína P47

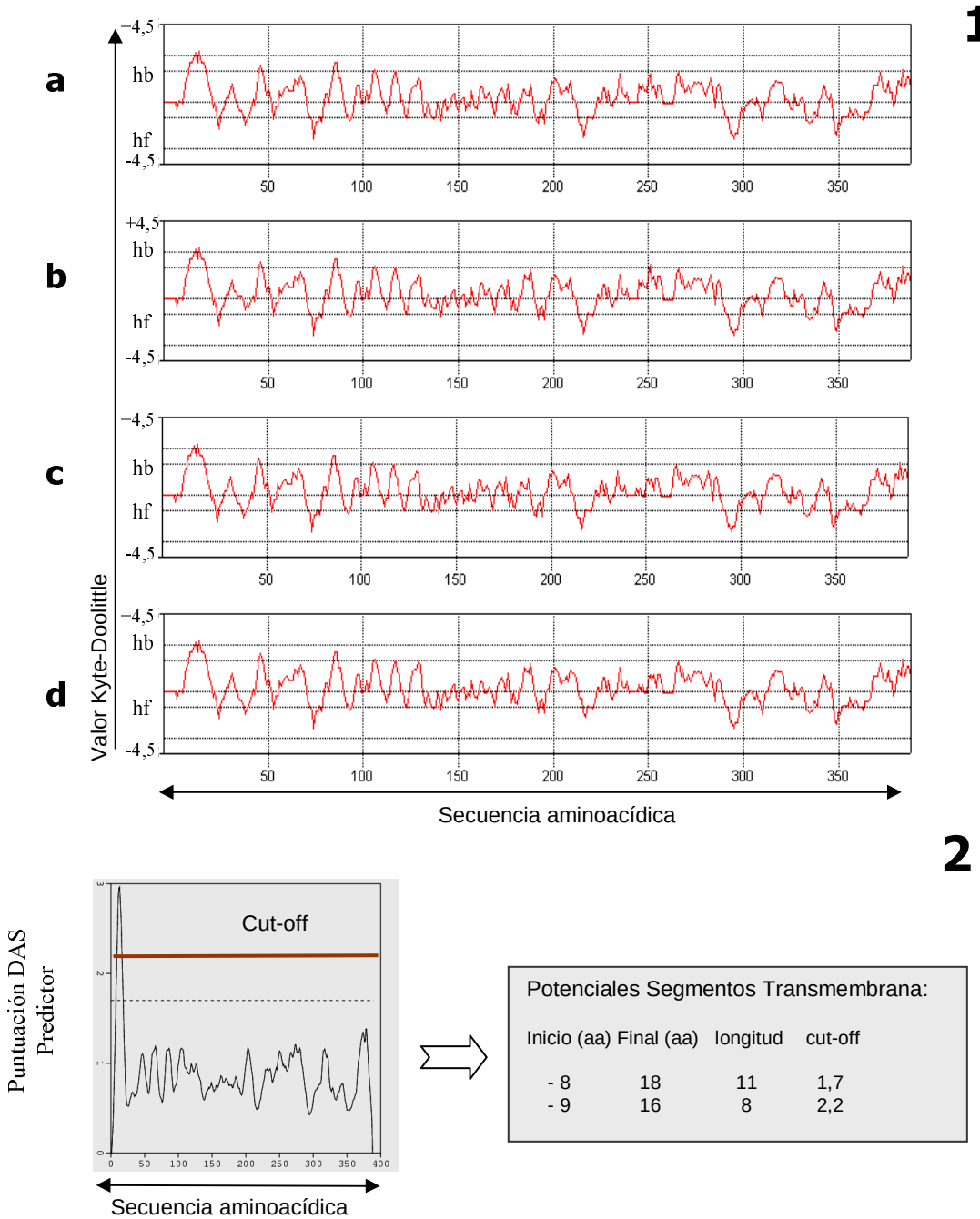
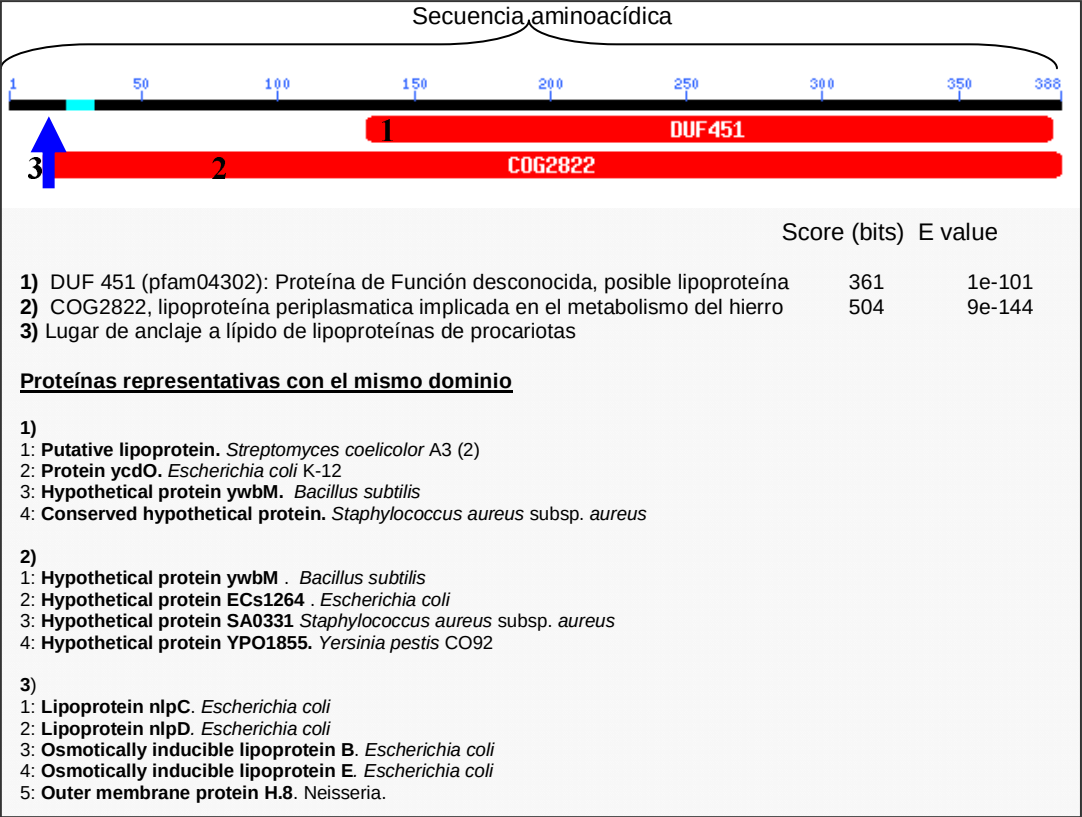
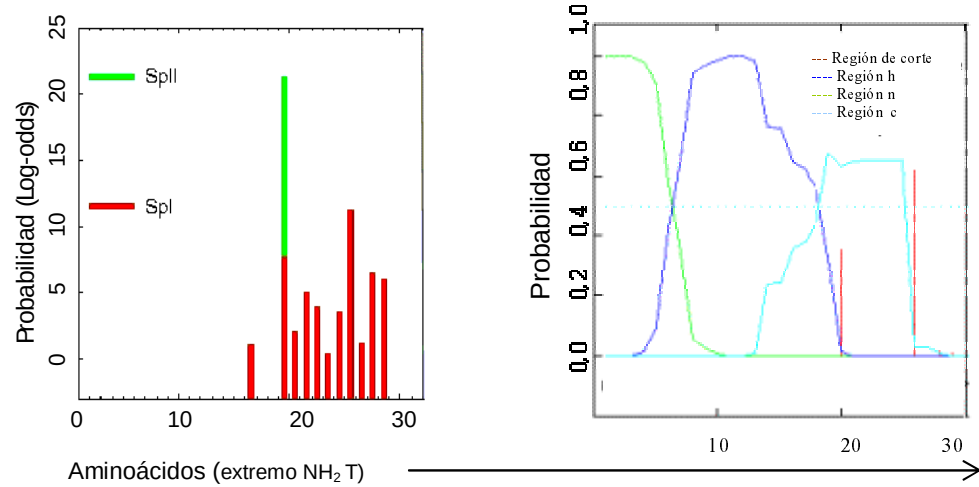


Figura 35.- (1) Patrón de reconocimiento de dominios de la variante V de la proteína P47 (*N. meningitidis* Nm30) con otros de proteínas disponibles en las bases de datos NCBI's Conserved Domain Database. (2) (a) Predicción del tipo de péptido señal para lipoproteínas y (b) de las regiones h, n y c cercanas a la región de corte presentes en la proteína P47 mediante los servidores LipoP 1.0 y SignalIP 3.0.

1



2



7.3 Modelos y deducciones de estructuras superiores

La estructura terciaria deducida para la región 36-128 de las distintas variantes de la proteína P47 se recoge en la **Figura 36**. La superposición de la estructura tridimensional deducida para cada variante sugiere la presencia de ligeras diferencias, que están indicadas en la figura con flechas (**Figura 36,1**). La comparación de los modelos estructurales deducidos con los de otras proteínas indica una similitud del 95% (95% de precisión), en esta región, con proteínas de la familia de las cuprexinas con posibles funciones relacionadas con el transporte de electrones y de unión a metales (**Figura 36,2**). Las deducciones realizadas con el programa Multicoil sugieren que la lipoproteína P47 puede adquirir una estructura superhelicoidal en la región próxima al aminoácido 239 a partir del extremo NH₂ Terminal, con una alta probabilidad de conformación en dímeros (0,826), y menor en trímeros (0,353) (**Figura 36,3**).

7.4 Predicción de epítomos lineales

Como se indica en la **Tabla 14**, en la variante V de la proteína P47 (correspondiente a la cepa Nm30) se han reconocido 16 determinantes antigénicos, la mayoría de los cuales están presentes en el resto de variantes proteicas identificadas en nuestro estudio. Los epítomos comunes a todas las variantes son los numerados 1, 4, 5, 6, 7 y 12. El 1 se ubica en la región conservada R1, el 4, 5 y 6 principalmente en la región R2, el 7 en la R3 y el 12 en la R4.

Las variantes que contienen un mayor número de epítomos diferentes respecto a la variante V son la VIII, X, XI y XII, que son expresadas por las cepas *N. meningitidis* NMB y por las cepas *N. lactamica* NIP3, NIP5 y NIP9, respectivamente. La que presentó un mayor número de epítomos similares a la V fue la IV, expresada por cepas de *N. meningitidis* como NmP0, NmP18 o NmP5, entre otras.

Figura 36.- Modelos estructurales deducidos para distintas variantes de la región 36-128 de la proteína P47 mediante el programa Phyre (Structural Bioinformatics Group, Imperial College, Londres). **(1)** Estructura terciaria deducida de las variantes V (cepa *N. meningitidis* Nm30), VIII (cepa *N. meningitidis* NMB), XI (cepa *N. lactamica* NIP5), XIII (cepa *N. gonorrhoeae* FA1090) y superposición de todas ellas. **(2)** Lugares reactivos deducidos para la variante V (color verde y amarillo). **(3)** Predicción de estructuras superhelicoidales

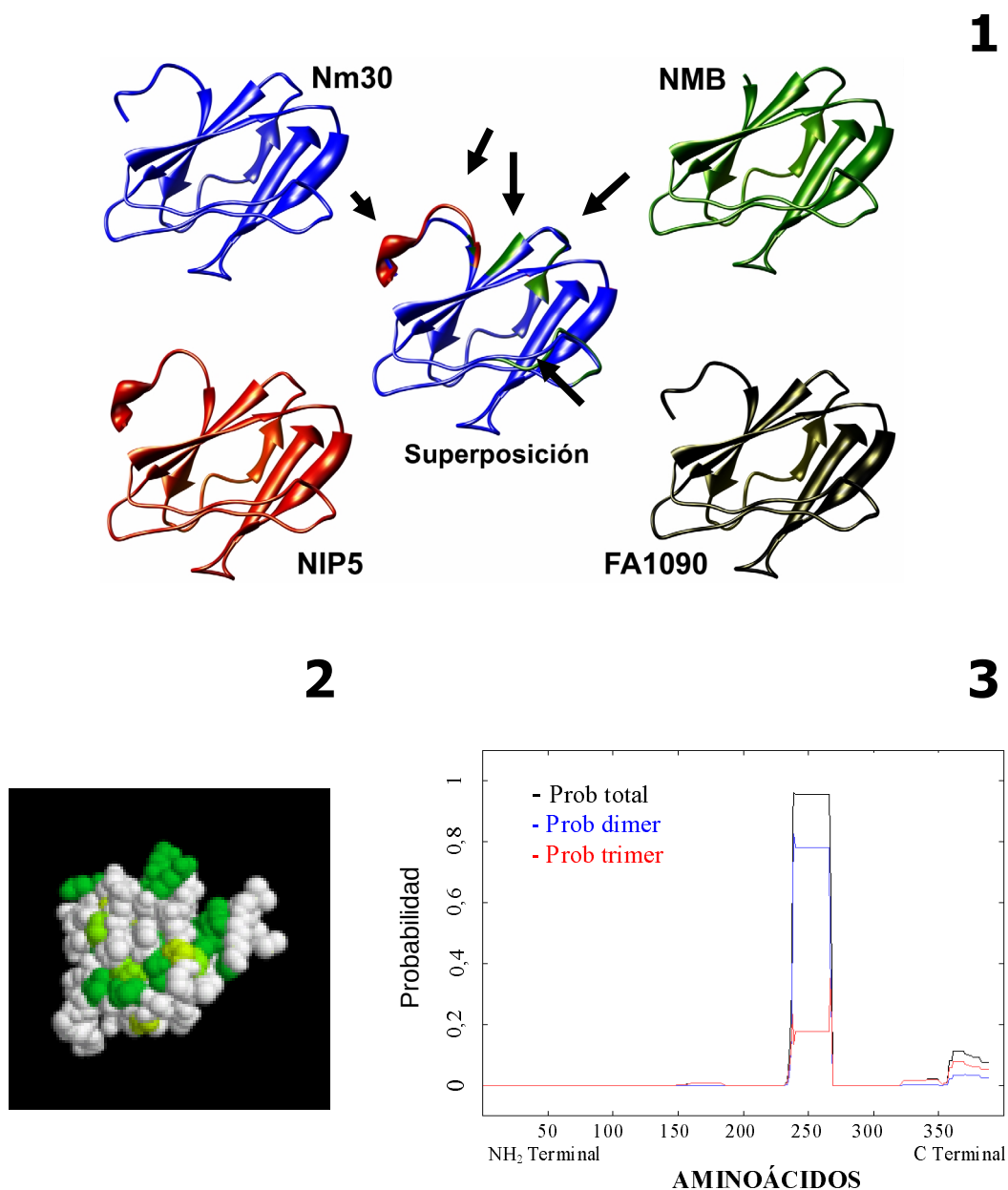


Tabla 14.- Epítomos lineales comunes a la variante V de la proteína p47 (*N. meningitidis* Nm30) en diferentes variantes. Los epítomos lineales fueron predichos mediante el método semi-empírico de Kolaskar y Tongaonkar utilizando la secuencia nucleotídica de cada variante

EPI TOMOS EN LA VARIANTE V			PRESENCIA (P) O AUSENCIA (A) EN OTRAS VARIANTES											
n	inicio	Secuencia	final	I	II	III	IV	VI	VII	VIII	X	XI	XII	
1	5	NLTALSVMLALGELTAQCP	22	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
2	43	GSVSLAVND	51	P	A	P	P	A	A	P	A	P	P	
3	55	HPMELTVFSEQVVF	68	P	P	P	P	P	A	P	A	P	P	
4	82	ILKGVMAVV	89	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
5	103	MTVTLLP	109	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
6	123	RGLVVTD	130	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
7	141	DLEKLSQFLADYKAYVQGHVKELVAK	166	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
8	170	FTEAVKA	176	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	
9	181	KAKSLFADT	189	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A	
10	192	HYEREPFAELFSELDPRVID	211	P	P	P	P	P	P	A	A	A	A	
11	230	HRREYALWVEKDVSVKHAH	250	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	
12	252	LMTDVEALQSHIDALAFPPKVVGGASELJHE	283	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
13	297	SHTDLSDRQA	306	P	P	P	A	P	P	P	P	P	A	
14	310	OSKKIVDLFRLLI	322	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	
15	339	QVNHAK	346	P	P	A	P	P	P	P	A	A	A	
16	364	RKALQASINALAHDLAQIRG	383	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A	

7.5 Correlación entre la divergencia molecular y antigénica y la unión del suero anti-P47 a la célula entera mediante FCM

Globalmente, no se ha encontrado una correlación entre el grado de similitud de las distintas variantes proteicas con la variante V y el nivel de unión del suero anti-P47 (ver **Figura 20**). Así, por ejemplo, la variante VIII (expresada por las cepas NMB y M7), con un mayor grado de divergencia con la variante V que otras, mostró niveles de unión del antisuero muy superior. Además, cepas que expresaron la misma variante, como las Nm63, Nm68, Nm70 y Nm22 mostraron niveles de unión muy diversos.

