

BIBLIOTECA UCM



5306075287

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

# Nuevos métodos para el estudio de la respuesta inmune al polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo B

Tesis para optar al Grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas presentada por  
Jose Diaz Romero.



Madrid, diciembre de 1993

R. 21.782

VºBº, la Directora

Dra. Ingrid M. Outschoorn

Jose Diaz Romero

05252715SX

La presente Tesis ha sido realizada en el Servicio de Inmunología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (junio 1988-diciembre 1993) con fondos aportados por el FISSS (proyecto 87/1512), Ministerio de Sanidad y Consumo. Jose Diaz Romero agradece al Instituto de Salud Carlos III la concesión durante 1988-1991 de una beca predoctoral. Parte de este trabajo ha sido publicado en:

J Immunol.Methods. 160:35-48.1993.

"Polysialic acid. From Microbes to Man". J.Roth, U.Rutishauser and F.A.Troy Editors. Birkhäuser Verlag. Basel. 1993. pg 39-48.

"Recent advances in mucosal immunology".J.McGhee, J.Mestecky, H.Tlaskova and J.Steziel Editors. Plenum publishing corporation. New York. En prensa.



-AGRADECIMIENTOS-

Mi agradecimiento a la Dra. Ingrid M.Outschoorn por la generosa formación científica que me ha aportado durante el periodo de realización de esta Tesis, y por la dirección científica de la misma, a la cual ha dedicado todo su interés y confianza.

Al Dr. Agustín Zapata agradezco su deferencia como tutor de la presente Tesis.

Al Dr. Robert Lifely por su generosa donación de reactivos, sin los cuales no podría haberse llevado a cabo la presente tesis.

A los Drs W.Zollinger, C.Moreno, H.Mäkela y M.Leinonen por sus comentarios y sugerencias.

A Elena Primo, encargada de la Biblioteca del CNMVIS, agradezco las facilidades y sugerencias sobre búsquedas documentales.

Mi reconocimiento a Federico Roman y Luis García Albert por su desinteresada colaboración técnica.





- ÍNDICE -

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1.Meningitis meningocócica: serogrupos asociados	3
1.2.Papel del complemento en la enfermedad meningocócica	6
1.3.Estrategias para el desarrollo de una vacuna para NmgB	7
1.3.1.Antígenos superficiales no capsulares de <i>N.menigitidis</i> grupo B	10
1.3.2.Otros antígenos no-capsulares: las proteasas de IgA	25
1.3.3 La cápsula de NmgB	29
1.4.Antecedentes, objetivos y plan de trabajo	44
2.MATERIALES Y MÉTODOS	47
2.1.Producción de PS-B a pequeña escala	49
2.2.Otros antígenos meningocócicos	51
2.3.Anticuerpos polisacárido-específicos	52
2.4.Inmunizaciones	52
2.5.Ensayos de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación	53
2.6.Obtención de sueros como fuente de complemento	55
2.7.Método de minicolumnas centrifugadas	56
2.8.Biotinilación de polisacáridos	58
2.9.Determinación de biotina incorporada	59
2.10.Enzimoimmunoensayos	61
2.10.1.ELISA anti-PS-B con pre-recubrimiento con poli-L-lisina	61
2.10.2.ELISA con recubrimiento con bacterias formalinizadas	62
2.10.3.ELISA anti-PS-B con prerecubrimiento con lectinas	62
2.10.4.Ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina	63
2.10.5.ELISA anti-PS-B con pre-recubrimiento con estreptavidina	63
2.10.6.Enzimoimmunoensayo competitivo directo (EIA)	65
2.10.7.ELISA anti-PS-B con pre-recubrimiento con BSA biotinilado-avidina	67
2.10.8.ELISA anti-polisacárido en fase líquida	67
2.10.9.ELISA anti-polisacárido revelado con complemento	68
2.11.Ensayos hemolíticos	70
2.11.1. Espectrofotometría a 405 nm	70
2.11.2. Actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina	72
2.11.3. Citofluorimetría de flujo	73
3.RESULTADOS	75
3.1.Producción de PS-B a pequeña escala	77
3.2.Preparación y calibración de minicolumnas	78
3.3.Biotinilación	81
3.4.Determinación de biotina incorporada por molécula de PS-B	82
3.5.Ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina	84

3.6.ELISA anti-PS-B con prereducubrimiento con lectinas . . . . .	85
3.7.ELISA anti-PS-B con prereducubrimiento con estreptavidina . . . . .	87
3.7.1.Sensibilidad . . . . .	87
3.7.2.Titulación de sueros de ratón PS-B específicos . . . . .	89
3.7.3.Evaluación de bloqueantes . . . . .	91
3.7.4.Análisis de las condiciones óptimas del ensayo . . . . .	92
3.8.Estudios de inhibición mediante EIA competitivo . . . . .	94
3.9. Estudio de la respuesta inmune a PS-B en diferentes especies	
animales . . . . .	96
3.9.1.Conejo . . . . .	97
3.9.2.Hámster . . . . .	101
3.9.3.Ratón . . . . .	102
3.10.Nuevos formatos de ELISA . . . . .	104
3.10.1.ELISA en fase líquida . . . . .	104
3.10.2.ELISA revelado con complemento . . . . .	105
3.11 Nuevos formatos de ensayos hemolíticos . . . . .	107
3.11.1.Espectrofotometría a 405 nm . . . . .	107
3.11.2.Actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina . . . . .	109
3.11.3.Citofluorimetría de flujo . . . . .	111
4.DISCUSIÓN . . . . .	113
4.1.ELISA: algunas consideraciones teóricas . . . . .	114
4.2.Utilización de lectinas con especificidad para siálico . . . . .	115
4.3.La biotilación selectiva . . . . .	116
4.4.Incubaciones extendidas con AP . . . . .	118
4.5.El ELISA con recubrimiento con estreptavidina . . . . .	119
4.6.Efecto del bloqueante en el ELISA anti-PS-B . . . . .	121
4.7.Características del reconocimiento de polyNeuNA $\alpha$ 2-8 por	
anticuerpos específicos: dependencia de la temperatura . . . . .	122
4.9.El ELISA en fase líquida . . . . .	127
4.10.ELISA revelado con complemento . . . . .	129
4.11.Ensayos hemolíticos . . . . .	130
4.12.El papel de anticuerpos anticapsulares en la protección contra	
NmgB . . . . .	131
4.13.Estructura de la cápsula: cationes divalentes y a.nucléicos . . . . .	134
5.CONCLUSIONES . . . . .	137
6.BIBLIOGRAFÍA . . . . .	141



- ABREVIATURAS -

AP	Fosfatasa alcalina
BSA	Albumina de suero bovino
Cps	Complejo génico de la cápsula meningocócica
DAB	Diaminobencidina
EcK1	Escherichia coli K1
EIA	Enzimoimmunoensayo
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción unido a enzima
ET	Tipos electroforéticos
FCS	Suero de ternera fetal
HA	Ensayo de hemaglutinación
HABA	Acido 4-hidroxiazobenceno-2'-carboxílico
HIA	Ensayo de inhibición de la hemaglutinación
IgA-Prot	Proteasas de IgA
IRPs	Proteínas reguladas por hierro
KDO	ácido 2-ceto-3-desoxi-octulosónico
LNnT	Lacto-N-neotetraosa
LOS	Lipooligosacáridos
LPS	Lipopolisacáridos
ManNAc	N-acetil manosamina
MIRP	IRP principal
NCAM	Molécula de adhesión celular neural
NeuNac	Acido N-acetil-neuramínico
NHS	Suero humano normal
Nmg	Neisseria meningitidis
OMPs	Proteínas principales de membrana externa
OPD	o-Fenilendiamina
OS	Oligosacáridos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Salino tamponado con fosfato
PBS-T	PBS conteniendo 0,05% de Tween 20
PEP	Fosfoenol piruvato
PL	Fosfolípido
pNPP	P-Nitrofenil fosfato
PolyNeuNac $\alpha$ 2-8	Homopolímero de NeuNac unido por enlaces $\alpha$ 2-8
PS-B	Polisacárido capsular de NmgB
SDS	Dodecil sulfato sódico
SkIM	Leche descremada
SRBC	Eritrocitos de carnero
TBPs	Proteínas de unión a Transferrina
TBS-Ca	Salino tamponado con Tris con cloruro cálcico 0,1M
UP	Undecaprenol
WGA	Aglutinina de germen de trigo

# 1.INTRODUCCIÓN



### 1.1.Meningitis meningocócica: serogrupos asociados

La meningitis meningocócica se mantiene en la actualidad como un importante problema sanitario tanto en países desarrollados como en el tercer mundo. En estos últimos se ha llegado a estimar en 330.000 el número de personas/año que contraen enfermedad meningocócica con un resultado de 35.000 muertes (221). *Neisseria meningitidis* (Nmg), un diplococo gram-negativo, es un parásito específicamente humano, aunque es posible producir meningitis en monos mediante inyección intraespinal con cultivos puros del organismo (236). Las cepas virulentas (es decir las aisladas de la corriente sanguínea o líquido cefalorraquídeo) están asociadas invariablemente con una cápsula que rodea y ayuda al organismo a evadir los sistemas de defensa del huésped (156).

La adquisición de meningitis meningocócica se produce mediante gotas en suspensión, el medio de dispersión del microorganismo, seguida por colonización de la nasofaringe. El transporte de organismos en la misma es relativamente común (5-30 % dependiendo de la estación), pero solo ocasionalmente el estado de portador progresa hasta causar síntomas de enfermedad (16,156). Nmg puede causar diferentes síndromes clínicos que van desde septicemia meningocócica fulminante con choque séptico, fallo orgánico múltiple y muerte, a meningococemia benigna e incluso se han descrito varios tipos clínicos de artritis asociados con infección meningocócica (237), pero la presentación más habitual es la meningitis. La forma más común de la enfermedad se produce por invasión del meningococo de la corriente sanguínea, y penetración de la barrera hematoencefálica (meninges,

y de ahí el nombre de la enfermedad). Los organismos son entonces capaces de multiplicarse en el líquido cefalorraquídeo originando la inflamación del cerebro, que a menudo conduce a la muerte o al retardo mental.

El mecanismo de transición de transporte asintomático a infección invasiva es desconocido, en parte debido a la falta de un modelo animal efectivo que reproduzca todas las etapas de la enfermedad humana. Varias especies animales incluyendo monos, conejos, cobayos, ratas, ratones y embriones de pollo han sido utilizados en el estudio de la patogénesis meningocócica (18). Los modelos de infección intraperitoneal tanto de ratón como de rata recién nacida han sido ampliamente utilizados en estudios de protección pasiva para la evaluación de vacunas para NmgB (235,289). Aunque tienen la ventaja de su simplicidad, estos modelos no reproducen adecuadamente la ruta de infección en la enfermedad humana. Recientemente se ha desarrollado un modelo de infección intranasal de ratón recién nacido que a pesar de utilizar la ruta natural de la infección para la enfermedad, reúne sólo algunas de las características de un modelo animal ideal para el estudio de la meningitis (164). Factores tales como la infección previa por ciertos virus (113,219) o la no-secreción de antígenos del grupo sanguíneo ABO (32,308), han mostrado una correlación, a partir de datos epidemiológicos, con la predisposición a adquirir la enfermedad. El curso de la enfermedad puede ser muy rápido, y la secuencia que va desde síntomas destacables o diagnosis a fallecimiento puede producirse en el plazo de 24 horas.

*Nmg, Haemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae, causantes de*

aproximadamente el 75% de meningitis bacteriana, tienen en común cápsulas polisacáridicas que parecen jugar un papel fundamental en la patogénesis (32). Las cápsulas en Nmg están formadas por polisacáridos aniónicos de alto peso molecular, y son la base para la clasificación serológica de la especie en distintos serogrupos: A, B, C, 29-E, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z (21,257). La meningitis meningocócica es una enfermedad extendida por todo el mundo tanto en forma endémica como epidémica. La enfermedad endémica tiene una tasa de entre 1-5/100.000 por año, mientras que se han producido epidemias con tasas de hasta 500/100.000 (156). Aunque la proporción de enfermedad meningocócica debida a serogrupos individuales varia de país a país, mas del 95 % de la enfermedad es originada por cepas de los serogrupos A, B, C, Y, y W-135 (289). Los serogrupos X, Z y 29E están solo raramente asociados con enfermedad y los pacientes con estas infecciones tienen por lo general alguna forma de inmunodeficiencia (122). Los serogrupos A, B y C constituyen mas del 90% de los aislados de pacientes, constituyendo el grupo B por si solo entre el 50 y 70% de los casos. Una alta proporción de meningococos aislados de nasofaringe son no-serogrupables. En un estudio de transporte nasofaríngeo en una población que experimentaba enfermedad debida a una cepa B:15:16 (42), aproximadamente la mitad de las cepas identificables como la cepa epidémica por la presencia de los antígenos de serotipo y subtipo (ver mas abajo), eran no-serogrupables. Parece existir una tendencia para que la expresión de la cápsula de ciertos meningococos se pierda durante el transporte nasofaríngeo. Cepas no capsuladas son fácilmente eliminadas por el suero humano normal y, por este motivo, son incapaces de causar enfermedad sistémica. Sin embargo, existen algunas evidencias de que el

polisacárido capsular impide la unión a las células mucosales de tal manera que la expresión de menos polisacárido en la superficie celular podría ayudar a la colonización de la nasofaringe (247,283).

## **1.2.Papel del complemento en la enfermedad meningocócica**

Existen evidencias sustanciales que apoyan un papel único del sistema de complemento en la prevención de la enfermedad meningocócica (55,56,72). Esta es la infección mas habitual padecida por individuos con deficiencias de complemento. La frecuencia de estados de deficiencias de complemento hereditarias en pacientes con enfermedad por Neisseria es de un 5-10% (72). La enfermedad meningocócica es característica tanto de individuos con deficiencias en una de las proteínas de la vía alternativa de complemento (properdina o factor D), que son incapaces de activar esta vía pero poseen una vía clásica intacta (192,241), como de individuos con deficiencias en alguno de los componentes terminales del complemento, que son incapaces de ensamblar el complejo de ataque de la membrana y expresar actividad bactericida dependiente de complemento (13). En ambos casos, aproximadamente el 60% de estos individuos desarrollan la infección durante la adolescencia, pero mientras en el caso de deficiencias de la vía alternativa esta resulta en una alta tasa de mortalidad (50%) y la recurrencia de la infección es poco frecuente, en el caso de deficiencias en componentes terminales de complemento la tasa de mortalidad es menor y casi la mitad de los individuos que desarrollan la infección experimentan recurrencia. Estos hechos ponen de manifiesto la importancia tanto de una vía alternativa intacta

como de la actividad bactericida dependiente de complemento como mecanismos básicos de defensa del organismo frente a infecciones por Nmg. La eficiencia de vacunas meningocócicas debería correlacionarse por tanto con la inducción y persistencia de anticuerpos bactericidas dependientes de complemento.