El número de epítomos comunes compartidos por las distintas variantes con la variante V tampoco se correlacionó de forma general con la unión del suero a la superficie celular por FCM. Así, la variante VI, que comparte un mayor número de epítomos lineales con la V presenta unos niveles de unión del suero débiles.

La mayoría de las cepas que expresaron la variante I, V y VIII presentaron un grado de unión del suero más elevado que el resto de variantes, aunque el número de epítomos compartidos entre estas difirió. En dichas variantes se identificaron tres epítomos (2, 3 y 15) que no son compartidos de forma conjunta por otras variantes.

Por otra parte, las cepas de *N. lactamica* que mostraron una unión del suero débil pero similar a otras *N. meningitidis* expresaron variantes (X, XI y XII) con un menor número de epítomos compartidos con la variante V respecto al resto.

8. ACTIVIDAD BACTERICIDA

Para determinar la respuesta funcional del suero anti-P47 se seleccionaron previamente cepas de *N. meningitidis* con diferente reactividad frente al suero en ensayos de FCM: Nm30 y Nm63 (con fuerte reactividad) y B16B6, Nm9 y Nm62 (con baja reactividad). Además, las cepas seleccionadas expresaron diferentes variantes proteicas. Inicialmente las cepas NMB, Nm68 y NmP19 también fueron seleccionadas, pero fueron excluidas del ensayo debido a su sensibilidad a la fuente de complemento utilizada, ya que activaron la acción lítica en ausencia de suero inmune. Complementariamente, al realizar este ensayo también se valoró la actividad bactericida del suero de conejo anti-OMVs de la cepa Nm30 con dichos aislados.

Como se indica en la **Tabla 15**, el suero anti-P47 fue únicamente bactericida contra la cepa homóloga, y entre las cepas heterólogas, la Nm63 fue la que mostró porcentajes de mortalidad más cercanos al considerado bactericida (50%). Estos datos no se correlacionaron estadísticamente con la reactividad del suero mostrada en FCM ($r=0,8$, $p=0,13$; Mann Witney test). No obstante, y como puede observarse en la **Figura 37**, el suero reaccionó intensamente con las colonias resistentes a la acción lítica del complemento de las distintas poblaciones.

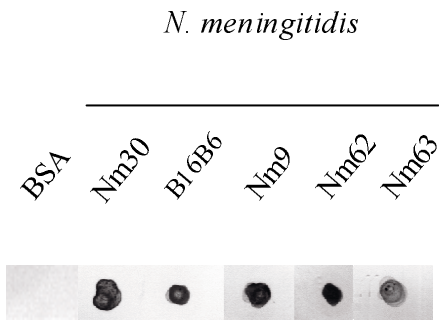
El suero anti-OMVs de la cepa Nm30 fue bactericida con todas las cepas analizadas, excepto la cepa Nm9 de reducida reactividad en FCM (ver **Tabla 15**). Con este suero tampoco se estableció una correlación estadísticamente significativa entre la unión a la superficie celular y la actividad bactericida en las condiciones de ensayo ($r=0,74$; $p=0,13$; Mann Whitney test).

Tabla 15.- Actividad bactericida de los sueros inmunes anti-P47 y anti OMVs de la cepa Nm30 contra cepas de *N. meningitidis* expresada como porcentaje de muerte celular respecto al suero no inmune. La actividad bactericida se considera significativa cuando el porcentaje de muerte supera el 50%

Suero de conejo inmune	<i>Neisseria meningitidis</i>				
	Nm30 ^a	B16B6 ^b	Nm9 ^c	Nm62 ^b	Nm63 ^a
Suero Anti- P47	77±3	29±2	8±4	2±1	42±2
Suero Anti- OMVs	100±0	100±0	30±7	95±3	95±2

- a. portador de la variante P47 V
- b. portador de la variante P47 II
- c. portador de la variante P47 VI
- d. portador de la variante P47 I

Figura 37.- Expresión de la proteína P47 en células resistentes a la acción bactericida del suero anti-P47 evaluada mediante dot blotting. Dilución de trabajo 1x10⁻³



DISCUSIÓN

El tratamiento con antibióticos ha reducido de forma notable la mortalidad causada por la enfermedad meningocócica, sin embargo su rápida evolución, y las posibles graves secuelas, entre otras causas, hacen de la vacunación el mejor instrumento para combatirla²²⁴. Las vacunas actualmente disponibles no ofrecen una respuesta efectiva y universal para todos los serogrupos responsables tanto de brotes como de epidemias, lo que obliga a la búsqueda de antígenos alternativos que puedan solventar las carencias de las fórmulas actuales.

Recientemente, se han identificado mediante la tecnología convencional y genómica candidatos prometedores como la proteína NspA, diversos antígenos derivados del genoma²²⁵ o la lipoproteína LP2086²²⁶, entre otros. Aún así, presentan limitaciones en cuanto a la ausencia de una respuesta inmune eficaz contra la mayoría de los aislados debido, principalmente, a la reducida exposición de los epítomos y la acusada variabilidad antigénica.

Hasta el momento, la inexistencia de una fórmula definitiva contra la enfermedad justifica estudios más detallados de los candidatos hasta ahora propuestos o la búsqueda de otros nuevos, con el fin de controlar o erradicar definitivamente la enfermedad.

En estudios previos a este trabajo hemos detectado un antígeno de aproximadamente 47 kDa común a cepas de *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *Moraxella catarrhalis* empleando diferentes sueros inmunes de ratón^{227,228}. Su expresión es mayor en condiciones de restricción de hierro y parece estar asociado

²²⁴ Zimmer MS y Stephens DS. 2004. Meningococcal conjugate vaccines. *Expert Opin Pharm*, 5: 855-863.

²²⁵ Pizza M, Scarlato V, Masignani V y col. 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, 287: 1816-1820.

²²⁶ Fletcher LD, Bernfield L, Barniak V y col. 2004. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect Immun*, 47: 2088-2100.

²²⁷ Ferrón L. 1995. Estudio de las proteínas reguladas por el hierro como antígenos alternativos para el desarrollo de vacunas contra *Neisseria meningitidis* [Tesis Doctoral]. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.

²²⁸ Troncoso G. 2002. Antígenos comunes en el género *Neisseria*: identificación y caracterización molecular y funcional [Tesis Doctoral], Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.

con OMPs que forman parte de complejos proteicos (Tbps, PorA y PorB). Se han detectado además anticuerpos contra el mismo en sueros de pacientes que padecieron la enfermedad meningocócica, pero no así en portadores. Todos estos datos nos han sugerido su posible implicación en el metabolismo bacteriano y su probable relevancia en la virulencia del patógeno, características que han suscitado nuestro interés para iniciar un estudio más detallado que permita valorar su utilidad en la mencionada y tan esperada vacuna universal. Así, el principal objetivo que nos hemos planteado en el presente trabajo ha sido identificar este antígeno, estudiar sus características moleculares, genéticas y antigénicas en gran número de cepas y realizar una valoración preliminar acerca de la protección que ofrece como candidato vacunal.

Los primeros intentos para su purificación se realizaron aislando y eluyendo el antígeno tras la separación de las proteínas de la membrana externa en geles de SDS-PAGE del 4-15%. Esta práctica no fue del todo efectiva, ya que se copurificó con un antígeno de un peso molecular ligeramente superior (datos no mostrados). Estos resultados preliminares nos obligaron a modificar dicha estrategia, bien variando el gradiente y porcentaje de acrilamida para incrementar la separación entre ambos tras SDS-PAGE, o bien, realizando una separación previa en función de su hidrofobicidad. La primera de las propuestas no resultó efectiva pero sí la separación de los mismos con el detergente aniónico Tritón X-114.

A temperaturas entre 0-4°C, dicho detergente solubiliza proteínas hidrofóbicas como las proteínas integrales de la membrana externa de los microorganismos, desplazando y reemplazando la estructura lipídica que las envuelve. A temperaturas superiores a 20°C, alcanza el denominado “punto de nube”, y la suspensión se

distribuye en dos fases: acuosa y detergente. Bordier²²⁹ y Brusca y Radolf²³⁰ señalaron sus propiedades y las ventajas de utilizarlo como un método simple y rápido para la extracción de OMPs a partir de células enteras, separándolas, a continuación, mediante su hidrofobicidad tras el punto de nube. Con objeto de alcanzar nuestro objetivo, para optimizar esta metodología seleccionamos al menos dos cepas: *N. meningitidis* Nm30 por su elevada expresión del antígeno de interés y porque los sueros obtenidos contra OMVs de esta cepa reaccionaron con el mismo en la totalidad de los meningococos evaluados²³¹, y la cepa *N. meningitidis* B16B6 por tratarse de una cepa de referencia. Puesto que la expresión del antígeno varía según las condiciones de cultivo, las cepas se cultivaron en medio líquido MH/Desferal (condiciones de restricción de hierro), medio líquido MH (condiciones no restrictivas de hierro) y en medio sólido Choc Iso (condiciones de suficiencia de hierro). La mayor expresión del antígeno en condiciones de restricción de hierro corroboró los resultados previos²³². No obstante, las grandes diferencias en dicha expresión (analizada por western blotting) entre los otros medios evaluados nos sugirieron que también pudieron regular su expresión otros componentes de los mismos.

La extracción del antígeno con Tritón X-114 y su solubilización mayoritariamente en la fase detergente, apuntaron inicialmente que se trata de una proteína integral de la membrana externa. Sin embargo, el antígeno también se detectó en la fase acuosa de la cepa Nm30 (no así en la B16B6), indicando que una parte de la molécula es excluida de las micelas que forma el detergente. Entre las posibilidades que podrían explicar este comportamiento ya observado en otras

²²⁹ **Bordier C.** 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol. Chem*, 256: 1604-1607

²³⁰ **Brusca JS y Radolf JD.** 1994. Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114. *Methods Enzymol*, 228:182-193

²³¹ **Troncoso G.** 2002. Antígenos comunes en el género *Neisseria*: identificación y caracterización molecular y funcional [Tesis Doctoral], Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela

²³² **Troncoso G.** 2002. Antígenos comunes en el género *Neisseria*: identificación y caracterización molecular y funcional [Tesis Doctoral], Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.

moléculas, varios autores²³³ lo han atribuido, sobre todo, a la presencia de partes hidrofílicas en las mismas o a la asociación no covalente con otras proteínas, en complejos o en largos oligómeros. Cualquiera de estas posibilidades puede aplicarse al antígeno en estudio, ya que fueron posteriormente detectadas tanto en los análisis de “cross-linking” como en la predicción de sus características moleculares, justificando su partición en las dos fases y las diferencias encontradas entre las cepas utilizadas.

La ausencia del antígeno contaminante en la fase detergente extraída a partir de los cultivos en condiciones de restricción de hierro puede ser debida, bien, a que no se extrae por las micelas del detergente, o bien, a su solubilización en la interfase acuosa-detergente, por lo que fue excluida del estudio para evitar contaminaciones entre ambas.

Las características de solubilidad y expresión del antígeno de 47 kDa justificaron su purificación a partir de la fase detergente extraída de los cultivos en restricción de hierro de la cepa Nm30. Antes de iniciar este proceso, fue necesario verificar que la reacción del suero con el antígeno presente en dicha muestra era específica, y para ello (y en función de las características del solvente), se realizaron ensayos, bien enfrentando diferentes diluciones de la alícuota de interés con el suero homólogo, o bien, alterando el gradiente en los geles de acrilamida, para incrementar de este modo el espacio de separación entre los posibles antígenos. Los resultados indicaron que la unión del suero es producto de su intensa reacción con una única molécula y, por tanto, se procedió a su purificación. Una vez purificada la molécula se utilizó como inmunógeno para obtener sueros específicos y para su identificación mediante análisis espectral por MALDI-TOF. Este último análisis confirmó la correcta purificación del antígeno en estudio.

²³³ Pryde JG. 1986. Triton X-114: a detergent that has come in from the cold. *Trends Biochem Sci*, 11: 160-163

En resumen, el método de purificación utilizado ha permitido conocer propiedades del antígeno y purificarlo correctamente, evitando la copurificación de un antígeno de peso molecular ligeramente superior. Esta metodología reduce el tiempo de obtención y análisis de OMPs respecto a su obtención a partir de OMVs, presentando, además, un mayor rendimiento que ésta. Su procedimiento es muy sencillo, no precisa material costoso como la Prensa de French²³⁴ y nos permite conocer sus características hidrofóbicas así como evaluar fácilmente su expresión en diferentes condiciones. Aunque el análisis de otros antígenos no ha sido objeto de estudio, en nuestros ensayos también hemos detectado otros posibles candidatos, algunos de ellos con un comportamiento y expresión diferencial entre las fases y los diferentes medios, cuya purificación sería igualmente factible.

Posteriormente, la identificación del antígeno como una probable lipoproteína de 42 kDa, con similitudes con proteínas metabólicas implicadas en el transporte de iones (COG 2822), justificó su expresión mayoritaria en condiciones de restricción de hierro, su solubilización en Tritón X-114 y nuestras sospechas acerca de su localización. Su peso teórico fue inferior al determinado en SDS-PAGE, con una diferencia de 5000 Da, la cual se encuentra dentro del rango de masas referentes a la modificación en el lípido NH₂-terminal que caracteriza a las lipoproteínas bacterianas.

En trabajos previos en nuestro laboratorio se sugirió que la molécula de estudio se correspondía, sobre todo, con un antígeno de 50 kDa común a cepas de *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. gonorrhoeae* y *B. pertussis*^{235,236}, entre otros.

²³⁴ **Gómez JA, Criado MT y Ferreirós CM.** 1997. Bactericidal activity of antibodies elicited against the *Neisseria meningitidis* 37-kDa ferric binding protein (FbpA) with different adjuvants. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 20: 79-86

²³⁵ **Troncoso G, Sánchez S, Moreda M y col.** 2000. Antigenic cross-reactivity between outer membrana preteins of *Neisseria meningitidis* and comensal *Neisseria* species. *Immunol Med Microbiol*, 27:103-109

²³⁶ **De Gaspari E.** 2000. Production and characterization of a new monoclonal antibody against *Neisseria meningitidis*: study of the cross-reactivity with different bacterial genera. *Hybridoma*, 9: 445-453

Los resultados de la comparación de secuencias nucleotídicas arrojaron luz sobre estas hipótesis demostrando que se trata de una hipotética lipoproteína hasta la actualidad desconocida y no estudiada, con grandes similitudes con una proteína de *N. gonorrhoeae* y *N. lactamica*.

El contexto genómico donde se sitúa el gen *p47* sugiere que presenta algún tipo de relación con las proteínas codificadas por los genes flanqueantes (funcionalidad o localización), ya que su disposición se conserva en diferentes especies del género, principalmente en *N. lactamica*, y sobre todo la disposición de los genes *p47* (NMA0280) y el NMA0282 (*N. meningitidis* Z2491), conservada en las tres especies de *Neisseria* secuenciadas. Además, estos genes pertenecen a familias relacionadas funcionalmente, con afinidad por determinados iones (COG 4280 y COG 2837). En su conjunto estos datos nos sugieren que en *N. meningitidis* y *N. lactamica* el transcrito resultante sería un ARNm policistrónico con al menos, una región intergénica no codificante entre el gen *p47* y el NMA0282. Si tenemos en cuenta que la concentración de hierro regula la expresión de la hipotética lipoproteína P47, como se ha visto en este estudio, este factor influiría en la expresión de las tres moléculas.

Estudios previos sugirieron la asociación de la P47 a otras proteínas en la membrana externa de la bacteria formando complejos proteicos. Análisis más detallados acerca de la expresión, ubicación y funcionalidad de estos genes flanqueantes permitirían conocer con mayor exactitud la relación de este antígeno con otras moléculas de la membrana externa, así como su estructura y funcionalidad en cada uno de los complejos formados.

La obtención de un suero específico contra el antígeno de 47 kDa nos permitió valorar su conservación, inmunogenicidad, accesibilidad y asociación a otras OMPs. Además, se obtuvo otro suero contra OMVs de la misma cepa a partir de la que se purificó dicho antígeno, con la finalidad de obtener un suero control en los distintos ensayos. El modelo animal utilizado fueron conejos de raza neozelandesa debido, principalmente, a la cantidad de anticuerpo necesario para abordar los objetivos propuestos.