### **1.3. Estrategias para el desarrollo de una vacuna para NmgB**

NmgB es en la actualidad la causa mas común de meningitis bacteriana en países industrializados después de *Haemophilus influenzae* tipo b, que puede desaparecer pronto cuando la nueva vacuna desarrollada para esta última (25,54,271) sea de uso general. Además, aunque son las cepas de grupo C, y especialmente las de grupo A en el cinturón de meningitis africano y en la República Popular China (2,287), las principales causantes de meningitis bacteriana epidémica, el grupo B ha sido reconocido como el causante de la alta prevalencia de enfermedad mantenida en varias áreas hiperendémicas, incluyendo Noruega (222), las islas Faroe (294) y ciertas partes de Inglaterra (290). En España el serogrupo B es responsable de meningitis endémica en Galicia y ha sido el serogrupo predominante en las últimas ondas epidémicas (91% de los casos en la onda epidémica de 1980) (71,236).

A finales de la década de los 60 se desarrollaron vacunas para los meningococos del serogrupo A y C (93,296); estas vacunas estaban constituidas de polisacárido capsular purificado de alto peso molecular derivado del organismo respectivo: un homopolímero lineal formado por residuos O-acetilados en la



posición 3 de manosamina-6-fosfato unidos por enlaces (1-6) en el caso del serogrupo A, y un homopolímero lineal formado por residuos O-acetilados en la posición 7 y/o 8 (forma O-acetil positiva) o no acetilados (O-acetil negativa) de ácido N-acetil-neuramínico unido por enlaces (2-9) en el caso del serogrupo C. Su seguridad y eficacia ha sido demostrada en cierto numero de ensayos de campo

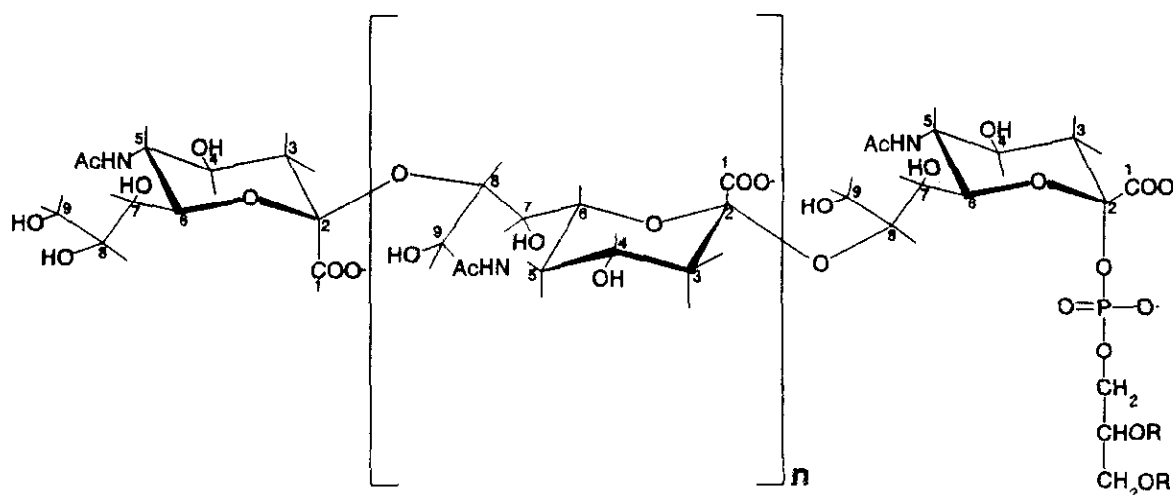


Figura 1. Estructura del polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

controlados y situaciones epidémicas, aunque la vacuna de serogrupo C es ineficaz en niños menores de 2 años de edad (el grupo de edad mas susceptible a la enfermedad) y la de serogrupo A en niños menores de 6 meses, y lo efectos a largo plazo de la vacunación con la vacuna de polisacáridos A+C han resultado insatisfactorios (44,52). Con posterioridad los polisacáridos W-135 e Y han sido incorporados en una vacuna tetravalente A/C/Y/W-135, dejando al serogrupo B

como el único serogrupo patogénico de meningococo para el que no existía una vacuna disponible.

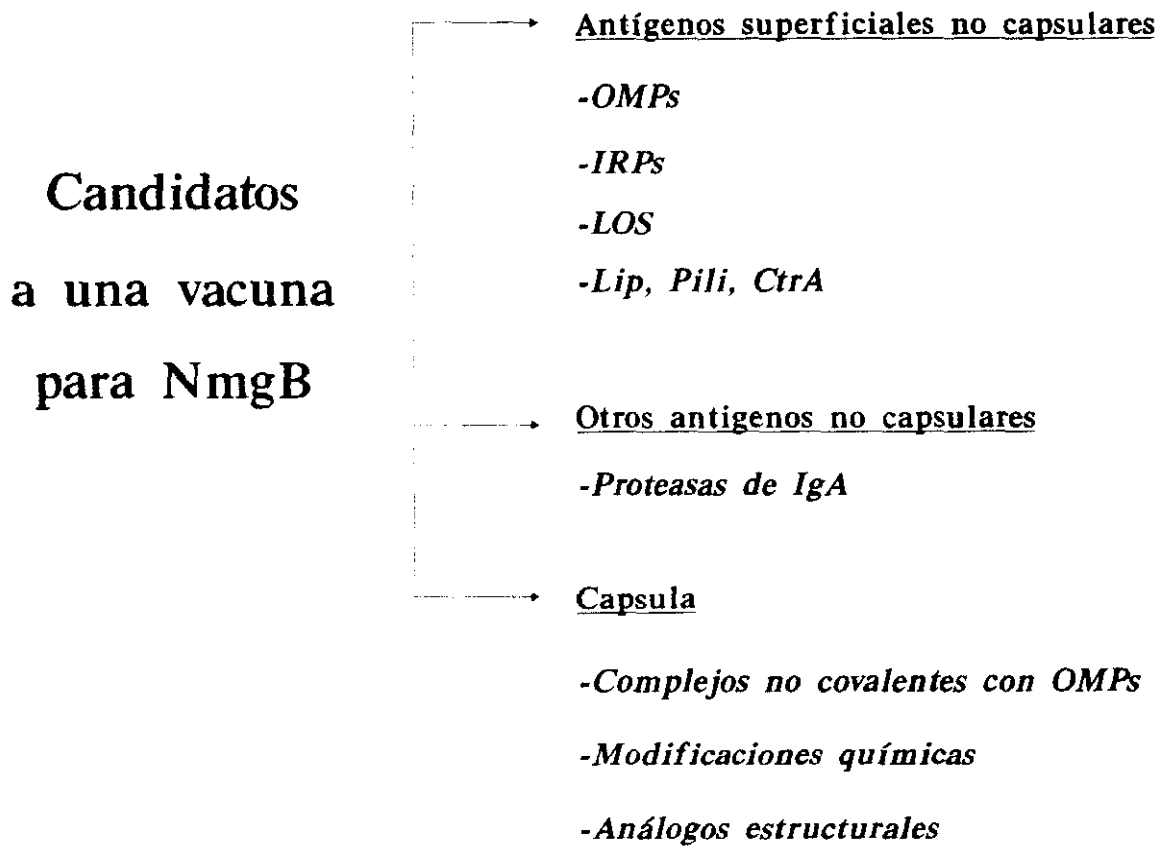


Figura 2. Candidatos a una vacuna para *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

El fallo en la obtención de una vacuna serogrupo-B se ha debido a la falta de inmunogenicidad en humanos de su polisacárido capsular, un homopolímero formado por residuos de ácido N-acetil-neuramínico unidos por enlaces alfa (2-8) (Fig.1) (156). El estudio de antígenos no capsulares presentes en la superficie externa del meningococo o secretados por este, el aumento de la inmunogenicidad del polisacárido capsular, y la inducción de anticuerpos anti-capsulares mediante

el empleo de inmunógenos estructuralmente similares, han sido las alternativas elegidas para el desarrollo de una vacuna válida para el serogrupo completo (Fig. 2).

### **1.3.1. Antígenos superficiales no capsulares de *N. meningitidis* grupo B**

La búsqueda del antígeno ideal como potencial candidato a vacuna para el meningococo B ha convertido la superficie externa de Nmg en una de las envueltas celulares más estudiadas. Fruto de estos estudios no sólo se ha avanzado en la comprensión de los diferentes mecanismos de virulencia y patogenicidad asociados a esta envuelta, sino que la metodología resultante de estas investigaciones ha podido aplicarse al desarrollo de otras vacunas contra bacterias capsuladas. Así la vacuna desarrollada contra *Haemophilus influenzae* tipo b consta de polisacárido capsular conjugado a proteínas de membrana externa meningocócicas, utilizadas por sus propiedades inmunogénicas (11,65).

Dos requisitos fundamentales debe reunir un antígeno para considerarlo como candidato a una vacuna para todo el serogrupo B: que este conservado entre las diferentes cepas del serogrupo y que induzca anticuerpos bactericidas, de especial importancia en la protección contra las cepas de Nmg (242).

#### **1.3.1.1. Proteínas principales de membrana externa**

Las bacterias gram-negativas poseen una envuelta celular que comprende dos capas lipoidales situadas a cada lado de un estrato de peptidoglicano

semirígido. La más exterior, denominada membrana externa, esta formada por una compleja mezcla de proteínas y lipooligosacáridos incorporados en una bicapa lipídica. Contiene de 3 a 5 proteínas de membrana externa (OMPs) mayoritarias subdivididas en 5 diferentes clases estructurales que se correlacionan con sus pesos moleculares aparentes en geles SDS-PAGE:  $46.000 \pm 1.000$ ,  $41.000 \pm 1.000$ ,  $38.000 \pm 1.000$ ,  $33.000 \pm 1.000$  y  $28.000 \pm 1.000$ , designándose clase 1 a clase 5 respectivamente (79).

Todas las cepas meningocócicas expresan una proteína de clase 2 o de clase 3 pero nunca ambas simultáneamente, lo que ha llevado a agrupar estas dos clases en una sola (2/3) (188). Estas proteínas tienen función de porina, muestran homología con las proteínas gonocócicas IA (clase 3) y IB (clase 2), y son la base del sistema de tipaje para meningococos: existen aproximadamente 20 serotipos diferentes dentro de los serogrupos B y C de Nmg basados en las diferencias inmunológicas de las proteínas clase 2/3, mientras que el serogrupo A reacciona mayoritariamente con monoclonales específicos para los serotipos 4 y 21 (292). Los epítopos de serotipo de las proteínas de clase 2 y 3 parecen tener un fuerte componente conformacional y en las proteínas clase 3 se han propuesto dos regiones de variabilidad, expuestas en la superficie celular, asociadas con la especificidad de serotipo (300). Mediante la utilización de un modelo de protección animal en rata recién nacida se ha demostrado que anticuerpos monoclonales a la clase 2/3 eran solo ocasionalmente protectores y bactericidas (235).

Las proteínas de clase 1, para las que se ha demostrado una función de

porina con una ligera selectividad catiónica (268,269), están presentes generalmente en la mayoría de los serotipos, pero puede estar ocasionalmente ausente en algunos aislados y existe una considerable variación en su nivel de expresión: en algunos casos su tasa de expresión se puede ver reducida durante el curso de una infección (79,130). En contraste con otras proteínas de membrana externa, no se conoce el equivalente de esta proteína en gonococos. La variación antigénica de esta proteína define el subtipo de una cepa meningocócica (69,254). Hasta la fecha han sido producidos 15 monoclonales contra 15 diferentes subtipos y se ha demostrado la unión de dos diferentes monoclonales de subtipo a algunas proteínas de clase 1 (293). De forma análoga a las proteínas clase 3, dos regiones variables principales se encuentran presentes en las secuencias aminoácidas de diferentes proteínas de clase 1 en las que se encuentran localizados los epítomos específicos del subtipo (20,195). Estos inicialmente parecían ser de naturaleza lineal, e inaccesibles a anticuerpos específicos en la célula intacta de algunas cepas, pero estudios más recientes realizados con péptidos cíclicos apuntan a la naturaleza conformacional de los epítomos de clase 1 (47,293). Aunque anticuerpos a proteínas clase 1 eran protectoras en el modelo de rata recién nacida anteriormente mencionado, la protección parecía ser tipo-específica (235).

Las proteínas de clase 5, análogas a las proteínas II de gonococos, presentan una modificabilidad por calor característica: la proteína solubilizada a 37°C migra más rápidamente que solubilizada a 100°C en SDS-PAGE (5). Las proteínas clase 5 no solo muestran heterogeneidad inter-cepa, sino que pueden presentarse dos tipos de variabilidad intra-cepa: variación de fase (variación en los niveles de

expresión) y variación antigénica (expresión de múltiples versiones de la proteína). Hasta 4 diferentes variantes de clase 5 se han observado en una única cepa de Nmg y una única cepa puede expresar simultáneamente dos proteínas de clase 5. *Anticuerpos bactericidas específicos para epítomos superficialmente expuestos de proteínas clase 5 son demasiado específicos de cepa para poder considerar estas proteínas como relevantes a la hora de incluir en una supuesta vacuna.*

Recientemente se ha descrito una nueva proteína de membrana externa, clase 5c (70), con un peso molecular similar al de las proteínas clase 5 pero que muestra solo una débil homología con estas y una secuencia conservada entre cepas. Estudios recientes han mostrado un importante papel para esta proteína en la colonización e invasión del epitelio mucosal (283). Anticuerpos monoclonales humanos contra esta proteína mostraban efecto bactericida contra cepas de *N.meningitidis* que expresaban niveles altos de proteína 5c pero fallaban en manifestar este efecto en la cepa de laboratorio B385 (70). La mayoría de los meningococos de aislados infecciosos probablemente no sean susceptibles a este mecanismo bactericida puesto que solo expresan cantidades pequeñas o indetectables de 5C (223).

La proteína clase 4 parece ser muy estable y conservada en todas las cepas meningocócicas y muestra considerable homología con la proteína III presente en gonococos y con una porción de la proteína de membrana externa OmpA de *Escherichia coli*. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína III también reaccionan con la proteína clase 4, pero no solo no promueven actividad

bactericida, sino que inhiben el efecto bactericida mediado por anticuerpos dirigidos contra otros antígenos de la membrana externa (188).

### **1.3.1.2. Proteínas reguladas por hierro**

Otro componente importante de la membrana externa son las proteínas reguladas por hierro (IRPs). La capacidad de un patógeno bacteriano para adquirir hierro es un determinante crítico en la patogénesis, y el meningococo no es una excepción. Un ejemplo de esto es el aumento de la letalidad de meningococos después de la inclusión de diferentes compuestos que contienen hierro en un modelo de infección murina (46). La disponibilidad de hierro inorgánico en el hospedador humano es extremadamente baja (185), y las principales fuentes de hierro comprenden la hemoglobina y las proteínas transportadoras de hierro transferrina y lactoferrina (24). La mayoría de los patógenos bacterianos emplean sideróforos, agentes quelantes de hierro solubles de bajo peso molecular que tienen la capacidad de competir con las proteínas de unión al hierro del hospedador, e internalizar el hierro después de unirse a receptores de membrana (185,209). Nmg parece incapaz de sintetizar sideróforos y es capaz de secuestrar hierro directamente a partir de transferrina (24,71,101), lactoferrina (209) y hemoglobina (149) mediante procesos mediados por receptores: las IRPs, proteínas de membrana externa inducibles en condiciones de limitación de hierro. Mientras que la proteína de unión a lactoferrina ha sido identificada como una IRPs de 105 kDa específica para lactoferrina humana, las proteínas de unión a transferrina (TBPs), específicas también para la proteína humana (8), presentan una gran

heterogeneidad tanto de tamaño como antigénica (71,101): recientemente se ha descrito una TBP1 con un peso molecular de 98 kDa (incapaz de unir transferrina después de SDS-PAGE) y una TBP2 con un peso molecular que varía de 68 a 85 kDa (capaz de unir transferrina humana después de SDS-PAGE y electroblotting), pero anteriormente se había descrito una proteína de 70-71 kDa que no era idéntica a TBP2 (24,209) e incluso una proteína denominada IRP principal (MIRP) de 36-37 kDa que parecía unirse también a transferrina (185). Recientemente se ha identificado la presencia de una proteína de unión a hemoglobina expuesta superficialmente en Nmg y que parece no ser específica de serogrupo (149). A diferencia de otras IRPs, la proteína de unión a hemoglobina es capaz de unir tanto la proteína humana como la bovina, sugiriéndose que sea la fracción hemo el ligando reconocido por la proteína.

Los estudios sobre antigenicidad e inmunogenicidad de IRPs se han centrado principalmente en los receptores de transferrina. Los estudios sobre la proteína de 70 kDa indicaban la posibilidad de obtener anticuerpos bactericidas contra esta proteína pero estrictamente específicos de cepa, apuntando a la variabilidad antigénica de los epítomos expuestos por esta proteína (209). Trabajos sobre TBP2, molecularmente heterogéneas, han proporcionado evidencias sobre la existencia de dominios antígenicos comunes entre las TBP2s de Nmg e incluso de *N.gonorrea* e *H.influenzae* tipo b, pero no aportaban datos sobre la exposición de estos epítomos en el organismo intacto (251). Recientemente se ha demostrado que el receptor de transferrina humano es expresado *in vivo* y se encuentra expuesto en la superficie de Nmg (7). Potencialmente, anticuerpos que bloquearan la adquisición de hierro,



podrían ser protectores sin tener que mediar necesariamente actividad bactericida dependiente de complemento (306).

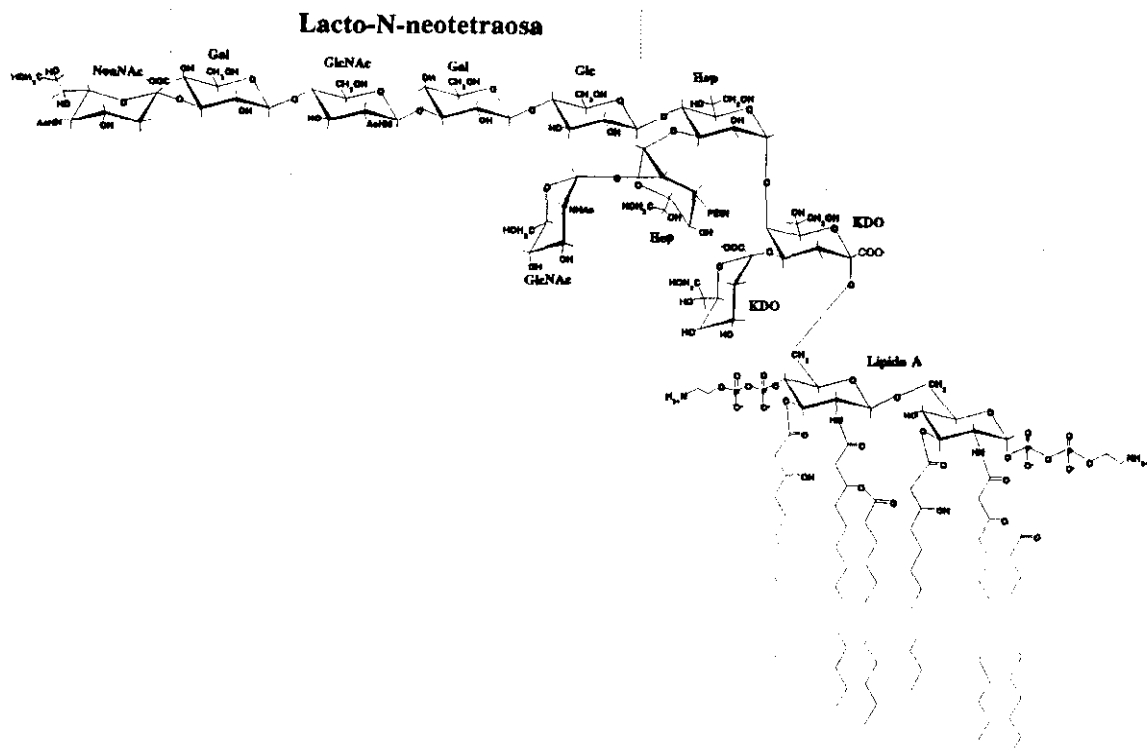
### 1.3.1.3. Lipooligosacaridos

Algunos componentes de la membrana externa de las bacterias gram-negativas están glicosilados, capacitando al organismo para interactuar con ambientes acuosos. Los glicolípidos de bacterias entéricas, que viven en ambientes ricos en ácidos biliares, se denominan lipopolisacaridos (LPS) y constan de tres dominios estructurales. El más externo es el polisacárido O-específico o antígeno O (200), largo, hidrofílico y neutral; está formado por unidades repetitivas de oligosacaridos y porta la principal especificidad serológica, ayudando a prevenir la dispersión de las membranas lipídicas de la bacteria por ácidos biliares (99). El polisacárido O-específico está unido a un oligosacárido central, unido a su vez a un glicolípido basal, lípido A, anclado a la membrana externa y asociado con los efectos biológicos de toxicidad del LPS (endotoxina) que suelen acompañar a bacteremias debidas a microorganismos gram-negativos (200,216). Los glicolípidos de las especies de *Neisseria*, así como de otras bacterias que colonizan superficies mucosales no bañadas por ácidos biliares (tractos respiratorio y genital), carecen del polisacárido O-específico, pero también tienen un oligosacárido unido al lípido A y son denominados lipooligosacaridos (LOS) (88,145).

Se han definido 12-13 tipos diferentes de LOS entre aislados de *Nmg* (103,275), conocidos como inmunotipos y caracterizados mediante anticuerpos

monoclonales. Los inmunotipos de LOS se utilizan para completar el sistema de serotipaje anteriormente descrito, y la clasificación serológica completa de un aislado meningocócico incluye el serogrupo de polisacárido, el serotipo de proteína clase 2/3, el subtipo de proteína clase 1 y el inmunotipo de LOS (79).

Paralelamente al anterior sistema de tipaje, los meningococos pueden también dividirse en tipos electroforéticos (ET) mediante electroforesis enzimática multilocus (43,229,292). El tipaje ET examina diferencias electroforéticas en 10-15 enzimas requeridas para el crecimiento de la bacteria. Los ETs han sido agrupados en clones y subgrupos o complejos ET (287,288). Este tipo de análisis ha revelado que la diversidad genética en Nmg es mayor que la de cualquier otra especie bacteriana analizada por el mismo método hasta la fecha (aunque los aislados de serogrupo A son relativamente homogéneos en comparación con los de otros serogrupos), y que la distribución de serotipos y patrones electroforéticos de OMPs entre cepas tiene poca relación con la estructura genética clonal de la población (43). El sistema más reciente para caracterizar cepas de Nmg se basa en la variabilidad del gen *porA*, que codifica la OMP clase 1, discriminando aislados sobre la base de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción derivados de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (132). Mediante este método se ha podido comprobar la gran diversidad existente entre aislados de NmgB.



**Figura 3.** Estructura del lipooligosacárido de *Neisseria meningitidis*. Inmunotipo L3 (204). Abreviaturas empleadas: NeuNAc = ácido siálico; Gal = galactosa; GlcNAc = N-acetil-glucosamina; Glc = glucosa; Hep = heptosa; KDO = ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico; PEtN = fosfoetanolamina.

Los LOS de las cepas de *Neisseria* están compuestos de uno a seis componentes que pueden separarse por SDS-PAGE y cuyos pesos moleculares relativos se ha estimado que van de 3.150 a 7.100 (135). La movilidad electroforética heterogénea de los componentes de LOS refleja principalmente diferencias en las composiciones químicas de sus oligosacáridos (OS), que también cuentan para las diferencias antigénicas. La estructura de los OS de algunas cepas ha sido dilucidada. Estos OS tienen estructuras bi o triantenarias con ácido 2-ceto-3-desoxi-octulosónico (KDO), a través del cual se unen al lípido A, en el extremo reductor y contienen de 8 a 10 unidades de azúcar con fosfoetanolamina en

cantidad y localización variables (Fig.3). En el extremo no-reductor de la antena mas larga se encuentra, en 8 de los 13 inmunotipos de LOS (263), una estructura también presente en los glicoesfingolípidos de la serie paraglobósido, un precursor de los antígenos del grupo sanguíneo humano: el tetrasacárido Lacto-N-neotetraosa (LNnT) (166). Esta estructura esta polisialidada en las membranas de células humanas y las especies meningocócicas que producen ácido siálico (serogrupos B, C, W e Y) también sialidan el sustituyente de LNnT de sus LOS (100,204,298). De los 13 inmunotipos de LOS tres son prevalentes: L3,7,9, L2 y L1 (en orden decreciente), conteniendo los dos primeros LNnT, que ha demostrado ser no inmunodominante en L3,7,9 (274). Mediante los progresos habidos en la química orgánica de síntesis ha sido posible la preparación de diferentes estructuras que mimetizan el epítipo interno de estos inmunotipos prevalentes eliminando la presencia de LNnT (272).

Con respecto a la preparación de una posible vacuna, solo los OS se han considerado generalmente adecuados para este propósito puesto que el lípido A es responsable de la inducción del choque séptico (216,272,285), aunque recientemente se han realizado los primeros estudios con LOS incorporado en liposomas (208), lo que permite una disminución en su toxicidad. Para su utilización como vacuna los OS deben ser acoplados a soportes protéicos (62) y para ello se han desarrollado procedimientos de conjugación que preservan lo grupos fosfoetanolamina, importantes para la inmunogenicidad de los OS (103,273). Como soportes protéicos se han utilizado tanto toxóide tetánico como proteínas de membrana externa meningocócicas (276).

Los últimos estudios realizados a cabo sobre OS-conjugados presentan resultados contradictorios (103,276). En el primero de estos estudios y utilizando un OS que carecía del fragmento de LNnT procedente de una cepa grupo A conjugado con toxóide tetánico (103), se obtuvieron antisueros de conejo con actividad bactericida contra la cepa A homóloga (L8,10,11) y contra otras dos cepas grupo B que compartían el epítipo L8, aunque esta actividad bactericida era baja. En el segundo de estos estudios y a partir de los resultados obtenidos utilizando OS de dos de los inmunotipos prevalentes, L3,7,9 y L2, sobre diferentes soportes protéicos, se llegaba a la conclusión de que sería difícil, sino imposible, inducir anticuerpos anti-LOS bactericidas contra los inmunotipos más prevalentes en una población heterogénea con este tipo de conjugados (276).

#### 1.3.1.4.Lip, pili y CtrA

Además de los vistos hasta el momento, otros antígenos investigados como posibles candidatos para el desarrollo de una vacuna han sido el antígeno Lip, los pili y CtrA.

El antígeno Lip es un antígeno superficial común a las especies de Neisseria patogénicas pero ausente en especies no-patogénicas. Este antígeno, inicialmente designado como H.8 (29), es una lipoproteína con un peso molecular aparente que varía entre 18 y 30 kDa. Anticuerpos dirigidos contra este antígeno reconocen tanto epítipos continuos como conformacionales, pero ninguno de ellos mostraba capacidad de promover actividad bactericida con complemento (30,260).

Los pili son apéndices superficiales que expresa Nmg en las superficies mucosales humanas y que facilitan la unión del organismo a las células del hospedador (248,281,282). Los principales componentes de los pili meningocócicos son subunidades polipeptídicas repetitivas denominadas pilinas, que presentan epítomos comunes tanto a meningococos como a gonococos. Pero estos epítomos comunes no son por lo general inmunogénicos después de infección con meningococos o gonococos, probablemente a causa de la inaccesibilidad de los mismos en los pili ensamblados de estos microorganismos.

Otro antígeno alternativo a la cápsula, pero estrechamente relacionado con esta, ha sido identificado a partir de estudios realizados sobre los mecanismos de expresión y translocación del polisacárido capsular de NmgB (PS-B). Se trata de una proteína de membrana externa, integrante de un complejo sistema de transporte de la cápsula, denominada CtrA (83). CtrA tiene propiedades de lipoproteína, esta presente exclusivamente en Nmg y no en otras especies de *Neisseria*, sean o no patogénicas, y se encuentra muy conservada entre las cepas meningocócicas B, C, W-135 e Y, cuyas cápsulas están compuestas de ácido neuramínico, ya sea como homopolímero o como heteropolímero. El análisis de su estructura secundaria revela una estructura comparable a las de otras proteínas de la membrana externa con función de porina, y a falta de otros datos de antigenicidad, se considera en principio a CtrA como candidato potencial para el desarrollo de una vacuna.