Para poder conocer el grado de estimulación del sistema humoral de los animales inmunizados, se realizaron sucesivas extracciones de sangre, determinando el título y especificidad de los anticuerpos presentes en el suero. Tal determinación permitió valorar la necesidad de nuevas dosis de recuerdo con el fin de alcanzar un título adecuado para análisis posteriores. En este sentido y respecto a la inmunización con el antígeno de 47 kDa, los ensayos en dot blotting indicaron que fueron necesarias al menos tres dosis para estimular de forma significativa la cantidad de anticuerpos específicos, siendo, por el mecanismo de memoria inmunológica, la última dosis la que contribuyó en mayor medida a su producción.

Estos primeros resultados nos indicaron que el suero es específico contra la hipotética lipoproteína P47 y que reacciona con la misma en OMVs y células enteras, sugiriendo la existencia de epítomos lineales conservados en condiciones nativas. Estos ensayos iniciales demostraron que el suero final fue válido para analizar la expresión y accesibilidad del antígeno y, por tanto, el proceso de inmunización necesario y eficaz.

En lo referente a la inmunización con OMVs de la cepa Nm30, la respuesta humoral se incrementó gradualmente a medida que avanzó la inmunización. A diferencia de lo que ocurrió con el suero anti-P47, las dos primeras inmunizaciones fueron suficientes para generar títulos de anticuerpos relativamente altos y superiores a los del suero anti-P47. La diferencia tan señalada entre ambos sueros

es debida, probablemente a la presencia de moléculas de la membrana externa que poseen propiedades adyuvantes, como las porinas²³⁷ o los LOS²³⁸. Los datos observados en los análisis de la reactividad cruzada permiten asegurar que la hipotética lipoproteína P47 en su conformación nativa o en presencia de otras moléculas puede generar anticuerpos con mayor facilidad que cuando está desnaturalizada y que dichos anticuerpos reconocen epítomos lineales.

Nuestra hipótesis sobre la conservación del antígeno estudiado en distintas especies del genero *Neisseria* fue confirmada por los ensayos de reactividad del suero anti-P47 y posteriormente tras la caracterización molecular. La homogeneidad antigénica en condiciones desnaturalizantes entre cepas de *N. meningitidis*, y la conservación del antígeno en otras especies del genero *Neisseria* resaltan, como se sospechaba, su importancia en el metabolismo celular y su implicación en la relación con el hospedador y por tanto su estudio como antígeno vacunal.

El suero anti-OMVs de la cepa Nm30 verificó la existencia de antígenos comunes y no comunes entre cepas de *N. meningitidis*, previamente observado con el suero de ratón obtenido contra la misma cepa. No obstante, la observación de diferencias en los patrones antigénicos generados por ambos sueros (anti-OMVS conejo y anti-OMVs ratón), podrían deberse al proceso de inmunización o al modelo animal utilizado^{239,240}.

²³⁷ **Massari P, Ram S, Macleod H y col.** 2003. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends Microbiol*, 2: 87-93

²³⁸ **Besseler WG y Jung G.** 1992. Synthetic lipopeptides as novel adjuvants. *Res Immunol*, 143: 548-553

²³⁹ **Moe GR, Zuno-Mitchell P, Samantha NH y col.** 2002. Sequential immunization with vesicles prepared from heterologous *Neisseria meningitidis* strains elicits broadly protective serum antibodies to group B strains. *Infect Immun*, 70: 6021-6031

²⁴⁰ **Wang J, Jarvis GA, Achtman M y col.** 2000. Functional activities and immunoglobulin variable regions of human and murine monoclonal antibodies specific for the P1.7 Por A protein loop of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 68: 1871-1878

Tras comprobar la reactividad total del suero anti-P47 con la proteína desnaturalizada de las diferentes cepas, se procedió a su análisis en condiciones nativas mediante las técnicas de FCM y dot blotting.

Para optimizar las condiciones de trabajo se realizaron ensayos de FCM en diferentes condiciones (ver Mat y Met. apdo 7.1). La incorporación de los agentes fijadores sobre el medio de cultivo, previamente a la centrifugación, minimizó la formación de agregados. Todos los ensayos indicaron que la fijación celular con formaldehído era la más adecuada para valorar la unión del suero porque favoreció la fijación de células aisladas y presentó una reactividad similar en las células sin fijar e inactivadas por calor. La concentración de células empleada en estos ensayos es similar a la considerada por otros autores como óptima para evaluar la exposición de diferentes OMPs en *N. meningitidis*^{241,242}. A pesar de utilizar diluciones 1×10^{-3} del suero anti-P47 no se observaron diferencias cuantitativas en su reactividad respecto a diluciones menores, señalando que los lugares reactivos de la proteína estaban saturados y, por lo tanto, las condiciones establecidas eran las óptimas para el análisis.

La falta de correspondencia entre los datos obtenidos por FCM y la técnica de dot blotting en cuanto a la heterogeneidad antigénica de la proteína en condiciones nativas podrían deberse bien, a diferencias en el fundamento de cada técnica, o bien, a las condiciones de análisis establecidas para cada una de ellas. Estas diferencias entre distintos tipos de ensayos ya han sido destacadas por varios autores en estudios de accesibilidad de antígenos²⁴³, justificando tales divergencias en base a varios aspectos:

²⁴¹ **Fletcher LD, Bernfield L, Barniak V y col.** 2004. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect Immun*, 47: 2088-2100

²⁴² **Granoff DM, Moe GR, Giuliani MM y col.** 2001. A novel mimetic antigen eliciting protective antibody to *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol*, 167: 6487-6496

²⁴³ **Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS y col.** 1995. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolisaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun*, 63: 3945-3952

a) a diferencia de lo que se deduce por FCM, en la técnica de dot blotting el incremento de la respuesta-señal no se corresponde linealmente con el número de anticuerpos unidos, ya que dicha técnica está condicionada por factores que regulan la reacción enzimática (concentración de reactivos, saturación enzimática, condiciones externas) inexistentes en FCM. Estas discrepancias provocan que, comparativamente, cuando la unión del suero es débil la respuesta en el inmunoensayo en fase sólida es superior a la FCM y viceversa.

b) la técnica del dot blotting no posee la capacidad de excluir agregados celulares ni grandes fragmentos de membranas, los cuales, sobre todo los primeros, constituyen la mayor parte de la señal por el gran número de anticuerpos que mantienen unidos. Hay que considerar que la formación de dichos agregados es una característica intrínseca a cada cepa, dificultando el análisis interpoblacional.

c) en esta técnica la unión de las células al soporte sólido puede alterar la estructura natural del antígeno, circunstancia que no ocurre en FCM ya que las reacciones antígeno-anticuerpo se producen en medio líquido.

d) la interpretación de los resultados varía notablemente entre los dos ensayos. En FCM la posibilidad de cuantificar la intensidad de fluorescencia de cada muestra excluye cualquier criterio subjetivo, lo que no ocurre en el ensayo enzimático.

e) al contrario que en FCM, la reducida sensibilidad de la técnica del dot blotting no permite determinar la unión inespecífica del suero no inmune a cada cepa.

En nuestros ensayos hemos optimizado las condiciones de análisis y adquisición de datos en FCM para determinar, de forma más precisa, la unión del suero, según las características del citómetro y el programa utilizado. Para eliminar las diferencias de unión inespecífica entre las poblaciones, se normalizó la medición en función de la unión del suero no inmune a cada cepa y,

complementariamente, se utilizó el suero anti-OMVs de la cepa Nm30 como control positivo. Además, en el análisis posterior se excluyeron los agregados celulares y otros eventos según los valores de los ángulos de refracción (FSC y SSC). Basándose en lo expuesto y por sus características técnicas y de análisis, la citometría de flujo es la técnica más adecuada para medir la unión del anticuerpo a proteínas sobre la superficie de células individuales.

Los resultados obtenidos en FCM también corroboraron la conservación de la hipotética lipoproteína en la especie respecto a otros antígenos comunes, de forma similar a los obtenidos con la proteína desnaturalizada (western blotting), ya que al comparar la media global relativa de unión del suero anti-P47 respecto a la del suero anti-OMVs de la cepa Nm30 observamos que es mayor en el primero. Por otra parte, la diversidad de anticuerpos dirigidos contra otros antígenos de la superficie celular presentes en dicho suero justifica la falta de paralelismo entre las heterogeneidades de ambos sueros inmunes.

Uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune en *N. meningitidis* es la formación de OMVs. Estas estructuras segregadas por la bacteria tienen la misma densidad y composición que su envuelta y son visibles por microscopía electrónica²⁴⁴. Se han demostrado por dicha técnica diferencias de accesibilidad en algunas proteínas entre OMVs y células enteras²⁴⁵. Sin embargo, el tamaño tan reducido de las vesículas limita este tipo de estudios en FCM. Si realmente la accesibilidad de los diferentes antígenos *in vivo* difiere entre ambas estructuras, supondría que los resultados de los ensayos clínicos con vacunas basadas en OMVs sobrevalorarían la generación de una respuesta eficaz contra la

²⁴⁴ **Frasch CE y Gostchlich EC.** 1974. An outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* group B responsible for serotype specificity. *J Exp Med*, 140: 87-104

²⁴⁵ **Rosenqvist NE, Musacchio A, Aase A y col.** 1999. Functional activities and epitope specificity of human and murine antibodies against the class 4 outer membrane protein (Rpm) of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 67: 1267-1276

invasión del patógeno. En la actualidad existe una carencia importante de estudios dirigidos a analizar con detenimiento las diferencias de accesibilidad de los antígenos en diversas estructuras o formaciones celulares, como pueden ser los agrupamientos entre células, que permitirían nuevas valoraciones acerca de la implicación real de ciertos antígenos en el diseño vacunal.

En este aspecto, la hipótesis que nos planteamos es que en algunas cepas de la especie, parte de dichas formaciones celulares puede estar dirigida a evadir la respuesta del hospedador a expensas del resto de la población. Para lograr esta finalidad, las bacterias deben poseer mecanismos que alteren la accesibilidad de los antígenos al adherirse entre sí, lo que conlleva a discrepancias al analizar la reactividad de un suero contra células individuales (mediante FCM) o contra suspensiones celulares que además contengan agregados celulares (mediante dot blotting). Estas diferencias fueron observadas en nuestros ensayos (ver Result apdos. 3.2 y 4.5), al analizar la reactividad de ambos sueros inmunes, principalmente, en determinadas poblaciones constituidas por un gran número de agregados, sugiriendo que la cantidad de anticuerpo unido por unidad celular es mayor en estos agrupamientos que en las células simples, o viceversa. Si esta circunstancia se produce en condiciones *in vivo* induciría un desgaste de anticuerpos en tales formaciones, asegurando en las células individuales o en los agregados, una cantidad insuficiente para desencadenar una acción bactericida por los mecanismos de defensa.

De la observación de los gráficos de los desplazamientos de picos en los ensayos de FCM del estudio de la variabilidad intrapoblacional, se deduce una heterogeneidad en prácticamente la totalidad de las poblaciones estudiadas con ambos sueros (ver Result. apdo. 4.3), lo que confirma los datos obtenidos por otros

autores^{246,247}. Dicha heterogeneidad no tiene repercusión biológica cuando la cantidad de anticuerpo unido es suficiente para activar una respuesta funcional contra toda la población bacteriana, pero sí en el caso contrario. Así, Bowden y colaboradores²⁴⁸ observaron, mediante FCM y microscopia electrónica, poblaciones de *Brucella sp* que exhibían células con una alta y nula expresión de dos OMPs lo que justificó nuestros análisis de variabilidad intrapoblacional empleando como instrumento de análisis el coeficiente de variación para poder reconocer las poblaciones con gran número de células muy poco reactivas.

La correlación observada entre la reactividad del suero anti-P47 con la variabilidad intrapoblacional en prácticamente todas las cepas (no obtenido con el suero anti-OMVs de la cepa Nm30 a dilución 1×10^{-3}) indicó, claramente, que la enorme variabilidad intrapoblacional estuvo condicionada por la existencia de células muy poco reactivas. Además, dicha variabilidad celular no está relacionada con las características morfológicas de las células y sí con la reactividad del suero. Este mismo efecto, pero más acentuado (subpoblaciones celulares), se observó al emplear altas diluciones del suero anti OMVs de la cepa Nm30 con determinadas cepas, y que no fueron detectadas con altas concentraciones debido a la diversidad y concentración de los anticuerpos existentes.

En resumen, los estudios realizados en FCM demostraron que el suero anti-P47 reconoce al antígeno en su conformación nativa, aunque difiere entre y dentro de las distintas poblaciones. Esta heterogeneidad puede ser generada por la actuación conjunta o independiente de varios mecanismos como: la variabilidad antigénica de

²⁴⁶ Moe RG, Tan S y Granoff DM. 1999. Differences in surface expression of NspA among *Neisseria meningitidis* group B strains. *Infect Immun*, 67: 5664-5675

²⁴⁷ Fletcher LD, Bernfield L, Barniak V y col. 2004. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect Immun*, 47: 2088-2100

²⁴⁸ Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS y col. 1995. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolisaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun*, 63: 3945-3952

la hipotética lipoproteína (que pudiese no haber sido totalmente identificada en los ensayos en western blotting), exposición u ocultamiento de determinantes entre unas cepas y otras en función de la topología específica de la membrana externa, por variaciones en su conformación nativa (debido a variaciones moleculares o asociaciones a otras OMPs) y por la existencia de isoformas. En el curso de la investigación hemos realizado experimentos para determinar cual de estos mecanismos podría originar la variabilidad de la hipotética lipoproteína P47.

Con el fin de comprobar si la variabilidad intrapoblacional era provocada por diferencias de accesibilidad de la hipotética lipoproteína en estudio, causada principalmente por una inhibición estérica mediada por estructuras de la envuelta, se iniciaron experimentos encaminados a examinar la unión del suero retirando diferentes constituyentes de la misma.

La reducción de dicha accesibilidad en algunas cepas podría ser provocada por la cápsula, como indicaron previamente Moe y Granoff²⁴⁹ para otra OMP del meningococo (NspA). Dichos autores observaron una relación muy notable entre la cantidad de cápsula secretada por las cepas y la reducida exposición de la hipotética lipoproteína. Además, valoraron dicho efecto utilizando una cepa mutante que no biosintetiza el polisacárido capsular (M7)²⁵⁰ y la cepa salvaje correspondiente (NMB). Con ambas cepas el suero fue reactivo, no obstante no se realizaron ensayos cuantitativos ni se valoraron significativamente las diferencias de reactividad entre ambas. En nuestro trabajo incluimos las dos cepas y nuestros resultados coinciden, en parte, con los datos de dichos autores, ya que ambas cepas son reactivas con el suero anti-P47, pero el análisis cuantitativo determinó la ausencia de diferencias significativas en la accesibilidad de la P47 en la cepa

²⁴⁹ **Moe RG, Tan S y Granoff DM.** 1999. Differences in surface expression of NspA among *Neisseria meningitidis* group B strains. *Infect Immun*, 67: 5664-5675

²⁵⁰ **Stephens DS, Swartley JS, Kathariou y col.** 1991. Insertion of Tn916 in *Neisseria meningitidis* resulting in loss of group B capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 59: 4097-4102

encapsulada y no encapsulada. Tales diferencias tampoco fueron observadas con el resto de antígenos reactivos al utilizar el suero anti-OMVs de la cepa Nm30. Basándonos en estos resultados nos planteamos que la cepa NMB podría estar segregando una cápsula, que por sus características (estructura o cantidad) o el tamaño de sus poros o canales, no interfiriese en la unión a la P47, y por lo tanto que realmente no fuese adecuada para realizar tales valoraciones, pese a que otros autores sí la han utilizado. Por ello, elaboramos una serie de experimentos complementarios dirigidos a retirar parcialmente las estructuras externas mediante dos agentes: etanol y cloroformo.

El etanol o cloroformo retiran parte de los LOS bacterianos y disminuyen la cantidad de la cápsula excretada, facilitando la unión específica de los anticuerpos a la membrana externa. Estudios previos realizados con la porina PorB²⁵¹ indicaron que su efecto mejora considerablemente la accesibilidad de la proteína respecto a otros métodos utilizados como el tratamiento por calor, azida o antibióticos. Otros investigadores han estandarizado ensayos de FCM para medir opsoninas en sueros humanos, demostrando que la fijación de *N. meningitidis* con etanol es altamente reproducible y sensible^{252,253}. Sin embargo, uno de los inconvenientes que se le atribuye a este tratamiento es el de provocar un daño en la membrana celular y eliminar o alterar parcialmente parte de las proteínas²⁵⁴, sobre todo, si están asociadas a lípidos como la hipotética lipoproteína P47. Por tanto, decidimos fijar las células con formaldehído tras su permeabilización con etanol, con objeto de mantener las uniones entre proteínas contiguas y evitar así, en la medida de lo

²⁵¹ **Michaelsen TE, Aase A, Kolberg J, Wedge y col.** 2001. PorB3 outer membrane protein or *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine*, 19: 1526-1533.