### 1.3.1.5. Ensayos clínicos con vacunas basadas en antígenos superficiales no capsulares: vesículas de membrana externa

Durante la última década se han evaluado en ensayos clínicos la eficacia de vacunas basadas en vesículas de membrana externa meningocócicas. Estas son liberadas al medio a partir de evaginaciones de la membrana externa de la bacteria durante la fase logarítmica de crecimiento (58). Las vesículas de membrana externa son desprovistas de LOS y pueden combinarse con polisacárido capsular meningocócico para mejorar su solubilidad (78).

Una vacuna de proteínas de membrana externa de una cepa B:15:P1.3 acomplejadas no covalentemente a polisacárido capsular grupo C y absorbidas sobre hidróxido de aluminio, fue ensayada para comprobar su eficacia en Iquique, Chile, en 1987-1989 (302). Estaba prácticamente desprovista de LOS (un 0,1%) y el componente protéico no estaba mayoritariamente en forma de vesículas, sino que se presentaba en forma de agregados protéicos multiméricos de unos 250 kDa. La vacuna inducía principalmente anticuerpos no funcionales, algunos de los cuales estaban dirigidos contra OMP clase 1. No había una inducción de anticuerpos funcionales en un porcentaje suficientemente alto de individuos vacunados (eficacia de un 51%), y la respuesta de anticuerpos no persistía demasiado tiempo.

A partir de una vacuna cubana basada en una cepa epidémica en Cuba, B:4:P1.15, se han realizado ensayos clínicos en Cuba, entre 1987-1989, y en Sao Paulo, Brasil, entre 1989-1990 (53,240). Los componentes de la vacuna son OMPs

purificadas enriquecidas con un complejo de proteínas de alto peso molecular (65-95 Kd) de naturaleza no muy bien caracterizada (306). El complejo esta conjugado no covalentemente con polisacárido capsular grupo C, absorbido sobre hidróxido de aluminio y contiene aproximadamente un 1% de LOS. En el ensayo realizado en Cuba la eficacia global notificada era de un 80%, mientras que en Sao Paulo, donde se efectuó un estudio de eficacia por grupos de edad, la eficacia alcanzaba un 74% en niños mayores de 4 años mientras que esta eficacia caía en los grupos de menor edad.

En Noruega se han llevado a cabo ensayos con una vacuna basada en OMPs de la cepa B:15:P:1.7,16 preparada mediante extracción con desoxicolato (31,222). El preparado contenía OMPs clase 1, 3 y 5 absorbidas sobre hidróxido de aluminio, además de otros componentes protéicos minoritarios. Asimismo, contenía un 8% de LOS y un 12% de desoxicolato pero no contenía cantidades substanciales de polisacárido meningocócico. Una gran proporción de los anticuerpos bactericidas estimulados por esta vacuna parecen ir dirigidos contra 5C (223), mientras que eran cepas meningocócicas de clase 3 y no-tipables hacia las que se dirigía la actividad opsonica (105). La eficacia de la vacuna en un ensayo llevado a cabo entre niños de 12 a 16 años es de un 57%, y el estudio concluía que la vacuna no era suficientemente eficaz para ser considerada de uso general (31).

Una limitación para las vesículas de membrana externa como vacuna contra NmgB es que la protección inducida es serotipo o subtipo específica (276). Aunque



se han establecido asociaciones entre algunos serotipos y subtipos determinados con brotes epidémicos en regiones concretas, en períodos de baja incidencia las cepas causantes de enfermedad son muy heterogéneas y con un importante porcentaje de cepas no serotipables (20,130,266). Por otra parte, las cepas prevalentes en una región geográfica no coinciden necesariamente con los de otra: las combinaciones de antígeno de serotipo y subtipo 15:P1.16, 4:P1.15 y 2a:P1.2, asociadas con epidemias en el norte de Europa no se encontraron en aislados de un reciente estudio realizado en Grecia (266). Incluso dentro de una misma región se producen cambios en los serotipos prevalentes (229). Para conseguir una protección amplia para una determinada región geográfica la vacuna debería contener de 5 a 10 diferentes OMPs (276). El problema no puede resolverse simplemente combinando diversas preparaciones de vesículas de membrana externa, puesto que originaría altos niveles de LOS por dosis de vacuna con el riesgo de efectos secundarios inaceptables.

Recientemente la tecnología de ácido desoxiribonucleico recombinante ha permitido clonar y secuenciar la estructura de genes estructurales de ciertas proteínas de membrana externa (306). Mediante esta tecnología se han empezado a realizar estudios para la construcción de cepas para vacunas multivalentes mediante la inserción de genes adicionales que codifican para OMP clase 1 (269). Hasta el momento se han producido cepas que producen dos proteínas clase 1 distintas, y actualmente se trabaja en la posibilidad de aumentar el número de insertos. Vesículas de membrana externa procedentes de este tipo de cepas, con diferentes combinaciones de tres subtipos de clase 1, podrían combinarse para

constituir una potencial vacuna multivalente contra los subtipos más prevalentes.

### 1.3.2.Otros antígenos no-capsulares: las proteasas de IgA

Las proteasas de IgA (IgA-Prot) son otro antígeno no capsular, y no superficial, que ha sido propuesto para el desarrollo como posible candidato para el desarrollo de una vacuna que potencialmente podría ofrecer protección no sólo contra NmgB, sino contra otros serogrupos de la especie, e incluso otras especies productoras de estas proteasas (87,162). IgA-Prot han sido identificadas como enzimas extracelulares de bacterias que causan infecciones: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitior* poseen actividad de IgA-Prot (133,138). Todos los organismos que las producen, aunque diversos y no relacionados taxonómicamente, están implicados o en enfermedades que tienen lugar inicialmente en membranas mucosas donde la IgA esta presente, o en la iniciación de la placa dental. No pueden identificarse IgA-Prot en especies de los géneros anteriores consideradas generalmente como no patógenas para el hombre.

Las IgA-Prot comparten características comunes: son enzimas proteolíticas microbianas extracelulares dependientes de metales que tienen actividad óptima a pH neutro y actividad autoproteolítica. Su único sustrato conocido es IgA1 humana, el isotipo de IgA presente de forma mayoritaria en suero y en secreciones del tracto respiratorio superior (37,133), y la IgA de gorila y chimpancé (50,220,238). IgA2, isotipo mayoritario en secreciones de colon y recto, es

resistente a la acción de estas proteasas.

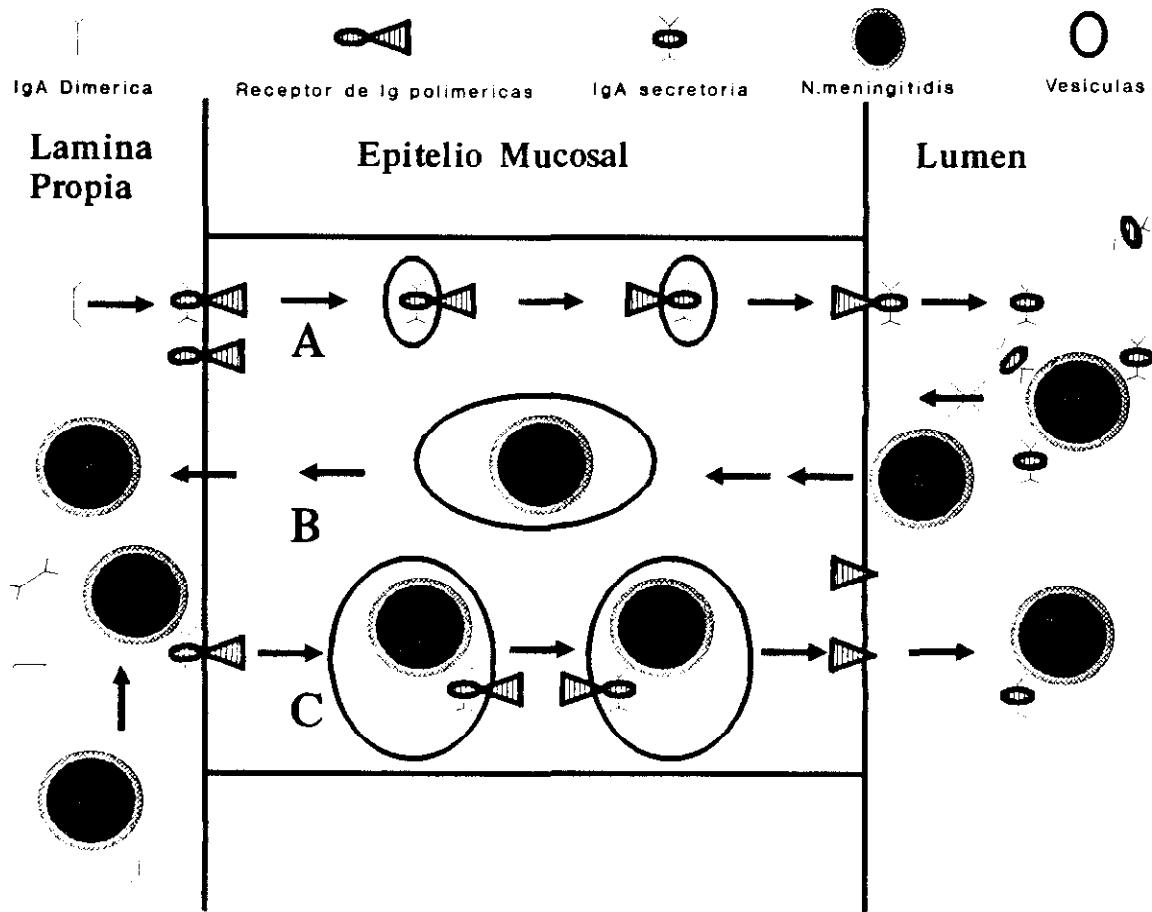
Las IgA-Prot rompen un único enlace peptídico en un octapéptido duplicado que se encuentra en la región bisagra de la cadena pesada de IgA1: Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser (187), liberando fragmentos intactos de Fab $\alpha$  monoméricos, que retienen completamente la capacidad de unión al antígeno, y de Fc (o Fc-componente secretorio) (133). Nmg produce dos tipos de enzimas mutuamente excluyentes en una misma cepa: la tipo 1 que parte la cadena  $\alpha$  entre la Pro 237 y la Ser 238, y la tipo 2 que rompe el enlace peptídico entre la Pro 235 y la Thr 236. Aunque la mayoría de las cepas del serogrupo A producen proteasas tipo 1 y las de serogrupo X e Y producen proteasas tipo 2, entre la mayoría de los otros serogrupos, en cualquier serogrupo dado, unas cepas producen tipo 1 y otras producen tipo 2. La mayor parte de los clones de meningococos asociados con epidemias producen una proteasa de tipo 1 (162).

Los papeles específicos para IgA1 y las IgA-Prot en la patogénesis de infecciones mucosales no están demasiado claros. Las inmunoglobulinas A secretorias actúan como la primera línea de defensa mucosal del hospedador interfiriendo con la adhesión y colonización microbiana (106). IgA tiene actividad antibactericida dependiente de anticuerpos mediada por monocitos, en ausencia de complemento añadido (163,201). Mediante este mecanismo dependiente de Fc $\alpha$  se promovería la capacidad de monocitos locales y macrófagos para limitar la multiplicación bacteriana en tejidos mucosales, disminuyendo la oportunidad de invasión sistémica por bacterias patogénicas. Por otra parte se le ha atribuido una

función excretora a IgA (173,174). El transporte activo de inmunocomplejos de IgA por células epiteliales mucosales mediante transcitosis desde la superficie basal a la apical mediada por el receptor de inmunoglobulinas poliméricas, cuyo dominio externo es el componente secretorio (144,186), parece ser un importante y eficiente mecanismo de exclusión de antígeno de la circulación sistémica (127) y podría operar también mediante la exclusión de esta de diferentes patógenos, bacterias capsuladas incluidas (Fig.4). La ruptura de IgA en la región bisagra puede interferir con las funciones asociadas tanto con Fc como con la del receptor de inmunoglobulinas poliméricas. Los fragmentos Fab $\alpha$  y Fc $\alpha$  resultantes de la ruptura proteolítica de IgA1 secretoria por las proteasas serían incapaces de inducir aglutinación bacteriana e inhibir la adherencia bacteriana (37). Además los fragmentos Fab $\alpha$ , mediante su unión a epítomos superficiales bacterianos, podrían proteger a la bacteria bloqueando el acceso de moléculas de anticuerpo intactas.

Se sabe poco sobre la inmunogenicidad y antigenicidad de las IgA-Prot. Existen algunos datos que sugieren que pacientes con infecciones causadas por Neisserias producen anticuerpos contra IgA-Prot y un estudio realizado en Gambia durante una epidemia meningocócica (40), mostró claramente que las IgA-Prot producen una respuesta de anticuerpos durante la enfermedad clínica o después del transporte nasofaríngeo. En estudios llevados a cabo en conejos se han obtenido anticuerpos policlonales capaces de reconocer proteasas de diversas cepas de *N.gonorrhoeae* y Nmg(33) y de inhibir la actividad enzimática de todas las proteasas meningocócicas independientemente de su tipo (162), un hallazgo de potencial significación para la posible aplicación de IgA-Prot en una vacuna contra

la enfermedad meningocócica.



**Figura 4.** Modelo hipotético de la excreción de Nmg por IgA específica. A. Transporte de IgA dimérica desde la lámina propia al lumen mediado por el receptor de inmunoglobulinas poliméricas. B. Adhesión al epitelio mucosal e inhibición de esta por IgA específica. C. Excreción de Nmg mediada por IgA. Basado parcialmente en (174).

### 1.3.3 La cápsula de NmgB

#### 1.3.3.1 Presencia de polisialico $\alpha$ 2-8 en células bacterianas y animales

Una de las superficies externas más comunes asociadas con procariotas son las cápsulas, superficies altamente hidratadas que pueden proteger a la célula contra la desecación y formar una barrera externa contra fagos, toxinas y agentes antibacterianos (94). Las características físico-químicas de la cápsula parecen constituir una ventaja significativa para la célula capsulada en su entorno natural (27). La cápsula de la mayor parte de las bacterias gram negativas esta compuesta de polisacáridos hidrofílicos que portan cargas negativas (28). El ácido N-acetil-neuramínico (NeuNAc), formando parte de diferentes polímeros, es una estructura presente en la cápsula de diferentes bacterias (57): aparte del serogrupo B esta presente en los grupos C, Y y W135 de Nmg, en *E.coli* K9 y K92, y en los tipos I, II y III de estreptococo grupo B. La cápsula de NmgB esta formada por un homopolímero de unos 200 residuos de ácido N-acetil-neuramínico unido por enlaces  $\alpha$  2-8 (polyNeuNAc $\alpha$ 2-8) (107,157,206). Esta estructura es química e inmunológicamente indistinguible a la encontrada en el polisacárido capsular de *Escherichia coli* K1 (EcK1) (128), el principal causante de meningitis en recién nacidos (34,136,218,232), y esta presente también en *Pasteurella haemolytica* serotipo A2, un importante patógeno veterinario (3), y en *Moraxella nonliquefaciens*, un comensal nasal usualmente no patogénico recobrado del 17% de especímenes nasales humanos (36,57). Vacunas basadas en polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 tendrían la ventaja única de basarse en un epítipo presente en todas las cepas de NmgB y EcK1 (116).