²⁵² **Guttormsen HK, Bjerkness R, Naess A y col.** 1992. Cross-reacting opsonins in patients with meningococcal disease. *Infect Immun*, 60: 2777-2783.

²⁵³ **Plested JS, Berne L, Philip AC y col.** 2001. Functional opsonic activity of human serum antibodies to inner core lipopolysaccharide (gale) of serogroup B meningococci measured by flow cytometry. *Infect Immun*, 69: 3203-3213

²⁵⁴ **Aase A, Hoiby AE, Kolrgberg J y col.** 1998. Most antibodies to PorB and Rpm do not bind to viable meningococci, but bind strongly to ethanol-killed bacteria. 11th *International Pathogenic Neisseria Conference*, p 284.

posible, su desprendimiento durante los procesos mecánicos posteriores (centrifugación, resuspensión celular, flujo en FCM). La menor reactividad observada con ambos sueros frente a las células exclusivamente tratadas con etanol, respecto a las tratadas con etanol y formaldehído, demostró que realmente el etanol retira parte de la hipotética lipoproteína P47, así como otros antígenos.

De lo observado al comparar las células tratadas con etanol y formaldehído con las tratadas únicamente con formaldehído se concluye que están implicadas otras estructuras de la envuelta en una reducción de la accesibilidad de la P47, tanto dentro como entre las poblaciones.

Se ha demostrado que los LOS de la membrana externa tienen una influencia directa sobre la accesibilidad de determinados epítomos proteicos o lipídicos^{255,256}. Dicho efecto se ha atribuido a la estructura, longitud y sialización de las cadenas de LOS, que pueden variar en distintas etapas del crecimiento²⁵⁷ y está sometido a variación de fase^{258,259}, lo que justificaría la variabilidad intra e interpoblacional observada en nuestros resultados.

Si bien en nuestros ensayos el tratamiento con etanol incrementó la accesibilidad de los determinantes de dicho antígeno, también lo retiró parcialmente, como quedó de manifiesto en las cepas con una fuerte exposición de la molécula (ver análisis cuantitativos en FCM, Result apdo. 4.4), en las cuales la reactividad, tras dicho tratamiento, fue menor que en las no permeabilizadas.

²⁵⁵ **Plested JS, Makepeace K, Jennings MP y col.** 1999. Conservation and accessibility of an inner core lipopolysaccharide epitope of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 67: 5417-5426

²⁵⁶ **Bunikis J y Barbour AG.** 1999. Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* is hindered by Osp lipoproteins. *Infect Immun*, 67: 2874-2883

²⁵⁷ **Poolman JT, Wientjes FB, Hopman CTP y col.** 1985. Influence of the length of lipopolysaccharide molecules on surface exposure of class 1 and 2 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* 2996 (B: 2b:P1.2). En: *The Pathogenic Neisseria*. Schoolnik GK, Brooks GF, Falkow S y col (eds), p.562.. DC: American society for Microbiology, Washington

²⁵⁸ **Andersen SR, Kolberg J, Hoiby EA y col.** 1997. Lipopolysaccharide heterogeneity and escape mechanism of *Neisseria meningitidis*: possible consequences for vaccine development. *Microb Pathog*, 23: 139-155

²⁵⁹ **Kahler CM, Datta A, Tzeng YL y col.** 2005. Inner core assembly and structure of the lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis*: capacity of strain NMB to express all known immunotype epitopes. *Glycobiology*, 15: 409-419

Además, esto explica que las diferencias en la reactividad entre ambos tratamientos en las restantes cepas no fuesen extremadamente significativas. Por otra parte, la reducida sensibilidad de la técnica del dot blotting respecto a FCM (ya comentado anteriormente), aún utilizando diferentes diluciones del suero y, empleando distintos agentes permeabilizantes (etanol y cloroformo), tampoco permitió en este caso establecer una correspondencia entre los resultados de ambas técnicas, observándose solamente pequeñas diferencias en algunas cepas.

En conclusión, nuestras investigaciones acerca de la accesibilidad apuntan a que, en parte, la expresión variable de diversas estructuras (LOS o cápsula) dentro y entre las poblaciones regulan la accesibilidad del antígeno de 47 kDa; no obstante, las diferencias de reactividad del suero entre las cepas permeabilizadas y la ausencia de diferencias significativas en la expresión del antígeno también nos sugieren que podrían estar implicados otras estructuras o mecanismos en la heterogeneidad interpoblacional.

Las relaciones topológicas entre OMPs condicionan la exposición de determinadas regiones de las proteínas, incluyendo determinantes antigénicos. Este enmascaramiento se origina, sobre todo entre proteínas contiguas si constituyen complejos esenciales para el establecimiento de receptores o poros. Su importancia e implicación en el desarrollo de vacunas ha propiciado varias investigaciones en diferentes especies patógenas^{260,261}, como ya se comentó anteriormente.

²⁶⁰ **Ziegelbauer K y Overath P.** 1993. Organization of two invariant surface glycoproteins in the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*, 61: 4540-4545

²⁶¹ **Bunikis J y Barbour AG.** 1999. Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* is hindered by Osp lipoproteins. *Infect Immun*, 67: 2874-2883

Resultados previos de nuestro laboratorio²⁶² demostraron la implicación de la hipotética lipoproteína P47 en un complejo proteico de alto peso molecular formado por la PorA, PorB y RmpM.

La naturaleza de sus asociaciones no se ha podido determinar con exactitud, pero parece estar establecida fundamentalmente por uniones de tipo covalente. También hemos sugerido una posible asociación de la molécula al complejo de las Tbps, al copurificarse mediante cromatografía de afinidad de unión a transferrina, conjuntamente con otras proteínas todavía no identificadas. La identificación de la secuencia de la hipotética lipoproteína P47 con los dominios COG2822 y DUF451, presentes en proteínas implicadas en el metabolismo del hierro, apoya la hipótesis de que forme parte del complejo de las Tbps.

Para evaluar la antigenicidad de la P47 en estas agrupaciones así como en otras todavía no identificadas, hemos utilizado la técnica de “cross-linking” fijando las células enteras y OMVs con formaldehído. Dicha técnica ha sido muy utilizada en este tipo de estudios, al presentar una serie de ventajas: a), permite mantener uniones débiles que no pueden ser analizadas por otros métodos, b), puede realizarse con células vivas y, c), permite analizar rápidamente los componentes de tales complejos y determinar su antigenicidad al emplear sueros específicos²⁶³. Es posible, además, determinar el tipo de unión entre los constituyentes según el origen de la muestra o las condiciones de tratamiento. Así por ejemplo, una combinación de tratamientos previos con β -mercaptoethanol, con diferentes temperaturas y con o sin formaldehído permite conocer si dichas uniones son o no covalentes²⁶⁴, tal y como hemos realizado en nuestras investigaciones.

²⁶² **Troncoso G.** 2002. Antígenos comunes en el genero *Neisseria*: identificación y caracterización molecular y funcional [Tesis Doctoral], Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.

²⁶³ **Phizicky EM y Fields S.** 1995. Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*, 59: 94-123

²⁶⁴ **Sanchez S, Arenas J, Abel A y col.** 2005. Analysis of outer membrane protein complexes and heat-modifiable proteins in *Neisseria* strains using two-dimensional diagonal electrophoresis. *J Proteome Res*, 4: 91-95

En nuestros ensayos detectamos la formación de al menos tres complejos proteicos de diferentes tamaños cuyos componentes fueron analizados posteriormente²⁶⁵. La formación de estos complejos permitió asegurar el mantenimiento de las uniones entre proteínas contiguas tanto en las células enteras como en OMVs, aunque tales formaciones se identificaron preferiblemente en estas últimas por el menor número de proteínas presentes en el gel.

La reactividad del suero anti-P47 con bandas de un mayor peso molecular en las células enteras confirmó la asociación de la hipotética lipoproteína, bien formando asociaciones en homo dímeros o trímeros o bien, con otras proteínas. No obstante, se trata de una reactividad muy débil, quizá provocada por la conformación de la molécula en dichos complejos tras el plegamiento o por su reducida cantidad en las agrupaciones. Al contrario de lo observado por Troncoso²⁶⁶, todas estas asociaciones no se han encontrado en las OMVs, lo cual implicaría que la molécula detectada por el autor bien, no se correspondiese con la molécula de estudio al no poseer un suero específico para detectarla, o bien, que ciertas diferencias en su conformación al estar agrupada en las OMVs impidiesen su reacción con los anticuerpos específicos del suero. En los análisis de los complejos mayoritarios en OMVs realizados se identificaron asociaciones constituidas por MSP63, por PorA/ PorB/RmpM/FetA y por PorA/PorB/RmpM, pero no se encontró entre ellos la molécula de estudio, lo cual estaría indicando, si la molécula detectada por dicho autor fuese la P47, que su asociación a las proteínas mayoritarias sería menor o eventual o no detectada mediante la técnica de “cross-linking”.

²⁶⁵ **Sánchez S, Abel A, Arenas J y col.** 2005. Cross-linking analysis of antigenic outer membrane protein complexes of *Neisseria meningitidis*. *Res Microbiol*, 157: 136-142

²⁶⁶ **Troncoso G.** 2002. Antígenos comunes en el genero *Neisseria*: identificación y caracterización molecular y funcional [Tesis Doctoral], Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela

Es interesante tener en cuenta los experimentos de accesibilidad realizados por Cornelissen y colaboradores²⁶⁷ con el complejo de las Tbps en *N. gonorrhoeae*. Estos autores han sugerido que algunos aspectos del plegamiento, función o estado energético de la TbpA alteran la conformación y, en consecuencia, la accesibilidad de la TbpB, fenómeno que también podría explicar nuestros resultados. Estos datos, junto con los obtenidos con las técnicas de dot blotting y FCM con las células enteras, formalinizadas y con OMVs, apuntan a que la hipotética lipoproteína P47 puede encontrarse en la célula en dos estados: libre o asociada, manteniendo solamente en el primer caso una mayor accesibilidad de los epítomos reconocidos por el suero anti-P47. Si la relación entre ambos estados varía entre las cepas, también explicaría claramente la heterogeneidad observada en relación con dicho suero. Esta hipótesis, además, permitiría esclarecer el origen de la solubilización parcial de la molécula en los ensayos de extracción con Tritón X-114. Por otra parte, no debemos olvidar que la técnica está limitada a complejos que puedan atravesar el gel en su parte superior (4% de acrilamida), lo cual no excluye que la proteína en estudio pueda asociarse a otro tipo de complejos de mayor peso molecular donde puede exponer o no los determinantes.

La reactividad del suero anti-P47 con bandas de menor peso molecular al correspondiente a la hipotética lipoproteína tras el calentamiento con calor (observada únicamente en las células enteras sin formalinizar), es, posiblemente, indicativo de rupturas de la hipotética lipoproteína durante la manipulación o solubilización de dichas muestras.

Una vez analizada la inmunogenicidad de la hipotética lipoproteína y su presencia en cepas de *Neisseria*, diseñamos dos cebadores para detectar el gen que la codificaba basándonos en la secuencia de la cepa *Neisseria meningitidis* Z2491

²⁶⁷ **Cornelissen CN y Sparling F.** 1996. Binding and surface exposure characteristics of the gonococcal transferrin receptor are dependent on both transferrin-binding proteins. *J Bacteriol*, 178: 1437-1444.

depositada en las bases de datos de “GenBank”. Ambos cebadores (P47Left y P47Right) permitieron la correcta amplificación de la región correspondiente, detectando como era de esperar el gen en todas las cepas evaluadas. La puesta a punto de esta técnica, junto con la obtención de un suero policlonal específico, facilita y agiliza futuros análisis acerca de la identificación de la proteína y el gen que la codifica en un mayor número de cepas y especies.

Con la finalidad de secuenciar el gen de interés en todas las cepas incluidas en el estudio hemos diseñado varios cebadores para la amplificación específica de regiones del mismo no superiores a 600 pb. No obstante, la divergencia genética de las regiones flanqueantes obligó en ciertos casos a amplificar el fragmento P47.4 con un tamaño superior al determinado (cebadores P47-4 y P47-4H), secuenciando en estos únicamente una cadena.

La estrategia continuada en este estudio ha permitido amplificar íntegramente el gen de interés además de proporcionar información acerca de las regiones adyacentes. Todos los fragmentos amplificados fueron secuenciados en *N. meningitidis* y *N. lactamica*, pero debido a la enorme divergencia nucleotídica en los 650pb iniciales del gen en *N. sicca* y *N. subflava*, centramos únicamente nuestro interés en las otras dos especies.

De la amplificación de los fragmentos con los distintos cebadores podemos concluir lo siguiente:

- Diferencias en la composición nucleotídica del gen NMA0280 (según cepa *N. meningitidis* Z2491) en *N. sicca* y *N. subflava* respecto a *N. meningitidis* y *N. lactamica*, como sugerían las diferencias en el tamaño del producto de PCR

obtenido tras la amplificación de la región P47-1 y el alineamiento posterior de la secuencia de dicho fragmento (datos no mostrados).

- Heterogeneidad en la secuencia del gen *p47* en *N. sicca* y *N. subflava* respecto a *N. meningitidis* y *N. lactamica* como sugerían las pequeñas diferencias de tamaño del fragmento P47.3 y la necesidad de utilizar distintos cebadores para amplificar el fragmento P47.1-2.
- Divergencia genética en la región no codificante y en el gen NMA0282 (según la cepa *N. meningitidis* Z2491), tanto en las cepas del meningococo como en las *Neisserias* comensales, tal como sugería la necesidad de diseñar distintos cebadores para la amplificación del fragmento P47.4. Tal divergencia podría deberse tanto a sustituciones nucleotídicas como a delecciones o inserciones, como se sospecha por el menor tamaño del fragmento P47.4 amplificado a partir de las cepas *N. meningitidis* NMB y M7 respecto al amplificado en otras cepas con los mismos cebadores. Debido a que no se amplificó la región no codificante y parte del gen NMA0282 en todas cepas no se pudo analizar con más detalle el nivel de heterogeneidad en cada región.

A la hora de conocer el grado de proximidad entre distintos alelos o variantes proteicas en una especie/s es conveniente emplear gran número de cepas de distintos clones y, preferiblemente, aisladas en diferentes zonas geográficas. En nuestros ensayos hemos utilizado un gran número de cepas de *N. meningitidis*, de diverso origen geográfico y pertenecientes a diferentes complejos clonales. Entre estos se encuentran cepas representativas de 3 de los 4 complejos hipervirulentos: ET-5, ET-37 y el Cluster A4, que han sido asociados con un incremento en la tasa de enfermedad en ciertas regiones y la consecuente necesidad de una vacuna contra el serogrupo B. La mayoría de las cepas utilizadas fueron aisladas en la misma región y en épocas muy próximas lo que podría dar lugar a una reducida

heterogeneidad en nuestros resultados. No obstante, de las seis cepas de *N. meningitidis* con un origen claramente diferente, solamente las cepas NMB y M7 (cepa salvaje y mutante) presentaron diferencias respecto al resto.

La transferencia horizontal de material genético mediante recombinación intergénica o transformación entre cepas de la misma especie o de especies diferentes, parece ser un mecanismo usual en el género *Neisseria* y que ha justificado la variabilidad observada en algunas moléculas de superficie^{268,269}. La colonización de las mucosas orofaríngeas con otras especies y la duración del estado de portador es una condición ideal para la transferencia de dicho material entre cepas de meningococos y otras especies comensales, como *N. lactamica*²⁷⁰. Es interesante observar en el árbol filogenético de los alelos identificados en nuestro estudio, que las cepas *N. meningitidis* NMB o M7 mantienen una relativa distancia genética con el resto de cepas de la misma especie, y sin embargo se encuentran cercanas a *N. lactamica*, estando incluso incluidas en el mismo grupo alélico que la cepa parcialmente secuenciada por el Sanger's Institute. Esto nos sugiere que el gen de las cepas *N. meningitidis* NMB o M7 podría proceder de un intercambio genético mediante recombinación con cepas de *N. lactamica*, ya que comparte con ellas ciertas sustituciones nucleotídicas en el extremo 5'. El traspaso de información genética entre cepas de *Neisseria meningitidis* también podría estar reflejado en nuestros resultados, como indica el hecho de que ciertas cepas del mismo complejo clonal comparten alelos con cepas de otros complejos y viceversa.

También podemos observar que la secuencia nucleotídica de *N. gonorrhoeae* es más próxima a *N. lactamica* que a *N. meningitidis*. No obstante, el hecho de que

²⁶⁸ Maiden MC, Suker J, McKenna AJ y col. 1991. Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 5: 727-736

²⁶⁹ Zhu P, Klutch JM, Bash MC y col. 2002. Genetic diversity of three lgt loci for biosynthesis of lipooligosaccharide (LOS) in *Neisseria* species. *Microbiology*, 148: 1833-1844

²⁷⁰ Yazdankhah SP y Caugant DA. 2004. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol*, 53: 821-832

ambas especies no compartan nicho ecológico excluye la posibilidad de un traspaso de información genética entre ambas, siendo las características de la relación del meningococo con el hospedador, el posible origen de tal variabilidad.