Esta estructura se encuentra también presente en la superficie de células animales, donde se ha propuesto como un marcador de plasticidad (226). La molécula de adhesión celular neural (NCAM) es una glicoproteína integral de membrana que puede promover adhesión célula-célula mediante un mecanismo de unión homofílico (228). La molécula se presenta en varias formas moleculares que difieren en su contenido de carbohidrato: existe una forma altamente sialidada que existe prevalentemente en cerebro embrionario y recién nacido, que es gradualmente reemplazada por una forma menos sialidada a medida que progresa el proceso de desarrollo. Anticuerpos dirigidos contra la cápsula del meningococo grupo B reconocen también la forma altamente sialidada de NCAM (73,79). Uno de los modelos propuestos para explicar las propiedades de regulación de la adhesión del polyNeuNA $\alpha$ 2-8 es mediante simples mecanismos físicos estéricos y de repulsión de carga que regularían el espacio intercelular. El polyNeuNA $\alpha$ 2-8 aumentaría el espacio entre membranas de diferentes células, disminuyendo la tasa de unión entre receptores de estas (1,228,299). Cambios en la longitud del polyNeuNA $\alpha$ 2-8 en el NCAM han mostrado modular las propiedades de adhesión de esta molécula durante el desarrollo embrionario (225). Otro de los modelos para explicar las propiedades de adhesión del polyNeuNA $\alpha$ 2-8 es el reconocimiento por ligandos y la participación en transmisión de señales intracelulares (226,230). A este respecto es interesante señalar la existencia de una hipótesis que sugiere la presencia de sitios de unión específicos en el cerebro para polímeros de siálico, lo que explicaría las infecciones dirigidas hacia este órgano por bacterias que portan cápsulas con esta estructura (136).

NCAM polisialidado se presenta también en el riñón en desarrollo y en tumores de Wilm, un tipo embrionario de tumor de riñón (146,225). Investigaciones de un amplio rango de tumores han indicado que muchos tumores neuroendocrinos expresan NCAM polisialidado. Estos incluyen feocromocitoma, carcinoma de células pequeñas de pulmón, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, tumores de pituitaria, teratomas y carcinomas medulares del tiroides (193,225). Un papel generalizado del polyNeuNA $\alpha$ 2-8 del NCAM en potencial de invasividad y metastático de tumores es difícil de asumir puesto que existen muchos tumores humanos altamente invasivos que no exhiben un marcaje superficial con polyNeuNA $\alpha$ 2-8 y, por otra parte, este marcaje se presenta en ciertos tejidos normales en adultos: el polyNeuNA $\alpha$ 2-8 parece encontrarse ampliamente distribuido en cerebro de rata adulto, tanto asociado a NCAM como a la subunidad alfa de los canales de sodio dependientes del voltaje (309). En situaciones específicas, la presencia de polyNeuNA $\alpha$ 2-8 junto con una variedad de otros factores podría contribuir al potencial de crecimiento invasivo y metastático de tumores (225).

El punto de vista de que el uso de una vacuna basada en el polyNeuNA $\alpha$ 2-8 podría iniciar procesos autoinmunes debido a la presencia de esta estructura en NCAM (74), no se ve respaldado por los hechos. A pesar de que se piensa que diversas complicaciones presentes durante la fase de recuperación de una meningitis, incluyendo artritis, pericarditis y síndrome de conus medullaris, son el resultado de la respuesta inmune del hospedador al meningococo (249), el responsable de este tipo de respuesta parece ser una proteína de stress



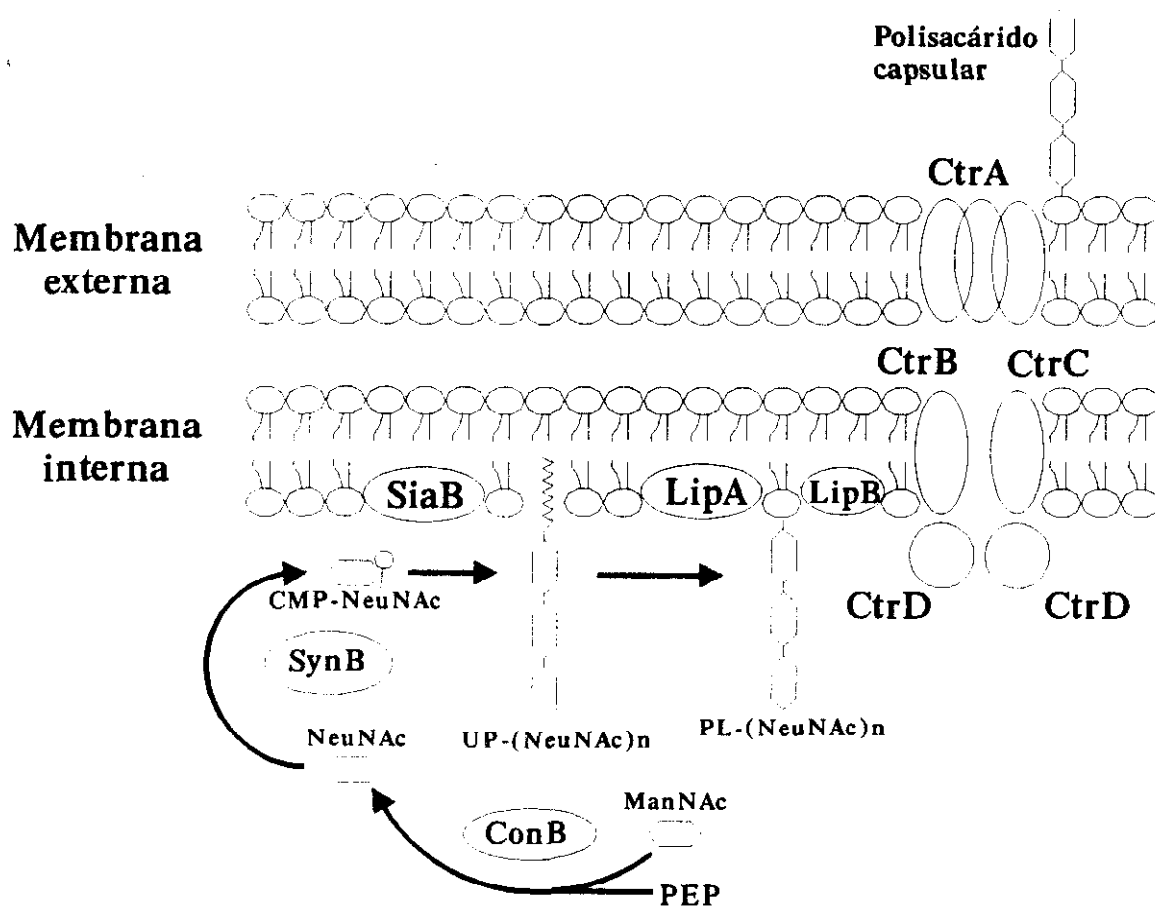
meningocócica que puede inducir anticuerpos con reactividad cruzada a determinantes del hospedador (17,202). Vacunas que contenían tanto proteínas de serotipo como polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 han sido ensayadas tanto en modelos animales (159), como en niños y adultos (303), sin ningún efecto perjudicial (303), y animales hiperinmunizados con NmgB no manifiestan ningún síntoma anómalo a pesar de que se llegan a obtener altos niveles de anticuerpos (9,34). La ausencia de enfermedades autoinmunes detectables en un paciente con una gammopatía monoclonal que poseía niveles extremadamente altos de un anticuerpo específico para polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 y que reaccionaba también con DNA desnaturalizado (86,124,126), es otro argumento a favor de los esfuerzos destinados al desarrollo de una vacuna anticapsular para NmgB.

### **1.3.3.2.Mecanismos moleculares de la expresión de la cápsula**

Las cápsulas de NmgB, EcK1 y *H.influenzae* tipo b, los serotipos predominantes asociados con sépsis y meningitis en recién nacidos y niños pequeños, comparten propiedades genéticas y bioquímicas comunes por lo que han sido clasificados dentro de un mismo grupo de polisacáridos capsulares denominado grupo II (35,81). Los genes requeridos para la biosíntesis y expresión de la cápsula de NmgB están localizados en un fragmento cromosómico de 24 Kb denominado complejo génico de la cápsula meningocócica (cps) (85). Dentro de cps pueden definirse 5 regiones diferentes: A, B, C, D y E. Los genes que codifican todas las enzimas necesarias para la síntesis del polímero se encuentran localizados en la región A (80,270). Esta región expresa 4 proteínas diferentes de pesos

moleculares 38.000, 18.200, 38.300 y 54.400. La proteína de 38,3 Kd es una enzima condensante que sintetiza el monómero del polisacárido por condensación de N-acetil-manosamina (ManNAc) y fosfoenol piruvato (PEP), mientras que la proteína de 18,2 Kd exhibe actividad sintetasa, transfiriendo moléculas de NeuNAc al estado activado, CMP-NeuNAc (Fig.5). Ambas enzimas actúan en el citoplasma. En contraste, la actividad de polisialiltransferasa asignada a la proteína de 54,4 kda que polimeriza el CMP-NeuNAc para formar polyNeuNAc $\alpha$ 2-8, esta asociada a la membrana interna bacteriana. Además, se ha descrito al undecaprenol (UP) como una molécula aceptora necesaria para el proceso de polimerización (171). No se le ha asignado actividad enzimática alguna a la proteína de 38 kd.

Las regiones B y C del cps están implicadas en procesos de transporte (80,81). Las cápsulas de las bacterias gram negativas parecen estar unidas a una fracción lipídica que probablemente actúa como anclaje hidrofóbico en la membrana externa bacteriana (244). En NmgB es un fosfolípido (PL) unido covalentemente al extremo no reductor el responsable de mantener unido al polisacárido a la membrana externa de la bacteria (92). Este fosfolípido presumiblemente actúa también anclando el polisacárido a la membrana interna (80), proceso fundamental para la translocación, y su incorporación al polisacárido parece estar mediada por la región B. Esta región codifica dos proteínas con masas moleculares de 45,1 y 48,7 kda denominadas LipA y LipB respectivamente en base a su supuesta función de incorporación del fosfolípido (84).



**Figura 5.** Modelo de la expresión del polisacárido capsular de NmgB. Abreviaturas incluidas en el texto. Adaptado de (80).

La región C controla el proceso de transporte propiamente dicho (81). Esta región codifica 4 proteínas con masas moleculares de 41, 42, 30 y 25 Kda denominadas CtrA, CtrB, CtrC y CtrD respectivamente. CtrA se encuentra localizada en la membrana externa y tiene una estructura comparable al de otras proteínas con función de porina (83), por lo que se ha propuesto que CtrA pueda formar un poro en la membrana externa por el que podría pasar el polisacárido

cápsular maduro (80). CtrB y CtrC son proteínas de membrana interna (80,81) y parece poco probable que formen un poro en la membrana interna por el cual podría pasar el polisacárido al periplasma, sino que funcionarían mediante un mecanismo de transporte activo tipo "flipasa" (84,109).

A las regiones D y E de cps se les ha asignado funciones regulatorias en la expresión de la cápsula (80). También existen evidencias preliminares de que estas regiones participan en la biosíntesis y ensamblaje de los LOS.

### **1.3.3.3. Estructura de la cápsula**

En contraste con la composición química y actividades biológicas de las cápsulas, se sabe poco sobre la formación y organización estructural de las macromoléculas ensambladas que constituyen el dominio capsular en la bacteria viva. Esta falta de conocimiento se debe en gran medida a las características biofísicas de las cápsulas que han generado una serie de obstáculos técnicos para su estudio. Las cápsulas contienen más de un 95% de agua (27). Esta naturaleza hidratada de la cápsula la hace difícil de observar mediante microscopía electrónica. Los polímeros de la cápsula colápsan fácilmente cuando son deshidratados durante el procesamiento de la muestra.

Con objeto de prevenir el colapso estructural de la cápsula durante la fijación y deshidratación, se han desarrollado diversos procedimientos para la estabilización de la misma. Los más utilizados son la estabilización mediante cargas catiónicas,

el empleo de anticuerpos anticapsulares, y la criofijación seguida por sustitución por congelación (27).

La criofijación congela instantáneamente los polímeros de las cápsulas en su estado completamente hidratado, y en el proceso de sustitución el agua es sustituida lentamente con un solvente orgánico (94). Mediante esta técnica se ha podido observar la cápsula de EcK1 (10). La micrografía electrónica revela dos capas: una interna y una externa. En la capa interna un material fibroso forma un estrato denso que probablemente consta de una serie de haces gruesos dispuestos perpendicularmente a la superficie de la membrana externa. En contraste, la parte externa de la cápsula consta de fibras finas que se disponen en forma de una trama. El grosor completo de la cápsula es de unos 10 nm, valor notoriamente inferior en comparación con el de otras cápsulas: la cápsula de *Klebsiella pneumoniae* que tiene una disposición en capas similar tiene un grosor de unos 160 nm (10). En contraste con estos datos, y estabilizando la cápsula mediante anticuerpos, se han obtenido unos valores de espesor para la cápsula de EcK1 muy superiores: más de 300 nm (140). Aunque el aumento en tamaño de la cápsula por tratamiento con anticuerpos específicos, "swelling", es un fenómeno conocido desde antiguo (27,179), una diferencia de más de 30 veces es difícilmente explicable en función únicamente de éste fenómeno. En la actualidad no se disponen de datos de microscopía electrónica de la cápsula de NmgB y la posible extrapolación de datos de los obtenidos con EcK1 debe ser realizada con sumo cuidado.

#### 1.3.3.4.Función barrera de la cápsula

A pesar de que existen evidencias en otras bacterias de que la cápsula podría no funcionar como una barrera a las reacciones inmunes con la superficie celular (179), no está claro que esto pueda ser de aplicación general para todas las bacterias capsuladas. Para ciertos organismos, el polisacárido capsular parece funcionar como una barrera física: la presencia de una cápsula puede impedir el acceso de leucocitos fagocíticos a fragmentos opsonizados unidos a estructuras subcapsulares (169). De hecho existen numerosos indicios que sugieren que las cápsulas de Eck1 y NmgB ejercen dicha función.

La cápsula de Eck1 parece bloquear tanto la aglutinación por anticuerpo anti-O (250,279), como la unión directa a la región núcleo interna del LPS (89,239). En NmgB la cápsula bloquea la aglutinación mediada por la aglutinina de germen de trigo (WGA), que es específica para los residuos de N-acetil-glucosamina presentes en los LOS (75). En aislados de líquido cefalorraquídeo, se observa un pobre marcaje del epítipo de la proteína de membrana externa P3.15 cuando se examina por microscopía electrónica, lo que sugiere un impedimento estérico por otras moléculas superficiales (286), siendo la cápsula el candidato obvio para este papel.

Sin embargo, la mejor evidencia de función barrera de la cápsula proviene de la capacidad inherente de esta para bloquear la vía alternativa de complemento. Existe una gran cantidad de estudios que ponen de manifiesto la importancia de la cápsula en NmgB, así como en Eck1, como factor de virulencia (4,136,172). En

ausencia de anticuerpos, la capacidad de activación de la vía alternativa de complemento por NmgB es una función de su contenido en ácido siálico asociado a la célula. La cápsula de ácido siálico impide la actividad bactericida de la vía alternativa (115). Anticuerpo inmune tanto de la clase IgM, dirigido contra la cápsula, como IgG dirigido contra antígenos no capsulares, pueden aumentar la función de la vía alternativa, aunque mediante diferentes mecanismos. Mientras que la unión de IgG a antígenos no capsulares aumenta la deposición tanto de C3 como del factor B sobre la superficie bacteriana, IgM promueve lisis independientemente de la cantidad de C3 y factor B depositados, y por tanto en una forma más efectiva que IgG (115). Una hipótesis barajada para explicar este comportamiento se basa en un modelo de accesibilidad: IgM podría alterar la carga y conformación terciaria de la cápsula, exponiendo sitios líticos previamente protegidos o redirigiendo la deposición de complemento de sitios no líticos a sitios líticos.

#### **1.3.3.5. Estrategias para aumentar la respuesta a polyNeuNA $\alpha$ 2-8**

Generalmente la respuesta inmune a polisacáridos purificados es timo-independiente, con producción de anticuerpos IgM y no se observa un aumento de la respuesta por repetidas inmunizaciones (62,156). En contraste con la mayoría de las bacterias capsuladas, tanto las cápsulas de EcK1 y NmgB son pobres inmunógenos tanto en forma de organismos inactivados con formalina como en forma de polisacáridos purificados (61,197), aunque es posible obtener un antisuero capsular de alto título en caballo mediante inyecciones intravenosas

repetidas de NmgB formalinizados (9).

La inducción de una respuesta inmune a polisacáridos puede ser aumentada inyectando el polisacárido (o oligosacáridos de este) acoplado, covalente o no covalentemente, a soportes protéicos (62,156,175). Esto generalmente resulta en un cambio del antígeno de timo-independiente a timo-dependiente, una respuesta más fuerte que la del polisacárido solo y la inducción de anticuerpos IgG y células memoria, como ha sido demostrado para los polisacárido capsulares de los meningococos A y C (52), el de *Haemophilus influenzae* tipo b (12), el de neumococos (205,277), o el del estreptococo grupo B (148,203).

El toxóide tetánico ha sido uno de los soportes protéicos utilizados para la preparación de conjugados protéicos de polyNeuNAc $\alpha$ 2-8, tanto con el polisacárido completo (119), como con oligosacáridos obtenidos de este (210). A pesar de que mediante este abordaje era posible convertir los conjugados de los polisacáridos de Nmg A y C en inmunógenos T-dependientes y obtener altos títulos de anticuerpos específicos de estos polisacáridos, la inmunogenicidad del polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 no era aumentada por este procedimiento.

Las proteínas de membrana externa formando un complejo no covalente con el polyNeuNAc $\alpha$ 2-8, probablemente a través de la cola lipídica del polisacárido (184), han demostrado ser el soporte protéico idóneo para aumentar la respuesta anticapsular en conjunción con polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 sin modificar, a pesar de que los diferentes métodos de acoplamiento han resultado en una respuesta variable al



polisacárido (77,159,305). Aunque es posible obtener buenos títulos de anticuerpos específicos de polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 en ratones inmunizados con el complejo, estos se restringen al isotipo IgM (59,158,184). El complejo ha demostrado proporcionar protección en ratones frente a Nmg B (184), frente a EcK1 en conejos recién nacidos de madres vacunadas con el complejo (155), e inducía en humanos una respuesta de anticuerpos anti-polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 biológicamente activos en un modelo de protección pasiva en ratón (158).

Otra estrategia para mejorar la inmunogenicidad de polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 ha sido la modificación química de este, mediante el reemplazamiento de los grupos N-acetilo de los residuos de NeuNAc con grupos N-propionilo, manipulación que no altera en modo alguno la antigenicidad a anticuerpos específicos (120). Aunque el polisacárido modificado sigue siendo muy poco inmunogénico, su conjugación con toxóide tetánico produce niveles mucho más altos de anticuerpos anticapsulares en ratones que el conjugado homólogo con el polisacárido sin modificar (116). La respuesta de inducida por este conjugado incluía anticuerpos del isotipo IgG: una población de anticuerpos del isotipo IgG1 que unía polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 purificado y no eran bactericidas, y una segunda población de anticuerpos de isotipo IgG2a e IgG2b que se unían sólo a polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 asociado a la célula o acoplado vía un brazo espaciador largo a una columna inmunoabsorbente y que eran bactericidas y eficaces en ensayos de protección pasiva en ratón (22,117,118). Recientemente ha sido licenciada una vacuna basada en esta tecnología con la que se espera realizar en breve ensayos en humanos [W.D. Zollinger, comunicación personal].

Por último, otro abordaje empleado en la inducción de anticuerpos anticapsulares contra Nmg B, se ha basado en el empleo de polisacáridos con estructuras similares. La existencia de reactividad cruzada entre Nmg y *N.lactamica* llevaron a postular la existencia de cápsulas antigénicamente similares en ambos organismos (170), aunque estudios posteriores invalidaron dicha hipótesis demostrando que la reactividad cruzada radicaba en epitopos presentes en los LOS (134). Los trabajos más prometedores en esta línea han sido realizados con *E.coli* K92. La cápsula de este organismo es un homopolímero de NeuNAc unido de forma alternativa por enlaces  $\alpha$ 2-8 y  $\alpha$ 2-9 (161), y esta estructura ha sido previamente empleada para inducir anticuerpos contra la cápsula de Nmg C (90). La utilización de conjugados del polisacárido de *E.coli* K92 con toxóide tetánico ha demostrado inducir anticuerpos tanto anti-polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 como anti-polyNeuNAc $\alpha$ 2-9, incluyendo anticuerpos del isotipo IgG (233). Esto supone la ventaja añadida de poder potencialmente constituir una vacuna que pudiera proteger contra infecciones causadas por Nmg B, Nmg C y Eck1.

#### **1.3.3.6. Estudio de la respuesta a polyNeuNAc $\alpha$ 2-8: cuestiones metodológicas**

En 1987, y a requerimiento de la Organización mundial de la salud (OMS), se publicaron unos estudios sobre una agenda global para el desarrollo de vacunas contra bacterias encapsuladas (98), a partir de los cuales se estableció un programa estratégico, aún vigente en la actualidad, para el desarrollo de diferentes vacunas, incluida una para NmgB. Una de las cuestiones abiertas que deberían resolverse según este estudio hacia referencia a las de tipo metodológico.

Los métodos empleados para cuantificar anticuerpos anti-polisacárido de diferentes isotípos continúan siendo insatisfactorios y carentes de reproductibilidad, a pesar de los numerosos ensayos propuestos y utilizados en diversos laboratorios. El inmunoensayo empleado más frecuentemente para la medida de anticuerpos emplea la absorción pasiva de anticuerpos sobre un soporte, y principalmente sobre placas de microtitulación, mediante el denominado ensayo de inmunoabsorción unido a enzima (ELISA). El ELISA es simple, rápido y versátil, y se ha utilizado de forma generalizada para el diagnóstico serológico en microbiología, parasitología e inmunología. No implica el uso de radiaciones peligrosas ni equipos costosos, y los reactivos necesarios tienen una vida media larga. Sin embargo, ha surgido cierta controversia respecto a si el ELISA mide realmente la concentración de anticuerpos o la afinidad de los mismos. Puesto que un ensayo en fase sólida discontinuo comprende dos ciclos de tres lavados y un paso durante el cual se añade un segundo anticuerpo, existe un riesgo de disociación del anticuerpo primario, y no sería sorprendente que anticuerpos de baja afinidad pudieran no detectarse. La posibilidad de que los datos del ELISA se correlacionen mejor con la afinidad del anticuerpo que con su concentración representa un impedimento para este tipo de ensayo (207).

La medida de anticuerpos a carbohidratos de la superficie celular por ELISA se ve dificultado por el fallo de polisacáridos libres de lípido o proteína en adherirse de forma eficiente y reproducible a una fase sólida (26). Polisacáridos cargados negativamente no se unen bien al poliestireno empleado habitualmente en ELISAs. En un intento de resolver este problema se han desarrollado varios métodos para

unir polisacárido a placas de microtitulación. El empleo de anticuerpos de captura (301), viene limitado en este caso por la gran dificultad en producir reactivos inmunológicos con especificidad para el PS-B. La unión covalente a poli-L-lisina (180) o tiramina (14), además de ser complejo y tedioso, introduce el riesgo de alterar la reactividad inmunológica del PS-B. El prereducimiento con poli-L-lisina (152) genera una proporción señal/ruído baja, reaccionando inespecíficamente con algunos sueros (141). Recientemente, un nuevo procedimiento de ELISA que emplea albúmina de suero humano metilada ha sido empleado con éxito con los polisacáridos capsulares de NmgA y NmgC (16,41), pero su utilización potencial con PS-B no ha sido establecido.

El atributo más deseable de posibles candidatos para una vacuna para el serogrupo B es la capacidad de inducir anticuerpos que promuevan la acción bactericida dependiente de complemento. Los anticuerpos que parecen correlacionarse mejor con la inmunidad protectora pueden medirse mediante ensayos de funciones dependientes de complemento como la lisis inmune y la opsonofagocitosis, pero la fuente de complemento y la cepa bacteriana empleada en el ensayo son factores críticos (98). Hasta la fecha, la identificación de el *antígeno o antígenos implicados en la inducción de anticuerpos funcionales/bactericidas* se ha estudiado midiendo la correlación existente entre títulos de ELISA, que medirían concentración de anticuerpo, y los datos obtenidos de ensayos bactericidas, que indicarían la funcionalidad de la respuesta inducida. Este abordaje no permite establecer inequívocamente una correlación directa entre *la especificidad y la funcionalidad (activación de complemento) de los anticuerpos*

estudiados.

#### **1.4. Antecedentes, objetivos y plan de trabajo**

Desde que E.Gotschlich publicó a finales de los de la década de los sesenta los primeros trabajos sobre el desarrollo de vacunas basadas en polisacáridos capsulares meningocócicos hasta nuestros días, las investigaciones de posibles vacunas basadas en el polisacárido capsular de NmgB han sufrido constantes altibajos. La explicación a este comportamiento algo errático habría que buscarla en las dificultades asociadas a este tipo de estudios: los polisacáridos en general no se comportan como buenos inmunógenos, pero el PS-B en particular es un antígeno especialmente "difícil" a la hora de intentar inducir una respuesta específica. A esto habría que añadir la falta de una metodología estandarizada para su estudio: la producción y caracterización del antígeno purificado es un proceso sumamente complejo, largo y laborioso; la obtención de anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, es sumamente complicada, y la valoración de la respuesta a este antígeno carecía por completo de una metodología sensible y específica.

Los trabajos iniciales de nuestro laboratorio se enfocaron en principio al estudio de la respuesta inmune frente al PS-B mediante la preparación de diferentes conjugados, y la posibilidad de modificar la restricción isotípica de esta respuesta, centrada principalmente en el isotipo IgM. Estos trabajos pronto pusieron de manifiesto la falta de herramientas metodológicas adecuadas al propósito del

estudio, adoleciendo los métodos preexistentes en aquel momento de las propiedades necesarias para un estudio de estas características. Esta carencia nos hizo replantear los objetivos iniciales, enfocándolos en aspectos más básicos del problema.

Por todo ello los OBJETIVOS del presente trabajo se centraron en los siguientes apartados:

I. Desarrollo y optimización de un sistema de ELISA anti-PS-B sensible, específico y flexible, que permita medir el isotipo de la respuesta.

II. Desarrollo de una metodología capaz de correlacionar directamente la respuesta inmune al PS-B con la funcionalidad de esta, mediante la capacidad de activación del complemento de los anticuerpos originados.

III. Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de cuestiones básicas relacionadas con la respuesta inmune al PS-B, centrándose fundamentalmente en dos aspectos puntos: la naturaleza del epítipo capaz de inducir una respuesta anti-PS-B y las propiedades de los anticuerpos anti-PS-B.

Para llevar a cabo estos objetivos se desarrolló el siguiente PLAN DE TRABAJO:

1. Purificación y caracterización de polisacárido capsular de NmgB.
2. Producción de sueros animales PS-B específicos utilizando diferentes inmunógenos.
3. Investigación y desarrollo de diferentes fases sólidas para el desarrollo de inmunoensayos con PS-B.

4. Utilización de eritrocitos para el desarrollo de diferentes ensayos de valoración de la respuesta anti-PS-B.

## **2.MATERIALES Y MÉTODOS**





## 2.1. Producción de PS-B a pequeña escala

Las cepas referencia H355 (serogrupo B15) y B16B6 (serogrupo B2a) (amablemente proporcionadas por F.Roman, Servicio de Bacteriología, C.N.M.V.I.S., Instituto de Salud Carlos III), se utilizaron para la obtención del polisacárido purificado. El cultivo de bacterias, partiendo de inóculos crecidos en placas de agar sangre a 37°C en un incubador con CO<sub>2</sub>, se realizó en medio de Frantz modificado, hasta un total de 5 litros, tamponado según el protocolo del Walter Reed Army Institute of Research (165,262) que previene la hidrólisis ácida del polisacárido manteniendo el pH a 7,4 durante la incubación. El cultivo se creció a 37°C en condiciones de aireación aumentada: frascos de cultivo llenos a un 25% de su capacidad y agitación de 140 r.p.m., utilizándose 3 tiempos de incubación: 16, 24 y 48 horas. Después de la eliminación de las células bacterianas por centrifugación, se añadió al sobrenadante Cetavlon al 10% (93) hasta una concentración previamente optimizada del 0,025%, y el polisacárido capsular precipitado fue recogido por centrifugación. El precipitado fue resuspendido en agua, y el Cetavlon eliminado por precipitación con cloruro cálcico, los ácidos nucleicos con etanol al 25%, las proteínas por extracción con fenol frío y los lipooligosacáridos por ultracentrifugación (296) (Fig.6).