En el caso de las cepas de *N. sicca* y *N. subflava*, pese a mantener un mismo nicho ecológico que *N. lactamica* y *N. meningitidis*, se ha observado una gran distancia genética respecto a estas. Tales diferencias también se han observado en la parte final del gen NMA0280 como se indicó anteriormente, lo que nos sugiere *a priori* una divergencia evolutiva entre estas especies. No obstante, un alto grado de recombinación de este gen en estas especies podría eliminar las señales filogenéticas, tal y como se ha señalado en los meningococos²⁷¹, permitiendo una mayor flexibilidad en las características moleculares de la molécula que nos ocupa, y por tanto en su funcionalidad en la célula. Además, un único gen no podría explicar en absoluto la relación filogenética existente entre las cinco especies, ya que por ejemplo en otras OMPs se ha observado un mayor grado de similitud entre ellas²⁷². El alto grado de divergencia genética del gen *p47* en *N. sicca* y *N. subflava* respecto al resto coincide con lo observado en western blotting con el suero anti-P47, indicando que si bien la expresión de la proteína podría ser más reducida que en el meningococo, estas comparten un menor número de determinantes comunes, lo cual también justifica la reducida unión del suero observada en condiciones nativas.

Como ya se ha comentado en la introducción, una de las características principales que debe cumplir el candidato vacunal ideal contra la meningitis meningocócica es una reducida variabilidad entre diferentes cepas de la especie.

²⁷¹ Colmes EC, Urwin R y Maiden MC. 1999. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol*, 16: 741-749

²⁷² Ward MJ, Lambden PR y Heckels JE. 1992. Sequence analysis and relationships between meningococcal class 3 serotype proteins and other porins from pathogenic and non-pathogenic *Neisseria* species. *FEMS Microbiol Lett*, 94: 283-290

Sin embargo, todavía no se ha definido con exactitud como se debe calcular dicha propiedad entre distintas variantes moleculares. Durante varios años la reactividad cruzada de ciertos sueros en western blotting y dot blotting era utilizada para definir este carácter, pero, actualmente el grado de similitud en la composición aminoacídica es el parámetro más utilizado por los investigadores. En estos últimos años las nuevas tecnologías como la vacunología reversa y el ADN en microarrays, entre otras, han propuesto nuevos candidatos prometedores y que han sido considerados conservados en la especie en base al criterio mencionado, como por ejemplo:

a) los productos de los genes NMB1876, NMB0315, NMB0652 o NMB0995 que mostraron un porcentaje de similitud del 99% al 98% en un reducido número de cepas del serogrupo B²⁷³.

b) los antígenos derivados del genoma GNA33 y GNA1946 que mostraron semejanzas del 99% y 98% en 31 cepas y 95 cepas, respectivamente^{274,275}.

c) la lipoproteína LP2086 con un 86% de similitud entre los aminoácidos en 95 cepas²⁷⁶.

d) la proteína de superficie NsPA con un porcentaje de similitud entre 98,5% en 17 cepas²⁷⁷.

Otros candidatos como GNA1870 con un porcentaje de similitud del 56%²⁷⁸ o el GNA2153 con porcentajes no superiores al entre 60%²⁷⁹ no han tenido la misma

²⁷³ **Grifantini R., Bartolini E., Musí A y col.** 2002. Previously un recognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. *Nat Biotechnol*, 20: 914- 921

²⁷⁴ **Pizza M, Scarlato V, Masignani V y col.** 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, 287: 1816-1820

²⁷⁵ **Jacobsson S, Thulin S, Mölling P y col.** Sequence constancies and variations in genes encoding three new meningococcal vaccine candidate antigens. *Vaccine*, 24: 2161-2168

²⁷⁶ **Fletcher LD, Bernfield L, Barniak V y col.** 2004. Vaccine Potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 Lipoprotein. *Infect Immun*, 47: 2088-2100

²⁷⁷ **Hou VC, Moe GR, Raad Z y col.** 2003. Conformational epitopes recognized by protective anti-*Neisseria* surface protein a antibodies. *Infect Immun*, 71, 6844-6849

²⁷⁸ **Magsignani V, Commanducci M, Giuliani MM y col.** 2006. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA 1870. *J. Exp Med*, disponible on line

valoración pero continúan siendo actualmente candidatos atractivos por otras características y por la posibilidad de diseñar vacunas mixtas compuestas de distintas variantes. En nuestro caso, consideramos que la hipotética lipoproteína P47 es una molécula conservada, con porcentajes de similitud de la secuencia aminoacídica del 98,5% en cepas de *N. meningitidis* y del 98,35%, en *N. lactamica*.

En 1961 Anfinsen demostró que la ribonucleasa podría desnaturalizarse y renaturalizarse sin perder la actividad enzimática, demostrando que la conformación nativa de la proteína está codificada en su estructura primaria²⁸⁰. En base a este principio durante la última década la predicción de características moleculares o antigénicas de las proteínas asociado a la secuenciación de genomas completos, ha resultado muy atractiva y muchos investigadores han diseñado gran número de programas y servidores que facilitan estos objetivos. Sin embargo, hay que mantener cierta precaución con estos análisis computacionales, ya que existe gran número de factores biológicos como pueden ser modificaciones post-transduccionales o la relación con otras OMPs, lípidos o iones, entre otros, que no son considerados en estos análisis. En nuestros estudios hemos utilizado parte de esta tecnología para inferir algunas características de la molécula en estudio y tratar de confirmar parte de las investigaciones realizadas en el laboratorio. Todas estas deducciones se han realizado en servidores de acceso libre y en bases de datos de proteínas universales con la finalidad de poder ser contrastados por otros investigadores.

De las deducciones realizadas acerca de la estructura secundaria, hidrofobicidad, lugares de unión y reconocimiento de dominios se puede concluir que la P47 es una lipoproteína insertada en la membrana, como indica la existencia

²⁷⁹ **Jacobsson S, Thulin S, Mölling P y col.** Sequence constancies and variations in genes encoding three new meningococcal vaccine candidate antigens. *Vaccine*, 24: 2161-2168

²⁸⁰ **Anfinsen CB, Haber E, Sela M y col.** 1961. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci* 47:1309-14

de gran número de hélices en el extremo carboxilo de la molécula, la identificación de una secuencia señal para peptidasas tipo II (spII) y la correspondiente región de anclaje a lípidos en el extremo amino²⁸¹. Estas regiones están altamente conservadas entre las distintas variantes proteicas (R1). A partir de estas deducciones podemos concluir que la molécula puede presentarse en dos estados: madura e inmadura.

Nuestros análisis realizados en FCM y las deducciones obtenidas acerca de la ubicación de la proteína indicaron que la molécula se localiza en la membrana externa del patógeno, y están en desacuerdo con la información disponible en las bases de datos universales que la sitúa en el periplasma. Las características hidrofóbicas y las deducciones sobre las regiones de membrana indican que no presenta regiones transmembrana y el principal contacto con la misma es la zona de anclaje. Tales deducciones incluyen la posibilidad de que la molécula podría estar situada en la membrana externa tanto hacia el periplasma como hacia el exterior, lo cual también justificaría la variabilidad inter e intrapoblacional observada en FCM.

Su función es desconocida hasta el momento, aunque en el transcurso de la investigación hemos obtenido cierta información a este respecto: su expresión se incrementa en condiciones de restricción de hierro, se han reconocido dominios presentes en otras proteínas implicadas en el transporte de hierro, el gen codificante se ubica en un contexto genómico conservado y junto a otras proteínas también implicadas en el metabolismo del hierro, y se ha observado su asociación con otras proteínas. Estos datos, junto con las deducciones realizadas acerca de su ubicación y los modelos moleculares tridimensionales inferidos indican que la proteína está compartiendo una función metabólica con otras moléculas, muy probablemente en el transporte de iones inorgánicos como puede ser el hierro u otros metales. Si bien

²⁸¹ Juncker AS, Willenbrock H, Gunnar H y col. 2003. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci*, 12: 1652-1662

la lipoproteína puede entrar en contacto con ciertos iones, no parece ser ni un receptor ni una porina, y su función podría estar centrada en mantener la conformación o situación de complejos proteicos con funciones específicas en el transporte del metal. Alternativamente, puede actuar como un intermediario entre los iones y el transportador de membrana. Los modelos tridimensionales obtenidos pueden proporcionar cierta información sobre la estructura tridimensional final de la molécula, pero es necesario realizar estudios estructurales más profundos para determinar con mayor precisión su topología en la membrana y, posiblemente, acercarse a su función.

Las OMPs del meningococo son altamente divergentes en determinadas secuencias peptídicas y sus genes están sujetos a una fuerte selección positiva en regiones que codifican parte de las proteínas expuestas al ataque inmune como los lazos extracelulares^{282,283}. Estas regiones inmunogénicas son, en algunos casos (como puede ser la VR2 de la PorA o VR de FetA), relativamente largas, constituidas por entre 20-40 aminoácidos, lo cual las define fácilmente. La disposición de las sustituciones en la secuencia aminoacídica de la lipoproteína P47 entre las variantes nos ha sugerido en un principio que no existen determinadas regiones donde la presión inmune sea más evidente, ya que como sugieren las predicciones realizadas en distintos servidores, parece que toda la molécula está expuesta en superficie. Además, parte de las sustituciones nucleotídicas no han inducido cambios en la secuencia aminoacídica al reducirse prácticamente a la mitad el número de variantes proteicas, y no han supuesto una modificación sustancial en la estructura secundaria deducida para diferentes variantes proteicas. Por ello, con objeto de determinar si la variabilidad molecular existente entre las

²⁸² **Urwin RI, Holmes EC, Fox AJ y col.** 2002. Phylogenetic evidence for frequent positive selection and recombination in the meningococcal surface antigen PorB. *Mol Biol Evol*, 19: 1686-1694

²⁸³ **Thompson EA, Feavers IM y Miden MC.** 2003. antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology*, 149: 1849- 1858

distintas variantes de la P47 podría repercutir en la variación de los lugares antigénicos decidimos deducir los epítomos lineales en cada una de ellas. No obstante, igual que en el resto de predicciones hay que tener especial cuidado al interpretar estos resultados ya que la capacidad de predecir antígenos por el algoritmo utilizado es de un 75%²⁸⁴ de fiabilidad.

El grado de divergencia en la estructura primaria de la lipoproteína P47 no explica globalmente la variabilidad interpoblacional observada en la unión del suero anti-P47, como indica la gran cantidad de epítomos comunes entre las distintas variantes con la variante V (utilizada para obtener el suero anti-P47). Sin embargo, es interesante observar que las características tridimensionales deducidas de una región de la molécula varían ligeramente en función de la variante proteica, sugiriendo que la variabilidad en las secuencias induce modificaciones en la estructura secundaria y terciaria que podrían alterar la accesibilidad de los epítomos. Estas observaciones explicarían por qué ciertas cepas como la NMB o la Nm63 unen un mayor número de anticuerpos que la Nm30 en condiciones nativas. Los experimentos realizados por Troncoso²⁸⁵ con sueros de ratón anti-OMVs apoyan esta hipótesis, al observar diferente grado de reactividad con el antígeno de 47 kDa entre distintas cepas y especies. Mecanismos similares también se han descrito en otras OMPs del meningococo donde la accesibilidad de distintos epítomos se ha reducido por la disposición tridimensional de las moléculas^{286,287,288,289}.

²⁸⁴ **Kolaskar AS y Tongaonkar PC.** 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein Antigens. *FEBS*, 276: 172-174

²⁸⁵ **Troncoso G.** 2002. Antígenos comunes en el genero *Neisseria*: identificación y caracterización molecular y funcional [Tesis Doctoral], Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.

²⁸⁶ **Wedeg E, Dalseg R, Caugant DA y col.** 1993. Expression of an inaccessible P1.7 subtype epitope on meningococcal class 1 proteins. *J Med Microbiol*, 38: 23-28

²⁸⁷ **Van der Ley P, Heckels JE, Virji M y col.** 1991. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria*. *Infect Immun*, 59: 2963-2971

²⁸⁸ **Prinz T., Meyer M, Pattersson A y col.** 1999. Structural characterization of the Lactoferrin Receptor from *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol*, 181: 4417-4419

²⁸⁹ **Hou VC, Moe GR, Raad Z y col.** 2003. Conformational epitopes recognized by protective anti-*Neisserial* surface protein a antibodies. *Infect Immun*, 71, 6844-6849

En este sentido, la hipótesis que nos planteamos en la presente tesis es que determinadas OMPs que están embebidas en la membrana externa presentan cierta variabilidad molecular en aquellas zonas expuestas en la superficie y que son inmunogénicas, pero las moléculas que están prácticamente expuestas en la superficie presentan pequeñas modificaciones en regiones no esenciales que alteran la estructura tridimensional de la misma y, en consecuencia, la accesibilidad a ciertas regiones antigénicas. Si además, las moléculas establecen asociaciones con otras moléculas o con ellas mismas, como se ha deducido en el caso de nuestro candidato vacunal, explicaría que ciertas cepas con la misma variante presenten diferencias de accesibilidad en determinados epítomos, ya observado en algunos complejos proteicos²⁹⁰.

Diversos investigadores han valorado la eficacia de diferentes candidatos vacunales analizando diversos indicadores de protección tanto funcionales (opsonofagocitosis, actividad bactericida del suero o de sangre completa) como no funcionales (título o avidez de los anticuerpos, modelos animales)²⁹¹. No obstante, la activación del complemento ha sido utilizada de manera tradicional como indicador de la protección proporcionada por los distintos antígenos vacunales desarrollados contra la enfermedad meningocócica^{292,293,294}. Por ello, el último paso en el desarrollo de este trabajo consistió en estudiar la capacidad bactericida del suero anti-P47 con el fin de valorar el potencial protector del antígeno de 47 kDa.

²⁹⁰ **Bunikis J y Barbour AG.** 1999. Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* is hindered by Osp lipoproteins. *Infect Immun*, 67: 2874-2883

²⁹¹ **Vermont C y Dobbelsteen G.** 2002. *Neisseria meningitidis* serogroup B: laboratory correlates of protection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 34: 89-96.

²⁹² **Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS.** 1969. Human immunity to the meningococcus I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med*, 129: 1307-1326.

²⁹³ **Milagres LG, Ramos SR, Sacchi CT y col.** 1994. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. *Infect Immun*, 62: 4419-4424.

²⁹⁴ **Jodar L, Griffiths E, Feavers I.** 2004. Scientific challenges for the quality control and production of group C meningococcal conjugate vaccines. *Vaccine*, 22: 1047-1053

La realización del ensayo estuvo condicionada por la fuente de complemento disponible en nuestro laboratorio. Para subsanar las dificultades de obtener complemento humano de individuos agammaglobulémicos y las variaciones mostradas entre ensayos realizados entre distintos laboratorios, se utilizó complemento de conejo de 3-4 semanas de edad diluido a $1,25 \times 10^{-1}$ ²⁹⁵. No obstante, no hay que olvidar que el meningococo es más susceptible a la lisis en presencia de complemento de conejo que de complemento humano. Recientemente, algunos trabajos han señalado que títulos del complemento de conejo comprendidos entre $1,25 \times 10^{-1}$ y $7,81 \times 10^{-3}$ pueden discriminar correctamente la susceptibilidad o resistencia de los anticuerpos al meningococo de igual modo que el considerado para el complemento humano ($2,5 \times 10^{-1}$) ^{296,297}. En el presente trabajo los anticuerpos específicos han sido obtenidos en el mismo modelo animal del cual procede la fuente de complemento evitando posibles variaciones entre especies ²⁹⁸.

Una vez determinada la variabilidad en la unión del suero anti-P47 a la proteína nativa, nuestro interés se centró en averiguar la razón de la misma y evaluar en qué medida podría afectar a la eficacia de la respuesta inmune. Por ello, las cepas utilizadas para realizar el ensayo de actividad bactericida se seleccionaron en función de su reactividad/intensidad con el suero anti-P47, según los ensayos en FCM, y además fueron portadoras de diferentes variantes proteicas. Algunas de las

²⁹⁵ **World Health Organization.** 1976. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. *World Health Orgtechnical Rep*, 594. Geneva, Switzerland.

²⁹⁶ **Borrow R, Andrews N, Glodblatt D y col.** 2001. Serological basis for use of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the United Kingdom: re-evaluation of correlates of protection. *Infect Immun*, 69: 1568-1573.