La cantidad de producto final se determinó como cantidad de ácido siálico medido por el método del resorcinol-clorhídrico (253) usando ácido N-acetilneuramínico como standard, y la estimación del contenido en diferentes contaminantes se realizó tal y como sigue: proteínas mediante el método del ácido

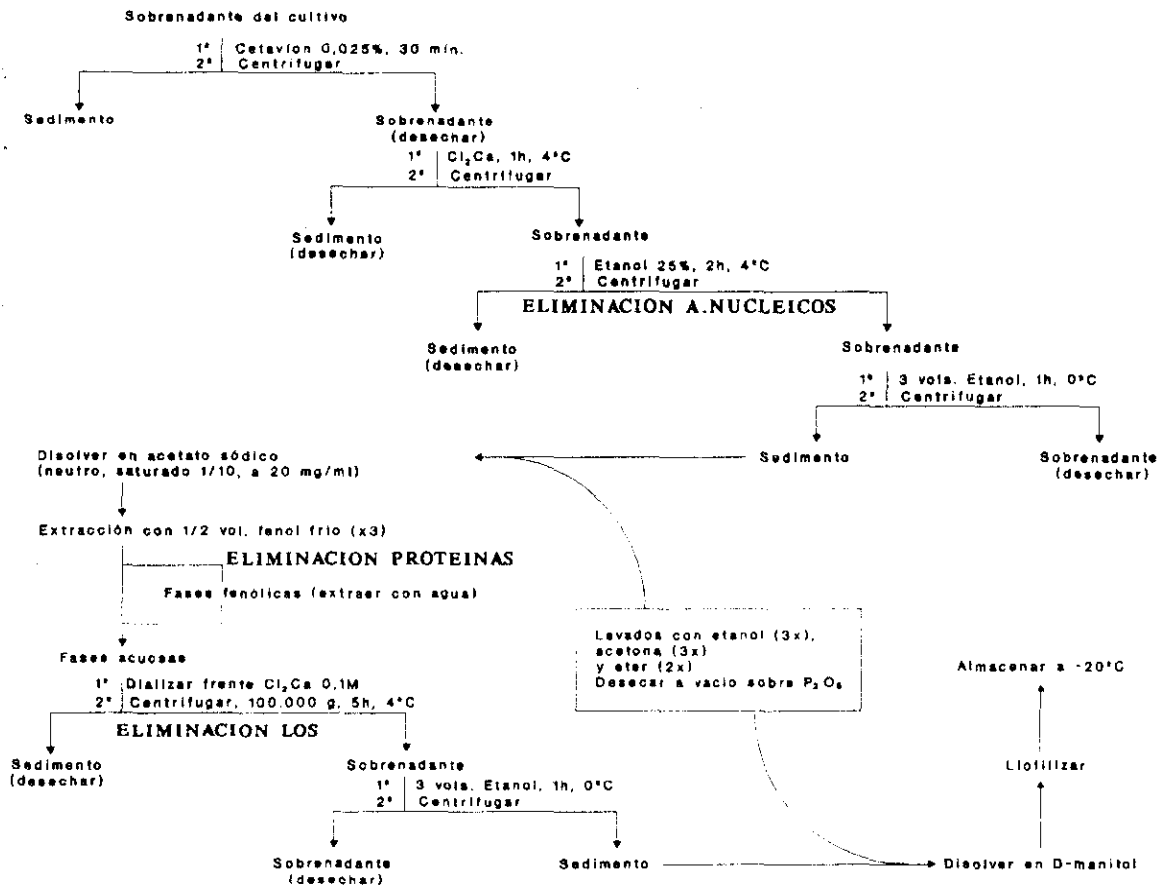


Figura 6. Diagrama indicativo de los pasos en la preparación del polisacárido de NmgB.

bicinconínico (243) usando albúmina de suero bovino como referencia, ácidos nucleicos por espectrofotometría ultravioleta, y lipooligosacáridos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS con el sistema de Laemmli (147) en un aparato Mini-Protean II (Bio-Rad) con un gel concentrador del 3% y un gel separador del 15% a 35 mA de corriente constante, seguida por tinción de plata (261,264), usando lipopolisacárido purificado de *Escherichia coli* O55:B5 (Difco, Detroit, Mi.) como referencia.

La reactividad inmunológica del polisacárido purificado fue estimada cuantitativamente mediante un ensayo de inhibición de la hemaglutinación usando un polisacárido referencia (ver apartados siguientes), y cualitativamente mediante un test de aglutinación de partículas de latex (Wellcome Diagnostics)(139), empleándose este segundo para monitorizar la marcha del proceso de obtención del polisacárido.

El producto final se liofilizo en masa usando D-manitol como aditivo, que a diferencia de la lactosa no interfiere en las determinaciones de ácido siálico por el método del resorcinol-HCl (256), o se alicuotó previamente en viales de 2 ml a 500  $\mu\text{g/ml}$  y se liofilizo sin añadir ningún aditivo. En ambos casos el producto final fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2.Otros antígenos meningocócicos

Polisacáridos capsulares meningocócicos purificados y cuantificados de los serogrupos A, B y C usados como antígenos referencia, así como un complejo no covalente de proteínas de membrana externa y polisacárido B (MB6-328)(184), fueron amablemente proporcionados por el Dr. M.Robert Lively (Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Inglaterra). La vacuna divalente Meningovax A+C (Merck, Sharp and Dohme, Westpoint, Pa.) se empleo como fuente de antígeno para la biotinilación de los polisacáridos meningocócicos A y C. Suspensiones de bacterias formalinizadas de *N.meningitidis* serogrupo B15 fueron preparadas según se ha descrito previamente (183): a cultivos crecidos toda la noche se les añadía

formalina al 0,5% (p/v), y se dejaban en reposo 24 horas, transcurridas las cuales se centrifugaban, lavaban y resuspendían las células en PBS conteniendo 50% (v/v) de glicerol, se alicuotaban ajustando la concentración a  $10^{10}$  por espectrofotometría a 650 nm (165) y se conservaban a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3. Anticuerpos polisacárido-específicos**

MB-85 es un anticuerpo monoclonal de ratón de isotipo IgM, purificado por afinidad que reacciona específicamente con polisacárido meningocócico purificado del serogrupo B (139) (proporcionado por el Dr. M.R. Lively). H-46, es un antisuero de caballo producido contra el meningococo grupo B (cortesía del Dr. C.E. Frasch, Bureau of Biologics, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland, por mediación del Servicio de Bacteriología del C.N.M.V.I.S.). Sueros hiperinmunes de conejo a *Neisseria meningitidis* grupos A, B y C fueron obtenidos de dos diferentes fuentes comerciales (Diagnostics Pasteur, Marnes-la-coquette, Francia y Difco). Los protocolos de obtención de otros sueros producidos en nuestro laboratorio se describen en el apartado siguiente.

### **2.4. Inmunizaciones**

Un grupo de 5 ratones Swiss fueron inmunizados con  $2,5 \mu\text{g}$  de polisacárido capsular purificado de *N.meningitidis* serogrupo A en 0,5 ml de salino tamponado con fosfato (PBS) los días 1 y 20, y sangrados los días 5 y 30.

Tres grupos diferentes de 5 ratones BALB/c fueron inmunizados con 10  $\mu$ g de PS-B, 10  $\mu$ g de MB6-328, ambos en 0,4 ml de PBS conteniendo 100  $\mu$ g de Al(OH)<sub>3</sub>, y una suspensión que contenía 10<sup>9</sup> microorganismos formalinizados de *N.meningitidis* B en 0,4 ml de PBS. Los ratones fueron inmunizados los días 1, 20 y 90, y sangrados los días 20, 73 y 97 (A). Adicionalmente, otro grupo de ratones fue inmunizado con MB6-328 siguiendo el mismo protocolo, pero inmunizando los días 1, 7 y 14, y sangrando los días 14 y 24 (B).

Un grupo de 4 hámsteres sirios fueron inmunizados con una suspensión de 5 x 10<sup>9</sup> microorganismos formalinizados de *N.meningitidis* B en 0,8 ml de PBS los días 1, 10, 20, 40 y 50, y sangrados los días 10, 20, 40, 50, y 57.

En todos los casos se tomaron controles de presangramiento, y los sueros procedentes de cada grupo y sangramiento se procesaron posteriormente como un 'pool'. La sangre se obtenía por punción intracardiaca, utilizando como anestésico éter o pentobarbital sódico en el caso de ratones y hámsteres respectivamente, y se dejaba en reposo durante toda la noche a 4°C antes de separar el suero por centrifugación.

## **2.5. Ensayos de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación**

Eritrocitos de carnero (SRBC) fueron obtenidos por venopunción y almacenados en solución de Alsever a 4°C, usándose dentro del plazo de un mes. La sensibilización de los SRBC con los polisacáridos se realizó según el método de

Artenstein (19): SRBC se lavaban 3 veces con PBS y se resuspendían al 4% (v/v) ajustando el porcentaje mediante determinación de la densidad óptica a 541 nm de una alícuota lisada con carbonato sódico anhidro (125). Las células eran sensibilizadas mezclándolas con un volumen igual de polisacárido purificado en PBS; la mezcla se incubaba a 37°C 30 minutos con agitación y después se lavaba 3 veces con PBS. Las células sensibilizadas se diluían entonces a la dilución de trabajo en PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5%. Con objeto de optimizar el ensayo se ensayaron diferentes concentraciones de polisacárido para sensibilizar los SRBC, así como diferentes concentraciones de SRBC sensibilizados. Previamente y con fines comparativos, también se llevo a cabo una sensibilización con el PS-B empleando cloruro crómico (51), pero el método, además de ser más complicado obtuvo peores resultados que la simple incubación a 37°C.

En el ensayo de hemaglutinación (HA), el suero o los anticuerpos se distribuían en placas de microtitulación de pocillos con fondo en 'V', diluyéndolos serialmente en volúmenes de 50  $\mu$ l y añadiendo posteriormente 50  $\mu$ l de la suspensión de SRBC sensibilizados. Los patrones de hemaglutinación se leían después de dos horas a temperatura ambiente. Los difíciles de interpretar a las 2 horas, podían ser mejorados mediante una incubación adicional toda la noche a 4°C.

En el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HIA), antes de añadir los SRBC sensibilizados se incubaban los inhibidores, diluidos serialmente en 50  $\mu$ l de

PBS en las placas de microtitulación, con una concentración constante de anticuerpo de 4 unidades HA (definiéndose una unidad HA como la dilución mas alta de anticuerpos que produce la máxima hemaglutinación) durante 1 hora a 37°C y a continuación toda la noche a 4°C.

También se llevaron a cabo ensayos con dos tipos de lectinas que tienen especificidad para el ácido N-acetil-neuramínico: aglutinina de germen de trigo (WGA) y lectina de *Limulus polyphemus* (limulina) (Sigma) para evaluar su potencial en ensayos con PS-B. Los tampones empleados en ensayos de hemaglutinación contenían 0,5% de BSA. Con WGA se realizaron ensayos de hemaglutinación como anteriormente utilizando tanto eritrocitos sensibilizados con PS-B, como SRBC sin sensibilizar usando PBS como tampón de trabajo para esta lectina. Con la limulina se realizaron ensayos de hemaglutinación con eritrocitos sensibilizados o no sensibilizados con PS-B utilizando dos diferentes tampones: PBS y salino tamponado con Tris 0,05 M pH 7,2 conteniendo cloruro cálcico 0,1 M (TBS-Ca 0,1 M), comparando los patrones de hemaglutinación con los obtenidos con el anticuerpo monoclonal MB-85 en los mismos tampones.

## **2.6.Obtención de sueros como fuente de complemento**

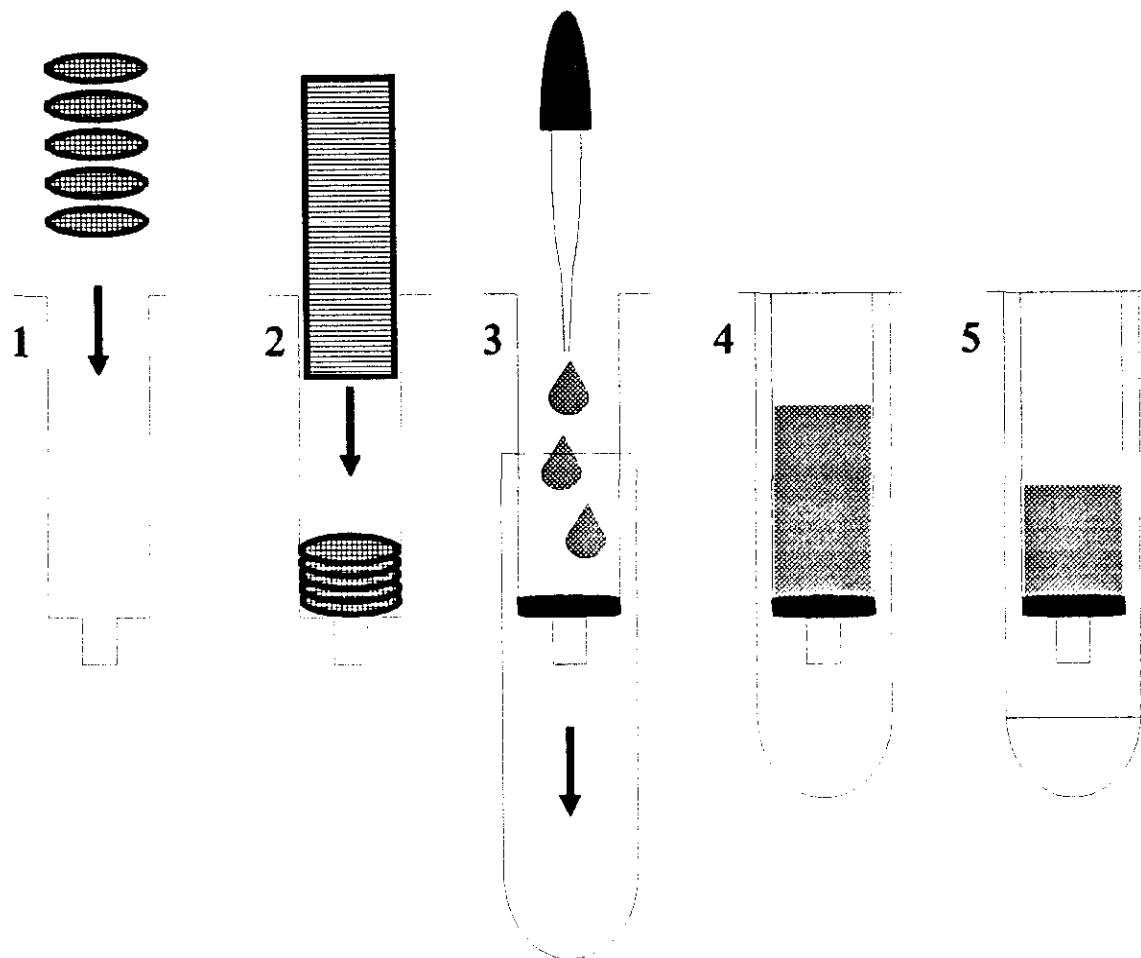
Para la preparación de suero humano normal (NHS) como fuente de complemento, se obtuvo sangre de un único voluntario y se dejó coagular durante una hora a 4°C. El suero fue separado por centrifugación, y para eliminar la posibilidad de anti-SRBC presente de forma natural en el suero este fue absorbido



2 veces con SRBC empaquetados (50  $\mu$ l/ml suero) durante 10 minutos a 0°C. Después de la última centrifugación, el suero fue alicuotado y almacenado a -70°C. Suero murino empleado como fuente de complemento fue preparado de forma similar a partir de un 'pool' obtenido de ratones BALB/c. En ambos casos, se comprobó la ausencia de anticuerpos específicos para PS-B por hemaglutinación.