²⁹⁷ **Trotter C, Borrow R, Andrews N y col.** 2003. Seroprevalence of meningococcal serogroup C bactericidal antibody in England and Wales in the pre-vaccination era. *Vaccine*, 21: 1094-1098

²⁹⁸ **Sánchez S.** 2002. Evaluación de actividad bactericida cruzada entre especies del género *Neisseria*: Implicación en el desarrollo de la inmunidad natural frente a la meningitis meningocócica. [Tesis Doctoral], Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.

cepas inicialmente seleccionadas fueron sensibles a la fuente de complemento utilizada, activando su acción lítica en ausencia de suero inmune (ver Result. apd. 8), probablemente por la activación de otras vías diferente a la clásica (alternativa o de las lectinas), por lo que no fueron útiles en el estudio de la eficacia de la respuesta inmune.

Para confirmar que durante el ensayo de actividad bactericida el antígeno de 47 kDa estaba siendo expresado, se realizó un dot blotting con células sometidas o no a la acción conjunta del suero y complemento. Este ensayo en fase sólida permitió descartar la presencia de alteraciones que inhibiesen totalmente su expresión durante el ensayo.

Son varios los factores que influyen de forma significativa en la actividad bactericida de un suero (intrínsecos a la propia cepa o al ensayo) y que muy probablemente han impedido establecer una correlación estadísticamente significativa entre la accesibilidad de los anticuerpos a la lipoproteína y el desencadenamiento de una acción lítica según los criterios estadísticos establecidos. No obstante, es obvio que ambos parámetros presentan una cierta tendencia, observándose que las cepas que presentaron una débil unión del suero no fueron lisadas por el complemento, lo que indica que la cantidad de anticuerpo unido resultó insuficiente para activarlo. Por el contrario, si bien las cepas que presentaron una fuerte unión del suero mostraron una mayor actividad bactericida que las anteriores, la cepa Nm63 (con una mayor reactividad al suero) no sigue la misma tendencia lo que indica que la exposición del antígeno no es el único parámetro que determina la generación de una respuesta bactericida. Podrían encontrarse implicados otros mecanismos en el origen de tal restricción como la ausencia o enmascaramiento de epítomos bactericidas o la disponibilidad de mecanismos de resistencia que impiden parcialmente la activación del

complemento^{299,300}. Si esto último estuviese ocurriendo, dependería de la cantidad de anticuerpo unido o bien de la disposición del antígeno, ya que el suero anti-OMVs de la cepa Nm30 es bactericida contra dicha cepa. Otra posibilidad es que se trate de un antígeno bloqueante, que dirija la unión de los componentes C3 y MAC a lugares de la membrana donde no puede establecerse la lisis³⁰¹. No obstante, basándose únicamente en los datos proporcionados por nuestros estudios no podemos explicar con exactitud el origen de tal resistencia, pero sin duda el hallazgo de nuevas cepas con el mismo comportamiento justificaría estudios más profundos que esclareciesen su origen y su implicación en la relación patógeno-hospedador.

La capacidad bactericida del suero anti-OMVs de la cepa Nm30 frente cuatro de las cinco cepas ensayadas independientemente de la heterogeneidad observada en FCM, señala que en este caso la cantidad de anticuerpo unido fue suficiente para generar una respuesta efectiva. Este diferente comportamiento entre los sueros ensayados es resultante de la gran cantidad y diversidad de anticuerpos unidos en las cepas menos reactivas presentes en el suero anti-OMVs de dicha cepa. Resulta interesante destacar que ninguno de los sueros generó una acción bactericida contra la cepa Nm9, lo que apoya nuestras hipótesis acerca de la implicación de los agregados celulares en la evasión de la respuesta inmune y, probablemente, justifiquen que la variabilidad inter-ensayo en esta cepa sea mayor que cualquier otra.

²⁹⁹ **Vogel U y Frosch M.** 1999. Mechanisms of *Neisserial* serum resistance. *Mol Microbiol*, 32: 1133-1139.

³⁰⁰ **Ram S, Mackinnon FG, Gulati S y col.** 1999. The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol*, 36: 945-28

³⁰¹ **Joiner KA, Warren KA, Brown EJ y col.** 1985. Mechanism of action of blocking immunoglobulin G for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Invest*, 76: 1765

La ausencia de actividad bactericida del suero anti-P47 en las cepas heterólogas supuso un reto a afrontar en el potencial de la lipoproteína P47 como candidato vacunal. En general, todo indica que su exposición regula considerablemente la actividad bactericida del suero, aunque otros mecanismos pueden alterar tal relación, impidiendo extraer una correlación estadísticamente significativa. En este sentido, se ha observado que la cantidad de polisacárido capsular y el grado de sialización de LOS, moléculas que reducen la exposición de las OMPs meningococales, incrementan la supervivencia de los meningococos en sangre humana³⁰². En el presente trabajo hemos observado que la exposición del antígeno puede estar condicionada por estas estructuras y que existe una clara relación entre tal exposición y la actividad bactericida del suero. Sin embargo, hay que tener en cuenta los resultados obtenidos por Poolman y colaboradores³⁰³, quienes observaron que la acción bactericida inducida por anticuerpos monoclonales dependía del medio en el cual crece la bacteria, ya que dichas condiciones regulan la exposición de ciertos epítomos en función de la síntesis variable de otras moléculas. A la vista de estos hechos no se debe excluir que “*in vivo*” la exposición de la lipoproteína P47 sea mayor que en las condiciones evaluadas en el presente trabajo, tal y como se ha descrito para la PorB3³⁰⁴. Previamente, en nuestro laboratorio³⁰⁵ se observó una mayor expresión de anticuerpos anti-P47 en sueros de pacientes convalecientes, lo que podría sugerir que la hipotética lipoproteína

³⁰² Klein NJ, Ison CA, Peakman M y col. 1996. The influence of capsulation and lipooligosaccharide structure on neutrophil adhesion molecule expression and endothelial injury by *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*, 173: 172-179

³⁰³ Poolman JT, Timmermans HAM, Hopman CTP y col. 1987. Comparison of meningococcal outer membrane protein vaccines solubilized with detergent or C polysaccharide. *Antonie Leeuwenhoci J Microbial*; 53: 413-419

³⁰⁴ Guttormsen HK, Wetzler LM y Naess A. 1993. Humoral immune response to the class 3 outer membrane protein during the course of meningococcal disease. *Infect Immun*; 61: 4734-4472

³⁰⁵ Troncoso G, Sánchez S, Moreda M y col. 2000. Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and comensal *Neisseria* species. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 27: 103-109

hubiera estado expuesta en alguna de las etapas de la infección y en tiempo suficiente para generar anticuerpos bactericidas.

Basándonos exclusivamente en los resultados de la actividad bactericida no debemos descartar definitivamente el potencial del antígeno de 47 kDa. Históricamente, la técnica ha sido calificada como la “técnica de oro” *in vitro* para evaluar la protección contra la enfermedad, pero otros ensayos, como los que utilizan sangre completa³⁰⁶ o la opsonofagocitosis^{307,308}, también han revelado las características funcionales de los anticuerpos anti-meningocócicos. Si bien las nuevas tendencias en el diseño de vacunas han variado hacia la inclusión de subunidades con una o varias variantes antigénicas, estas nuevas formulaciones pueden activar otros mecanismos de protección diferentes a las formulas anteriores (OMVs, polisacáridos), y que no son válidos para asegurar una óptima protección. Varios ejemplos sirven de fundamento, como es el caso de los complejos de TbpA/B³⁰⁹ o el GNA 2132³¹⁰, las cuales han mostrado protección contra la septicemia meningocócica en ratones, este último probablemente mediante opsonofagocitosis.

³⁰⁶ Ison CA, Anwar N, Cole MJ y col. 1999. Assessment of immune response to meningococcal disease: comparison of a whole-blood assay and the serum bactericidal assay. *Microb Pathog*, 27: 207-214

³⁰⁷ Lehmann AK, Sornes S y Halstensen. 2000. Phagocytosis: measurement of flow cytometry. *J Immunol Methods*, 243: 229-242

³⁰⁸ Lehmann AK, Halstensen A, Hoist J y col. 1997. Functional assays for evaluation of serogroup B meningococcal structures as mediator of human opsonophagocytosis. *J Immunol Methods*, 200: 55-68

³⁰⁹ West D, Reddin K, Matheson M y col. 2001. Recombinant *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein a protects against experimental meningococcal infection. *Infect Immun*, 69 : 1561-1567

³¹⁰ Welsch AJ, Moe G, Rossi R y col. 2003. Antibody to Genome-Derived Neisserial antigen 2132, a *Neisseria meningitidis* Candidate Vaccine, confers protection against bacteremia in the absence of complement-mediated bactericidal activity. *J. Infect Dis*, 183: 1730-1739

De todos los resultados obtenidos en este trabajo y de todo lo expuesto se deduce que el antígeno de 47 kDa cumple los requisitos genético-moleculares de un antígeno ideal. Queda así abierto el estudio de ciertas características que nos permitan concluir la idoneidad para su utilización en una vacuna antimeningocócica.

CONCLUSIONES

1. Los patrones de reconocimiento y la conservación de determinadas regiones en la secuencia aminoacídica indican que el antígeno de 47 kDa se trata de una lipoproteína de membrana. La accesibilidad a los anticuerpos específicos, las predicciones bioinformáticas y el carácter hidrofílico de parte de la molécula sugieren su ubicación en la cara externa de la membrana externa.

2. La similitud de dominios con otras proteínas implicadas en el metabolismo del hierro, su similitud estructural con proteínas implicadas en el transporte de iones, la inducción de su expresión en condiciones de restricción de hierro y el contexto genómico donde se ubica indican que está implicada en el metabolismo de metales.

3. La lipoproteína P47 es antigénica con epitopos lineales altamente conservados entre todas las cepas, como demuestra los resultados de reactividad cruzada y las predicciones realizadas por técnicas bioinformáticas.

4. La molécula está conservada estructuralmente como indica la reducida divergencia tanto nucleotídica como aminoacídica. Es accesible en estudios *in vitro* aunque es variable, posiblemente por la presencia o no de estructuras de la envuelta externa, su asociación a otras OMPs o la conformación de la molécula en la membrana.

5. La funcionalidad de los anticuerpos generados por la lipoproteína junto con el hecho de cumplir los principales requisitos genético-moleculares de un antígeno ideal nos permiten valorar positivamente su utilidad en una vacuna antimeningocócica universal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aase A, Bjune G, Hoiby EA y col.** 1995. Comparison among opsonic activity, anti-meningococcal immunoglobulin G response, and serum bactericidal activity against meningococci in sera from vaccinees after immunization with a serogroup B outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun*, 63: 3531-3536
- Aase A, Hoiby AE, Kolrgberg J y col.** 1998. Most antibodies to PorB and Rpm do not bind to viable meningococci, but bind strongly to ethanol-killed bacteria. 11th *International Pathogenic Neisseria Conference*, p 284
- Adu-Bobie J, Capecchi B, Serruto D y col.** 2003. Two years into reverse vaccinology. *Vaccine*, 21: 605-610
- Adu-Bobie J, Lupetti P, Brunelli B y col.** 2004. GNA33 of *Neisseria meningitidis* is a lipoprotein required for cell separation, membrane architecture and virulence. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 28: 329-334
- Alix AJ.** 1999. Predictive estimation of protein linear epitopes by using the program PEOPLE. *Vaccine*, 18: 311-314
- Amara RR y Robinson HL.** 2002. A new generation of HIV vaccines. *Trends Mol Med*, 8: 489-495
- Amato NV, Finger H, Gotschlich EC y col.** 1974. Serologic response to serogroup C meningococcal vaccine in Brazilian preschool children. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 16: 149-153
- Andersen SR, Kolberg J, Hoiby EA y col.** 1997. Lipopolysaccharide heterogeneity and escape mechanism of *Neisseria meningitidis*: possible consequences for vaccine development. *Microb Pathog*, 23: 139-155
- Andersson C, Sandberg L, Wermérus H y col.** 2000. Improved systems for hydrophobic tagging of recombinant immunogens for efficient iscom incorporation. *J Immunol Methods*, 21: 181-193
- Andre FE.** 1990. Overview of a 5-year clinical experience with a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 8: 74-80
- Anfinsen CB, Haber E, Sela M y col.** 1961. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci* 47:1309-14
- Besseler WG y Jung G.** 1992. Synthetic lipopeptides as novel adjuvants. *Res Immunol*, 143: 548-553
- Billman-Jacobe H.** 1996. Characterization of a *Mycobacterium smegmatis* mutant lacking penicillin binding protein 1. *Antimic Ag Chemr*, 43: 3011-3013
- Bjune G, Hoiby EA, Gronnesby JK y col.** 1991. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet*, 338: 1093-1096
- Bollag DM, Rozycki MD y Edelstein SJ.** 1996. Briefly noted: Dot Filter Binding Assay. Bollag DM, Rozycki MD y Edelstein SJ (eds) *En: Protein Methods*. p 75, Willey-Liss Inc, New York
- Bollag DM, Rozycki MD y Edelstein SJ.** 1996. Trichloroacetic Acid (TCA) Precipitation. Bollag, DM, Rozycki MD y Edelstein SJ (eds) *En: Protein Methods*, p 84. Willey-Lyss INC. New York
- Bordier C.** 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol. Chem*, 256: 1604-1607
- Borrow R, Andrews N, Glodblatt D y col.** 2001. Serological basis for use of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the United Kingdom: re-evaluation of correlates of protection . *Infect Immun*, 69: 1568-1573

- Borrow R, Goldblatt D, Finn A y col.** 2003. Immunogenicity of, and immunologic memory to, a reduced primary schedule of meningococcal C-tetanus toxoid conjugate vaccine in infants of the United Kingdom. *Infect Immunol*, 71: 5549-5555
- Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS y col.** 1995. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun*, 63: 3945-3952
- Bowe F, Lavelle EC, McNeela NE y col.** 2004. Mucosal vaccination against serogroup B meningococci: induction of bactericidal antibodies and cellular immunity following intranasal immunization with NadA of *Neisseria meningitidis* and mutants of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Infect Immun*, 72: 4052-4060
- Braum JM, Beuth J, Brackbraun JM y col.** 2004. *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica* and *Moraxella catarrhalis* share cross-reactive carbohydrate antigens. *Vaccine*, 22: 898-908
- Bruge J, Cam NB, Damve B y col.** 2004. Clinical evaluation of a group B meningococcal N-propionilated polysaccharide conjugate vaccine in adult, male volunteers. *Vaccine*, 22: 1087-1096
- Brusca JS, Radolf JD.** 1994. Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114. *Methods Enzymol*, 228:182-193
- Bryrd DW, Roop RM, Veit PH y col.** 1991. Serum sensitivity and lipopolysaccharide characteristics in *Bordetella bronchiseptica*, *B. pertussis* and *B. parapertussis*. *J Med Microbiol*, 34: 159-165
- Bunikis J y Barbour AG.** 1999. Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* is hindered by Osp lipoproteins. *Infect Immun*, 67: 2874-2883
- Campbell J, Edelman R, King J y col.** 2002. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a tetravalent meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine given to healthy adults. *Pediatr Infect Dis J*, 21: 978-979
- Cano R, García C y Mateo S.** 1998. Enfermedad meningocócica. Situación en España en la temporada 1998-1999. *Rev Esp Salud Pública*, 74: 369-375
- Cano R, Larrauri A, Mateo S y col.** 2004. Impact of the meningococcal C conjugate vaccine in Spain: an epidemiological and microbiological decision. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis*, 9: 5-6
- Cartwright C.** 1995. Meningococcal carriage and disease. Cartwright, K. (ed). En: *Meningococcal Disease*, p 115
- Cherubin CE, Marr JS, Schaeffer S y col.** 1980 Meningococcal disease in New York City, 1973 to 1978: recognition of groups Y and W-135 as frequent pathogens. *J. Am Med Assoc*, 244: 2167-2171
- Christodoulides M, Brooks JL, Rattue E y col.** 1998. Immunization with recombinant class 1 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of liposomes and adjuvants on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci. *Microbiology*, 144: 3027-3037
- Clark S, Borrow R, Sadler F y col.** 1998. Immunoblotting investigation of UK infants sera collected during a phase 2 study of a PorA recombinant meningococcal vaccine. Nassif, X (ed). En: *11th International Pathogenic Neisseria Conference*, p 798, EDK, París
- Cochi SL, Markowitz LE, Joshi DD y col.** 1987. Control of epidemic group A meningococcal meningitis in Nepal. *Int J Epidemiol*, 16: 91-97

- Cohen P, Bouaboula M, Bellis M y col.** 2000. Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. *J Biol Chem*, 275: 11181-11190
- Colmes EC, Urwin R y Maiden MC.** 1999. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol*, 16: 741-749
- Comanducci M, Bambini S, Brunelli B y col.** 2002. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J. Exp Med*, 195: 1445-1454
- Comanducci M, Bambini S, Caugant y col.** 2004. NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 72: 4217-4223
- Combet C, Blanchet C, Geourjon C y col.** 2000. NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS*, 3: 147-150
- Cornelissen CN y Sparling F.** 1996. Binding and surface exposure characteristics of the gonococcal transferrin receptor are dependent on both transferring-binding proteins. *J Bacteriol*, 178: 1437-1444
- Coulter SN, Schwan WR, Ng EY y col.** 1998. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Mol Microbiol*, 30: 393-404
- Danve B, Lissolo L, Mignon M y col.** 2000. Transferrin-binding proteins isolated from *Neisseria meningitidis* elicit protective and bactericidal antibodies in laboratory animals. *Vaccine*, 18: 2476-2481
- Davey HM y Dell DB.** 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev*, 60: 641-696
- De Gaspari E.** 2000. Production and characterization of a new monoclonal antibody against *Neisseria meningitidis*: study of the cross-reactivity with different bacterial genera. *Hybridoma*, 9: 445-453
- Dietrich MA, Truax RE, French DD y col.** 1991. Measurement of antibody binding to intact bacteria using flow cytometric techniques. *J Microbiol Methods*, 13: 281-291
- Dirección Xeral de Saúde Pública de Galicia.** 2000. Impacto da campaña da vacinación coa vacina anti-meningocócica conxugada. *B Ep Gal*, 13: 4
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW y col.** 1997. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol*, 15: 617-648
- Doytchinova IA y Flower DR.** 2002. Quantitative approaches to computational vaccinology. *Immunol Cell Biol*, 80: 270-279
- Dweyer CA, Reddin K, Martin D y col.** 2004. Expression of heterologous antigens in commensal *Neisseria* spp.: preservation of conformational epitopes with vaccine potential. *Infect Immun*, 72: 6511-6518
- Ellis RW.** 1999. Effect of air abrasion and acid etching on sealant retention: an in vitro study. *Pediatr Dent*, 21: 316-319
- Exner MM, Wu S, Blanco DR y col.** 2000. Protection elicited by native outer membrane protein Oms66 (P66) against host adapted *Borrelia burgdorferi*: conformational nature of bactericidal epitopes. *Infect Immun*, 68: 2647-2654
- Falquet L, Pagni M, Bucher P, y col.** 2002. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* 30: 235-238

- Fermer C y Swedberg G.** 1997. Adaptation to sulphonamide resistance in *Neisseria meningitidis* may have required compensatory changes to retain enzyme function: Kinetic analysis of dihydropteroate synthesis from *N. meningitidis* expressed in knockout mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 179: 831-837
- Ferreirós CM, Criado MT, Pintor M y col.** 1991. Analysis of the molecular mass heterogeneity of the transferrin receptor in *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria*. *FEMS Microbiol Lett*, 83: 247-254
- Ferreirós CM, Ferrón L y Criado MT.** 1994. In vivo human response to transferrin-binding protein 2 and other iron-regulated proteins of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 8: 63-68
- Ferrón L, Ferreira CM, Criado MT y col.** 1992. Immunogenicity and antigenic heterogeneity of a human transferrin-binding protein in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 60: 2887-2892
- Ferrón L.** 1995. Estudio de las proteínas reguladas por el hierro como antígenos alternativos para el desarrollo de vacunas contra *Neisseria meningitidis* [Tesis Doctoral]. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela
- Fikrig E, Feng W, Barthold SW y col.** 2000. Arthropod and host specific *Borrelia burgdorferi* bbk32 expression and the inhibition of spirochete transmission. *J Immunol*, 164: 5344-5351
- Findlow J, Lowe A, Deane S y col.** 2005. Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine in toddlers and school children. *Vaccine*, 23: 2623-2627
- Finne J, Bitter-Suerman D, Goridis C y col.** 1987. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis: implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet*, 2: 355-357
- Fletcher LD, Bernfield L, Barniak V y col.** 2004. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect Immun*, 47: 2088-2100
- Frasch CE y Gotschlich EC.** 1974. An outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* group B responsible for serotype specificity. *J Exp Med*, 140: 87-104
- Fusco PC, Michon F, Tae JY y col.** 1997. Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates. *J. Infect Dis*, 175: 364-372
- García-Suarez M, Cima-Cabal MD, Florez N y col.** 2004. Protection against pneumococcal pneumonia in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin. *Infect Immun*, 72: 4534-4540
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS.** 1969. Human immunity to the meningococcus I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med*, 129: 1307-1326
- Gómez JA, Criado MT y Ferreira CM.** 1997. Bactericidal activity of antibodies elicited against the *Neisseria meningitidis* 37-kDa ferric binding protein (FbpA) with different adjuvants. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 20: 79-86
- Gorringe A, Halliwell D, Matheson M y col.** 2005. The development of a meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. *Vaccine*, 23: 2210-2213
- Granoff DM, Maslanka SE y Carlone FM.** 1998. A modified enzyme-linked-immunosorbent assay for measurement of antibody responses to meningococcal C polysaccharide that correlate with bactericidal responses. *Clin Diag Lab Immunol*, 5: 479-485
- Granoff DM, Moe GR, Giuliani MM y col.** 2001. A novel mimetic antigen eliciting protective antibody to *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol*, 167: 6487-6496

- Greewood BM, Bradley AK y Wall RA.** 1985. Meningococcal disease and season in sub-Saharan Africa. *Lancet*, 2: 829-830
- Gregoriadis G.** 1995. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol*, 13: 527-537
- Grifantini R, Bartolini E, Muzzi A y col.** 2002. Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. *Nat Biotechnol*, 20: 914-921
- Grodet C, Dequin PF, Watt S y col.** 2004. Outbreak in France of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.12 belonging to sequence type 1403. *Clin Microbiol Infect*, 10: 845
- Groot AS y Rappuoli R.** 2004. Genome-derived vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 3: 59-76
- Grossman N, Svenson SB, Leive L y col.** 1990. *Salmonella* O antigen-specific oligosaccharide-octyl conjugates activate complement via the alternative pathway at different rates depending on the structure of the O antigen. *Mol Immunol*, 27: 859-865
- Guibourdenche M, Hoiby EA, Riou JY y col.** 1996. Epidemics of serogroup A *Neisseria meningitidis* of subgroup III in Africa, 1989-94. *Epidemiol Infect*, 116: 115-120
- Guthrie T, Wong SY, Liang B y col.** 2004. Local and systemic antibody responses in mice immunized intranasally with native and detergent-extracted outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 72: 2528-2537
- Guttormsen HK, Bjerkness R, Naess A y col.** 1992. Cross-reacting opsonins in patients with meningococcal disease. *Infect Immun*, 60: 2777-2783
- Guttormsen HK, Wetzler LM y Naess A.** 1993. Humoral immune response to the class 3 outer membrane protein during the course of meningococcal disease. *Infect Immun*; 61: 4734-4472
- Hager DA y Burgess RR.** 1980. Elution of proteins from dodecyl sulfate-polyacrilamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate and renaturation of enzymatic activity: results with sigma suunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase and other enzymes. *Anal Biochem*, 109: 76-86
- Handfield M, Brady JF, Progulske FA y col.** 2000. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. *Trends Microbiol*, 8: 336-839
- Hansson M, Per-Ake N y Stahl S.** 2000. Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnol Appl Biochem*, 32: 95-107
- Hardy SJ, Christodoulides M, Séller RO y col.** 2000. Interactions of *Neisseria meningitidis* with cells of the human meninges. *Mol Microbiol*, 36: 817-829
- Hassan-king MK, Wall RA y Greenwood BM.** 1998. Meningococcal carriage, meningococcal disease and vaccination. *J Infect*, 16: 55-59
- Heukeshoven DC y Dernick R.** 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrilamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6: 103-112
- Higgins D y Sharp R.** 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci*, 5: 151-153

- Hou VC, Moe GR, Raad Z y col.** 2003. Conformational epitopes recognized by protective anti-*Neisseria* surface protein a antibodies. *Infect Immun*, 71, 6844-6849
- Hughenoltz P y Pace NR.** 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol*, 14: 190-197
- Humphries HE, Williams JN, Christodoulides M y col.** 2004. Recombinant meningococcal PorA protein, expressed using a vector system with potential for human vaccination induces a bactericidal immune response. *Vaccine*, 22: 1564-1569
- Ison CA, Anwar N, Cole MJ y col.** 1999. Assessment of immune response to meningococcal disease: comparison of a whole-blood assay and the serum bactericidal assay. *Microb Pathog*, 27: 207-214
- Jacobsson S, Thulin S, Mölling P y col.** Sequence constancies and variations in genes encoding three new meningococcal vaccine candidate antigens. *Vaccine*, 24: 2161-2168
- Jepras RI, Carter J, Pearson SC y col.** 1995. Development of a robust flow cytometric assay for determining number of viable bacteria. *Appl Env Microbiol*, 61: 2696-2701
- Jóðar L, Feavers IM, Salisbury D y col.** 2002. Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet*, 359: 1499-1508
- Jodar L, Griffiths E y Feavers I.** 2004. Scientific challenges for the quality control and production of group C meningococcal conjugate vaccines. *Vaccine*, 22: 1047-1053
- Johnson AS, Gorringe AR, Fox AJ y col.** 1997. Analysis of the human Ig isotype response to individual transferring binding proteins A and B from *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 19: 159-167
- Joiner KA, Warren KA, Brown EJ y col.** 1985. Mechanism of action of blocking immunoglobulin G for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Invest*, 76: 1765
- Jolley KA, Appleby L, Wright JC y col.** 2001. Immunization with recombinant Opc outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of sequence variation and levels of expression on the bactericidal immune response against meningococci. *Infect Immun*, 69: 3809-3816
- Jonge MI, Hamstra HJ, Jiskoot W y col.** 2004. Intranasal immunisation of mice with liposomes containing recombinant meningococcal OpaB and OpaJ proteins. *Vaccine*, 22: 4021-4028
- Jonhson AS, Gorringe AR, Mackinnon FG y col.** 1999. Analysis of the human Ig Isotype response to lactoferrin binding protein A from *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 25: 349-354
- Juncker AS, Willenbrock H, Gunnar H y col.** 2003. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci*, 12: 1652-1662
- Kahler CM, Datta A, Tzeng YL y col.** 2005. Inner core assembly and structure of lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis*: capacity of strain NMB to express all known immunotype epitopes. *Glycobiology*, 15: 409-419
- Kittelberger R, Hansen MF, Hilbink F y col.** 1995. Selective extraction of bacterial macromolecules by temperature-induced phase separation in Triton X-114 solution. *J Microbiol Meth*, 24:81-92

- Klein NJ, Ison CA, Peakman M y col.** 1996. The influence of capsulation and lipooligosaccharide structure on neutrophil adhesion molecule expression and endothelial injury by *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*, 173: 172-179
- Klugman KP.** 2001. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines and their effect on carriage and antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis*, 1: 85-91
- Kolaskar AS y Tongaonkar PC.** 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*, 276: 172-174
- Kurz S, Hubner C, Aepinus C y col.** 2003. Transcriptome-based antigen identification for *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, 21: 768-75
- Kvalsvig AJ y Unsworth DJ.** 2003. The immunopathogenesis of meningococcal disease. *J Clin Pathol*, 56: 417-422
- Laemli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- Lee C, Levin A y Branton D.** 1987. Cooper staining: a five minute protein for sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gels. *Anal Biochem*, 166: 508-510
- Lehmann AK, Sornes S y Halstensen.** 2000. Phagocytosis: measurement of flow cytometry. *J Immunol Methods*, 243: 229-242
- Lehmann AK, Halstensen A, Hoist J y col.** 1997. Functional assays for evaluation of serogroup B meningococcal structures as mediator of human opsonophagocytosis. *J Immunol Methods*, 200: 55-68
- Lifely MR y Morero C.** 1986. Vaccine against meningococcal group B disease. *Lancet*, 1: 214-215
- Liljeqvist S y Stahl S.** 1999. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol*, 73: 30-33
- Litt DJ, Savino SS, Beddek A y col.** 2004. Putative vaccine antigens from *Neisseria meningitidis* recognized by serum antibodies of young children convalescing after meningococcal disease. *J. Infect Dis*, 190: 1488-1496
- Livingston BD, Newman M, Crimi C y col.** 2001. Optimization of epitope processing enhances Immunogenicity of multi-epitope DNA vaccines. *Vaccine*, 19: 4652-4660
- Lowe AM, Beattie DT y Deresiewicz RL.** 1998. Identification of novel *Staphylococcal* virulence genes by in vivo expression technology. *Mol Microbiol*, 27: 967-976
- Magsignani V, Commanducci M, Giuliani MM y col.** 2006. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA 1870. *J. Exp Med*, disponible on line
- Mahan MJ, Schlauch JM y Mekalanos JJ.** 1993. Bacteriophage P22 transduction of integrated plasmids: single-step cloning of *Salmonella typhimurium* gene fusions. *J Bacteriol*, 175: 7086-7091
- Maiden MC y Frosch M.** 2001. Molecular techniques for the investigation of meningococcal disease epidemiology. *Mol Biotechnol*, 18: 119-134
- Maiden MC, Suker J, McKenna AJ y col.** 1991. Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 5: 727-736

- Maiden MC y Stuart JM.** 2002. Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. *Lancet*, 359: 1829-1831
- Makrides SC.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 60: 512-538
- Martín D, Cadieux N, Hamel J y col.** 1997. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. *J Exp Med*, 185:1173-1183
- Martín SL, Borrow R, Van der Ley PD y col.** 2000. Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA on outer membrane vesicles vaccine. *Vaccine*, 18: 2476-2481
- Masignani V, Comanducci M, Giuliani S y col.** 2003. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA 1870. *J Exp. Med*, 197: 789-795
- McCoy JP.** 2002. Basic principles of flow cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am*, 16: 229-243
- McGee ZA, Street CM, Chapell CI y col.** 1979. Pili of *Neisseria meningitidis*, effect of media on maintenance of piliation, characteristics of pili and colonial morphology. *Infect Immun*, 24: 194-201
- McMichael JC y Greeb BA.** 2003. Vaccines for *Moraxella catarrhalis* and non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Curr Opin Investig Drugs*, 4: 953-958
- Menéndez T, Haz I, Delgado M y col.** 2001. Immunisation with phage-displayed variable region 2 from meningococcal PorA outer membrane protein induces bactericidal antibodies against *Neisseria meningitidis*. *Immunol Lett*, 39: 143-148
- Mertsola J, Kennedy WA, Waagner DC y col.** 1991. Endotoxin concentrations in cerebrospinal fluid correlate with clinical severity and neurologic outcome of *Haemophilus influenzae* type by meningitis. *Am J Dis Child*, 145: 1099-1103
- Merz AJ y So M.** 2000. Interactions of pathogenic *Neisseriae* with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell D Bio*, 16: 423-457
- Michaelsen TE, Aase A, Kolberg J y col.** 2001. PorB3 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine*, 19: 1526-1533
- Mills JC, Syder A, Hong CV y col.** 2001. Molecular profile of the mouse gastric parietal cell with and without exposure to *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:13687-13692
- Moe GR, Tan S y Granoff DM.** 1999. Differences in surface expression of NspA among *Neisseria meningitidis* group B strains. *Infect Immun*, 67: 5664-5675
- Moe GR, Zuno-Mitchell P, Hammond SN y col.** 2002. Sequential immunization with vesicles prepared from heterologous *Neisseria meningitidis* strains elicits broadly protective serum antibodies to group B strains. *Infect Immun*, 70: 6021-6031
- Montigiani S, Falugi F, Scarselli M y col.** 2002. Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*, 70: 368-379
- Mueller A, O'Rourke J, Chu P y col.** 2003. Protective immunity against *Helicobacter* is characterized by a unique transcriptional signature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 12289-12294

- Munkley A, Tinsley CR, Virji M y col.** 1991. Blocking of bacterial killing of *Neisseria meningitidis* by antibodies directed against class 4 outer membrane protein. *Microb Pathog*, 11: 447-452
- Nagahama M, Michiue K y Sakurai J.** 1996. Production and purification of *Clostridium perfringens* alpha-toxin using a protein-hyperproducing strain, *Bacillus brevis* 47. *FEMS Microbiol Lett*, 145: 239-243
- Niebla O, Alvarez A, Martín A y col.** 2001. Immunogenicity of recombinant class 1 protein from *Neisseria meningitidis* refolded into phospholipid vesicles and detergent. *Vaccine*, 19: 3568-3574
- Noronha CP, Struchiner CJ y Halloran ME.** 1995. Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro. Brazil: a case-control study. *Int J. Epidemiol*, 24: 1050-1057
- O'Dwyer CA, Reddin K, Martin D y col.** 2004. Expresión of heterologous antigens in comensal *Neisseria* spp.: preservation of conformational epitopes with vaccine potential. *Infect Immun*, 72: 6511-6518
- O'Hallaban J, Lennon D, Oster P y col.** 2005. From secondary prevention to primary prevention: a unique strategy that gives hope to a country ravaged by meningococcal disease. *Vaccine*, 23: 2197-2201
- Oster P, Lennon D, O'Hallahan J y col.** 2005. MeNZB™: a safe and highly immunogenic Taylor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine*, 23, 2191-2196
- Osterhaus AD, van Baalen CA, Gruters RA y col.** 1999. Vaccination with Rev and Tat against AIDS. *Vaccine*, 17: 2713-2714
- Pangburn MK.** 1997. Alternative pathway: activation and regulation. En *The complement system*. Rother K, Till GO Hansch GM (eds), p 23, Springer, Berlín
- Pauza CD, Trivedi P, Wallace M y col.** 2000. Vaccination with tat toxoid attenuates disease in simian/HIV-challenged macaques. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 3515-3519
- Peak IR, Srikhanta Y, Dieckelmann M y col.** 2002. Identification and characterisation of a novel conserved outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 70: 6021-6031
- Petrovsky N y Brusic V.** 2002. Computational immunology: the coming of age. *Immunol Cell Biol.*, 80: 248-254
- Pettersson A, Kuipers B, Pelzer M y col.** 1990. Monoclonal antibodies against the 70-kilodalton iron-regulated protein of *Neisseria meningitidis* are bactericidal and strains specific. *Infect Immun*, 58: 3036-3041
- Phizicky EM y Fields S.** 1995. Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*, 59: 94-123
- Pintor M, Criado MT, Ferrón L y col.** 1996. Blocking of iron uptake from transferrin by antibodies against the transferrin binding proteins in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Pathog*, 20: 127-139
- Pintor M, Gómez JA, Ferrón L y col** 1998. Analysis of TbpA and TbpB functionality in defective mutants of *Neisseria meningitidis*. *J Med Microbiol*, 47: 757-760
- Pizza M, Scarlato V, Maignani V y col.** 2000. Identification of Vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, 287: 1816-1820

- Plested JS, Berne L, Philip AC y col.** 2001. Functional opsonic activity of human serum antibodies to inner core lipopolysaccharide (gale) of serogroup B meningococci measured by flow cytometry. *Infect Immun*, 69: 3203-3213
- Plested JS, Makepeace K, Jennings MP y col.** 1999. Conservation and accessibility of an inner core lipopolysaccharide epitope of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 67: 5417-5426
- Pollard AJ.** 2004. Global Epidemiology of Meningococcal Disease and vaccine Efficacy. *Pediatr Infect Dis J*, 23: 274-279
- Poolman JT, Marie S y Zanen HC.** 1980. Variability of low-molecular-weight, heat-modifiable outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 30: 642-648
- Poolman JT, Timmermans HAM, Hopman CTP y col.** 1987. Comparison of meningococcal outer membrane protein vaccines solubilized with detergent or C polysaccharide. *Antonie Leeuwenhoci J microbiol*; 53: 413-419
- Poolman JT, Wientjes FB, Hopman CTP y col.** 1985. Influence of the length of lipopolysaccharide molecules on suerface exposure of class 1 and 2 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* 2996 (B: 2b:P1.2). En: *The Pathogenic Neisseria*. Schoolnik GK, Broks GF, Falkow S y col (eds). p 562. DC: American society for Microbiology, Washington
- Popovic T, Sacchi CT, Reeves MW y col.** 2000. *Neisseria meningitidis* serogroup W135 isolates associated with the ET-37 complex. *Emerg Infect Dis*, 6: 428-429
- Prinz T, Meyer M, Pattersson A y col.** 1999. Structural characterization of the Lactoferrin Receptor from *Neisseria menngitidis*. *J. Bacteriol*, 181: 4417-4419
- Pryde JG.** 1986. Triton X-114: a detergent that has come in from the cold. *Trends Biochem Sci*, 11: 160-163
- Ram S, Mackinnon FG, Gulati S y col.** 1999. The contrasting mechanisms of serum resitance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol*, 36: 945-28
- Reingold AL, Broome CV y Hightower AW.** 1985. Age-specific differences in duration of clinical protection after vaccination with meningococcal polysaccharide A vaccine. *Lancet*, 2: 114-118
- Rennels M, King JJ, Ryall R y col.** 2004. Dosage escalation, safety and immunogenicity study of four dosages of a tetravalent meningococcal polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccine in infants. *Ped Infect Dis J*, 23: 429-435
- Rioux S, Martín D, Ackermann HW y col.** 2001. Localization of surface immunogenic protein on group B streptococcus. *Infect Immun*, 69: 5162-5165
- Rohan TE, Burk RD y Franco EL.** 2003. Toward a reduction of the global burden of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 189: 37-39
- Rokbi B, Renaud-Mongenien G, Mignon M y col.** 2000. Allelic diversity of the two transferring binding protein B gene isotypes among a collection of *Neisseria meningitidis* strains representative of serogroup B disease: implication for the composition of a recombinant TbpB-based vaccine. *Infect Immun*, 68: 4938-4947
- Rosenqvist NE, Musacchio A, Aae A y col.** 1999. Functional activities and epitope specificity of human and murine antibodies against the class 4 outer membrane protein (Rmp) of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 67: 1267-1276

- Rosenstein NE, Pewrkins BA, Stephens DS y col. 2001. Meningococcal disease. *N Engl J Med*, 344: 1378-1388
- Ross BC, Czajkowski L, Hocking D y col. 2001. Identification of vaccine candidate antigens from a genomic analysis of *Porphyromonas gingivalis*. *Vaccine*, 19: 4135-4142
- Rusell JE, Jolley KA, Feavers IM y col. 2004. PorA Variable Regions of *Neisseria meningitidis*. *Emerg Infect Dis*, 10: 674-678
- Ryan ET y Calderwood SB. 2000. Cholera vaccines. *Clin Infect Dis*. 31: 561-565
- Saitou N y Nei M. 1987. Neighborg-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406-425
- Sánchez S. 2002. Evaluación de actividad bactericida cruzada entre especies del género *Neisseria*: Implicación en el desarrollo de la inmunidad natural frente a la meningitis meningocócica. [Tesis Doctoral], Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela
- Sánchez S, Abel A, Arenas J y col. 2006. Cross-linking analysis of antigenic outer membrane protein complexes of *Neisseria meningitidis*. *Res Microbiol*, 157: 136-142
- Sánchez S, Arenas J, Abel A y col. 2005. Analysis of outer membrane protein complexes and heat-modifiable proteins in *Neisseria* strains using two-dimensional diagonal electrophoresis. *J Proteome Res*, 4: 91-95
- Sánchez S, Troncoso G, Criado MT y col. 2002. In vitro induction of memory-driven responses against *Neisseria meningitidis* by priming with *Neisseria lactamica*. *Vaccine*, 20: 2957-2963
- Sánchez S, Troncoso G, Ferreirós CM y col. 2001. Evaluation of cross-reactive antigens as determinants of cross-bactericidal activity in pathogenic and commensal *Neisseria*. *Vaccine*, 19: 3390-3398
- Santos GF, Deck RR, Donnelly J y col. 2001. Importance of complement source in measuring meningococcal bactericidal titers. *Clin Diag Lab Immunol*, 8: 616-623
- Sassetti CM, Boyd DH y Rubin EJ. 2001. Comprehensive identification of condicionally essential genes in *mycobacteria*. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 98: 12712-12717
- Saukkonen R, Leinonen M, Abdillahi H y col. 1989. Comparative evaluation of potential components for group B meningococcal vaccine by passive protection in the infant rat and in vitro bactericidal assay. *Vaccine*, 7: 325-328
- Scarselli M, Giuliani MM, Adu-Bobie J y col. 2005. The impact of genomics on vaccine design. *TRENDS in Biotech*, 23: 84-91
- Serruto DJ, Adu-Bobie, Scarselli M y col. 2003. *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. *Mol Microbiol*, 48: 323-334
- Shea JE, Santangelo JD y Feldman RG. 2000. Signature-tagged mutagenesis in the identification of virulence genes in pathogens. *Curr Opp Microbiol*, 3: 451-458
- Sierakowska A, WillenbrichH, Heijne G y col. 2003. Prediction of lipoprotein signal peptides in gram-negative bacteria. *Protein Sci.*, 12: 1652-1662

- Slauch JM y Camilli A.** 2000. IVET and RIVET: use of gene fusions to identify bacterial virulence factors specifically induced in host tissues. *Methods Enzymol*, 326: 73-96
- Smith PK, Krohn RI, Hermason GT y col.** 1985. Measurement of protein using bicinchononic acid. *Anal Biochem*, 150:76-85
- Steeghs L, Kuipers B, Hamstra HJ y col.** 1999. Immunogenicity of outer membrane proteins in a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response. *Infect Immun*, 67: 4988-4993
- Stephens C, Ross MD y Densen PM.** 1984. Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of *Neisserial* and other infections in an immune deficiency. *Medicine*, 63: 243-267
- Stephens DS, Swartley JS, Kathariou y col.** 1991. Insertion of Tn916 in *Neisseria meningitidis* resulting in loss of group B capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 59: 4097-4102
- Stewartlwey J, Marfin A, Edupuganti S y col.** 1999. Capsule switching of *Neisseria meningitidis* in children. *Infect. Immune*, 94: 271-276
- Sun YH, Bakshi S, Chalmers R y col.** 2000. Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat Med*, 6: 1269-1273
- Swiatlo E y Ware D.** 2003. Novel vaccine strategies with protein antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 38: 1-7
- Tappeo JW, Lagos R, Ballesteros AM y col.** 1999. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *J Am Med Assoc*, 281: 1520-1527
- Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg y col.** 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*, 10: 1809-1815
- Thompson EA, Feavers IM y Maiden CJ.** 2003. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology*, 149: 1849-1858
- Troncoso G, Sánchez S, Kolberg J y col.** 2001. Analysis of the expression of the putatively virulence-associated neisserial protein RmpM in commensal *Neisseria* and *Morasella catarrhalis* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 199: 171-176
- Troncoso G, Sánchez S, Moreda M y col.** 2000. Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and comensal *Neisseria* species. *Immunol Med Microbiol*, 27: 103-109
- Troncoso G.** 2002. Antígenos comunes en el genero *Neisseria*: identificación y caracterización molecular y funcional [Tesis Doctoral], Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela
- Trotter C, Borrow R, Andrews N y col.** 2003. Seroprevalence of meningococcal serogroup C bactericidal antibody in England and Wales in the pre-vaccination era. *Vaccine*, 21: 1094-1098
- Trotter CL, Andrews NJ, Kaczmariski EB y col.** 2004. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet*, 364: 365-367
- Ulbrandt ND, Cassat DR, Patel NK y col.** 2001. Conformational nature of the *Borrelia burgdorferi* decorin binding protein A epitopes that elicit protective antibodies. *Infect Immun*, 69: 4799-4807

- Urwin RI, Holmes EC, Fox AJ y col.** 2002. Phylogenetic evidence for frequent positive selection and recombination in the meningococcal surge antigen PorB. *Mol Biol Evol*, 19: 1686-1694
- Vaitukaitis JL.** 1981. Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections. Langone JJ, van Vunakis H (eds). En: *Methods Enzymology*, 73: p 46, Academic Press, New York
- Van der Ley P, Heckels JE, Virji M y col.** 1991. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria*. *Infect Immun*, 59: 2963-2971
- Van der Ley, Van der Viesen, J Suttmuller R y col** 1996. Sequence variability of FrpB, a major iron-regulated outer-membrane protein in the pathogenic *Neisseriae*. *Microbiology*, 142: 3269-3274
- Vedros NA.** 1984. Genus I. *Neisseria* Trevisan 1885, 105^{AL}. Krieg RN y Holt GJ (eds). En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, p 290. Williams and Wilkins, Baltimore, London
- Vermont C y Dobbeltstein G.** 2002. *Neisseria meningitidis* serogroup B: laboratory correlates of protection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 34: 89-96
- Virji M, Alexandrescu C, Ferguson DJP y col.** 1992. Variations in the expression of pili: the effect on adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol*, 6: 1271-1279
- Vogel U y Frosch M.** 1999. Mechanisms of *Neisserial* serum resistance. *Mol Microbiol*, 32: 1133-1139
- Voort ER, Van der Ley P, Van der Viesen J y col.** 1996. Specificity of human bactericidal antibodies against PorA P1.7,16 induced with a hexavalent meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun*, 64: 2745-2751
- Vretou E, Psarrou E y Spiliopoulou D.** 1992. The role of lipopolysaccharide in the exposure of protective antigenic sites on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J. Gen Microbiol*, 138: 1221-1227
- Wang J, Jarvis GA, Achtman M y col.** 2000. Functional activities and immunoglobulin variable regions of human and murine monoclonal antibodies specific for the P1.7 Por A protein loop of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 68: 1871-1878
- Ward MJ, Lambden PR y Heckels JE.** 1992. Sequence analysis and relationships between meningococcal class 3 serotype proteins and other porins from pathogenic and non-pathogenic *Neisseria* species. *FEMS Microbiol Lett*, 94: 283-290
- Wedeg E, Dalseg R, Caugant DA y col.** 1993. Expression of an inaccessible P1.7 subtype epitope on meningococcal class 1 proteins. *J Med Microbiol*, 38: 23-28
- Wedeg E, Hoiby EA, Rosenqvist E y col.** 1998. Immune responses against major outer membrane antigens of *Neisseria meningitidis* in vaccines and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian serogroup B protection trial. *Infect Immun*, 66: 3223-3231
- Welsch A, Moe G, Rossi R y col.** 2003. Antibody to genome-derived neisserial antigen 2132, a *Neisseria meningitidis* candidate vaccine, confers protection against bacteremia in the absence of complement-mediated bactericidal activity. *J. Infect Dis*, 183: 1730-1739
- Welsch AJ, Rossi R, Comanducci M y col.** 2004. Protective activity of monoclonal antibodies to genome derived *Neisserial* antigen 1870, a *Neisseria meningitidis* candidate vaccine. *J Immunol*, 172: 5606-5615

- West D, Reddin K, Matheson M y col.** 2001. Recombinant *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein a protects against experimental meningococcal infection. *Infect Immun*, 69 : 1561-1567
- Winson MK y Davey MH.** 2000. Flow cytometric analysis of microorganisms. *Methods*, 21:231-240
- Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE y col.** 2001. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*; 69: 1593-1598
- Woods CR, Smith AL, Wasilaukas BL y col.** 1994. Invasive disease caused by *Neisseria meningitidis* relatively resistant to penicillin in North Carolina. *J Infect Dis*, 170: 453-456
- World Health Organization.** 1976. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. *Word Health Organ Techn Rep series*, 594. Geneva, Switzerland
- Wright JC, Williams JN, Christodoulide M y col.** 2002. Immunisation with recombinat Opc outer membrane protein induces a bactericidal immune response against *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 70:4028-4034
- Yazdankhah SP y Caugant DA.** 2004. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol*, 53: 821-832
- Young GM y Miller VL.** 1997. Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Mol Microbiol*, 25: 319-328
- Yu K, Petrovsky YK, Schönbach C y col.** 2002. Methods for prediction of peptide binding to MHC molecules: a comparative study. *Mol Med*, 8: 137-148
- Zagursky RJ y Rusell D.** 2001. Bioinformatics: use in bacterial vaccine discovery. *Biotechniques*, 31: 636-640
- Zangwill KM, Stout RW y Carlone GM.** 1994. Duration of antibody response after meningococcal polysaccharide vaccination in US Air Force personnel. *J Infect Dis*, 169: 847-852
- Zhang C, Anderson A y DeLisi C.** 1998. Structural principles that govern the peptide-binding motifs of class I MHC molecules. *J Mol Biol*, 281: 929-947
- Zhang Q, Pettit E, Burkinshaw R y col.** 2002. Muccosal immune responses to meningococcal conjugate polysaccharide vaccines in infants. *Pediatr Infect Dis J*, 21: 209-213
- Zhu P, Klutch JM, Bash MC y col.** 2002. Genetic diversity of three lgt loci for biosintesis of lipooligosaccharide (LOS) in *Neisseria* species. *Microbiology*, 148: 1833-1844
- Ziegelbauer K y Overath P.** 1993. Organization of two invariant surface glycoproteins in the surface coat of *Tripamosoma brucei*. *Infect Immun*, 61: 4540-4545
- Zimmer MS y Stephens DS.** 2004. Meningococcal conjugate vaccines. *Expert Opin Pharm*, 5: 855-863
- Massari P, Ram S, Macleod H y col.** 2003. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends Microbiol*, 2: 87-93
- Weichselbaum A.** 1887. Ueber die aetiologie der akuten meninigitis cerebror spinalis. *Fortschr Med*, 5: 573-583