### **2.7.Método de minicolumnas centrifugadas**

El método es una variación del de Neal y Florini (190), y se emplea en los pasos intermedios del proceso de biotilación descrito mas abajo. Las minicolumnas para filtración en gel se prepararon por empaquetamiento de Bio-Gel P2 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.) embebido en tampón citrato 0,15 M a pH 5, en jeringuillas de 5 ml Plastipak (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) a las cuales previamente se les habían insertado unos filtros compuestos de 4-5 discos cortados a medida de un prefiltro AP20 (Millipore, Bedford, MA) (Fig.7). Las jeringas se centrifugaban en tubos de vidrio Corex (Cat.No 00152, Dupont) en una centrífuga Sorvall RC5C con un rotor de ángulo variable a 7.000 r.p.m. durante 1 minuto. Este procedimiento se repetía hasta que se obtenía la altura de columna deseada. Con objeto de calibrar las columnas y verificar la altura óptima para obtener la máxima recuperación de macromoléculas con un mínimo de contaminantes de bajo peso molecular, se emplearon dextrano azul y rojo fenol como marcadores de alto y bajo peso molecular, respectivamente, ambos en tampón citrato. Una muestra de 1 ml de estos marcadores, conteniendo 9 mg de



**Figura 7.** Esquema de la preparación de micolumnas. 1 y 2, inserción y ajuste de los filtros; 3 y 4, empaquetamiento del gel e inserción de la micolumna en un tubo de centrífuga; 5, centrifugación.

rojo fenol y 1 mg de dextrano azul, se aplicó a la micolumna previamente centrifugada para eliminar el volumen de exclusión, y se centrifugó como anteriormente se ha descrito. La presencia de dextrano azul y rojo fenol en el eluido se determinaba midiendo la densidad óptica a 620 y 450 nm respectivamente. Las columnas eran a continuación recicladas con 30 ml de agua destilada para su posterior uso en el procedimiento de biotilación. Con fines comparativos se realizó una diálisis de la misma muestra usando las siguientes condiciones: 8 horas

a 4°C con tres cambios de tampón citrato.

## **2.8. Biotinilación de polisacáridos**

Los polisacáridos biotinilados se prepararon mediante un método modificado a partir del de Spiegel y Wilchek (245). PS-B (1 mg/ml) en agua destilada, fue oxidado selectivamente (119) con periodato sódico (Sigma, St.Louis, MO) 100 mM (200  $\mu$ l/mg polisacárido) a temperatura ambiente en oscuridad durante 5 minutos. A continuación se añadieron 100  $\mu$ l de glicerol al 25 % para que reaccionaran con el exceso de periodato sódico y la solución se dejó a temperatura ambiente otros 5 minutos. La mezcla de reacción se centrifugó consecutivamente a través de 2 minicolumnas, como anteriormente se describió, añadiéndose entonces 10 mM de Biotin-hidracida (Sigma) y 1 mM de dicloruro de manganeso (Merck). Después de una incubación de 30 minutos a 37°C, el polisacárido modificado se pasaba a través de dos minicolumnas y se reducía con borohidruro sódico 1mM (Sigma) 10 minutos a temperatura ambiente. El producto resultante se paso por las minicolumnas como anteriormente (Fig.8).

Para la biotinilación de los polisacáridos A y C se empleo como fuente de los mismos la vacuna A+C, empleando el mismo procedimiento descrito, pero introduciendo un paso preliminar adicional. Con objeto de hacer mas susceptible a la oxidación con periodato el residuo N-acetil-manosamina del extremo reductor del polisacárido A, se genero un residuo N-acetil-manosiminitol de cadena abierta

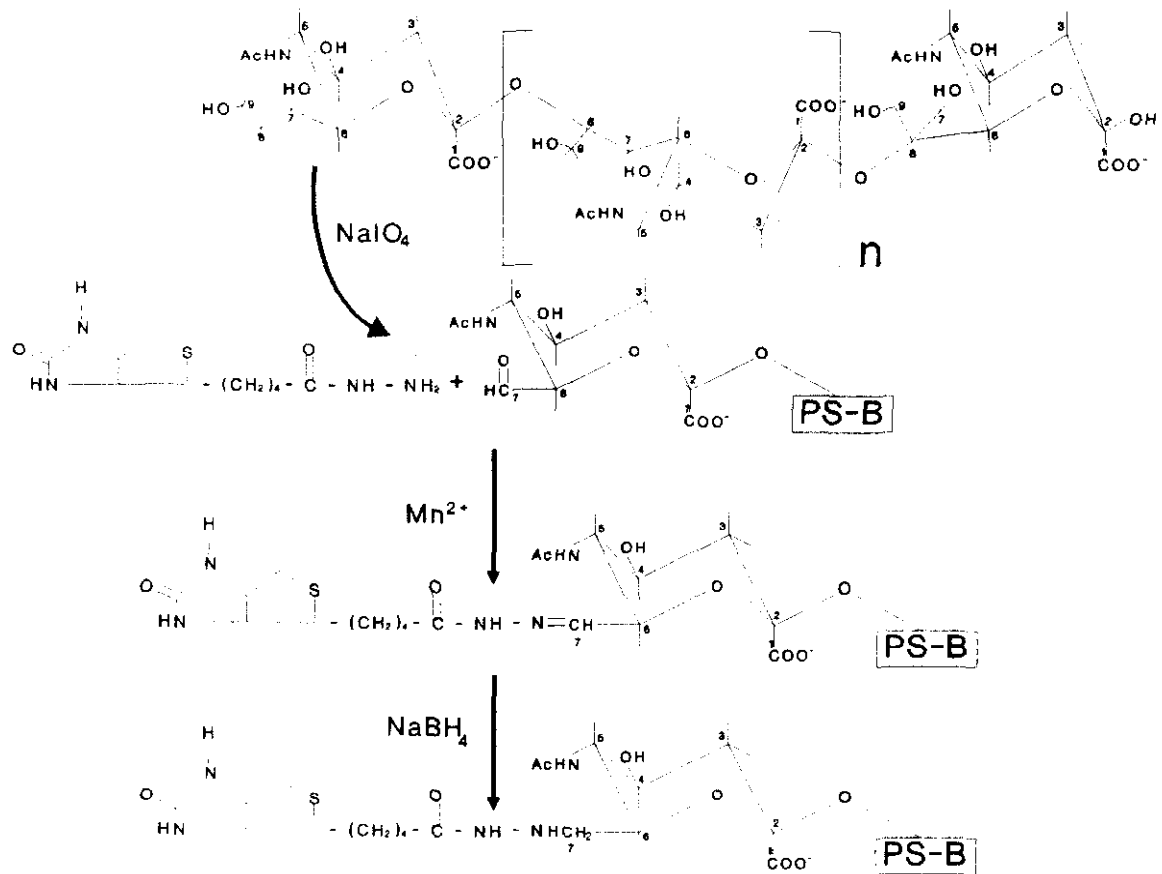


Figura 8. Secuencia de reacciones que originan la formación de PS-B biotinilado.

por reducción toda la noche a 4°C con borohidruro sódico, 500  $\mu\text{g}/\text{mg}$  polisacrido, y posterior purificación por las minicolumnas.

### 2.9. Determinación de biotina incorporada

Se determino de forma indirecta midiendo la capacidad de combinación de avidina con el polisacárido biotinilado utilizando ácido 4-hidroxiazobenceno-2'-carboxílico (HABA) según el método de Green (96), y haciendo una estimación de

la longitud aproximada del PS-B basada en datos publicados (139,157) de unos 200 residuos. Para aumentar la sensibilidad del método, el seguimiento colorimétrico del desplazamiento de HABA por biotina fue medido no solo por el aumento en la absorbancia a 500 nm, sino también por la disminución en la absorbancia a 350 nm (Fig.9). Adicionalmente, se tomaron medidas del máximo de absorbancia a 282 nm para verificar las posibles variaciones en la concentración de avidina entre muestras y aplicar el pertinente factor de corrección.

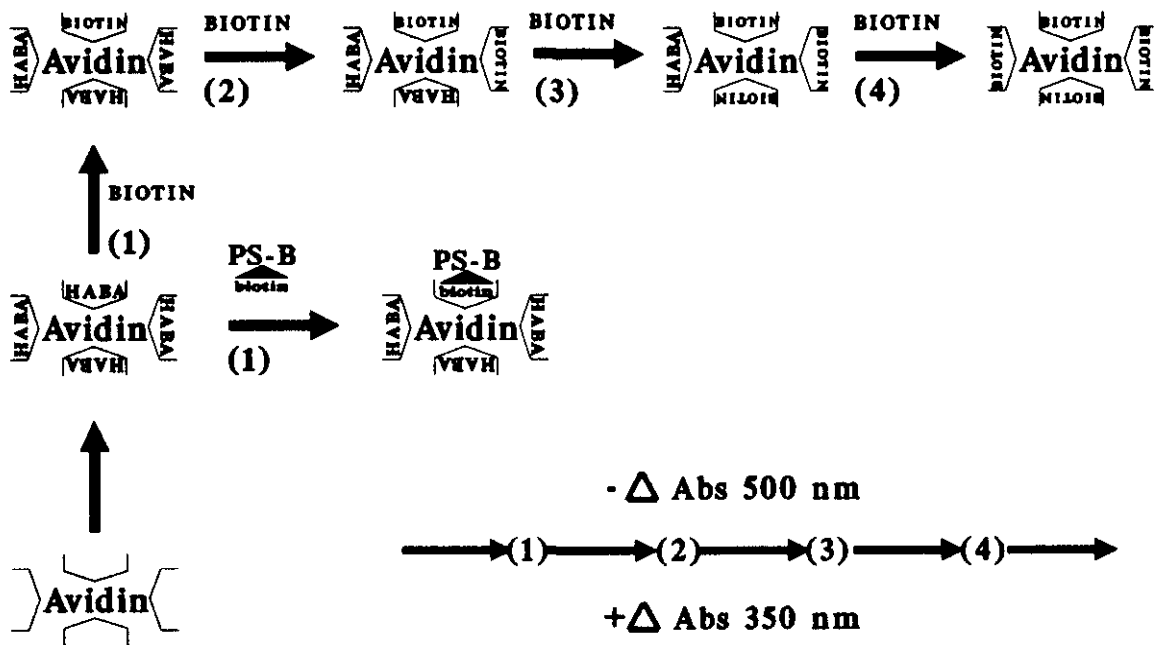


Figura 9. Esquema del método de determinación de biotina incorporada.

Mediante este mismo procedimiento se prepararon complejos equimoleculares de avidina y PS-B biotinilado que fueron empleados en el ELISA en fase líquida descrito más abajo.

## **2.10. Enzimoimmunoensayos**

Todos los ensayos descritos a continuación fueron llevados a cabo en cámaras húmedas. A menos que se indique en otra forma, se utilizaron 100  $\mu$ l como volumen de reacción, excepto para el bloqueo y los lavados que se empleaban 200  $\mu$ l, y los valores de fondo se obtuvieron de pocillos que contenían todos los reactivos excepto el suero (o anticuerpo monoclonal).

### **2.10.1. ELISA anti-PS-B con pre-recubrimiento con poli-L-lisina**

Se empleó un ELISA previamente optimizado a partir del de Lively (155). Placas de poliestireno fueron tratadas con poli-L-lisina (Sigma) a 50  $\mu$ g/ml en PBS durante 3 horas a temperatura ambiente. Después del recubrimiento con PS-B purificado a 1  $\mu$ g/ml en PBS toda la noche a 4°C, se bloquearon los pocillos con leche descremada al 5%. El anticuerpo monoclonal MB-85 se incubaba durante 60 minutos a 37°C en leche descremada al 5%, y se desarrollaba el ensayo con inmunoglobulina anti-ratón biotinilada y estreptavidina-peroxidasa (RPN.1001 y RPN.1231, Amersham) según las instrucciones del fabricante: 1 hora y 30 minutos respectivamente a 37°C con una dilución 1/1.000. Finalmente, se llevó a cabo una incubación de 15 minutos con solución sustrato: 0,24 mg de o-fenilendiamina (OPD)/ml de tampón citrato 0,15 M pH 5,0 + 0,4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, parándose la reacción con 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 2 M y leyéndose la absorbancia a 492 nm. Incubaciones mas prolongadas, ya sea con el anticuerpo monoclonal o con el sustrato, resultaban en unos valores de fondo inaceptables, originados

probablemente por la reactividad inespecífica de la poli-L-lisina (16) y por las limitaciones inherentes con respecto al tiempo de revelado de la peroxidasa (114), respectivamente.

### **2.10.2.ELISA con recubrimiento con bacterias formalinizadas**

Se utilizó el recubrimiento directo puesto que en experimentos previos, al igual que en trabajos previamente publicados (280), no se encontró una mejora significativa en la utilización de un pre-recubrimiento con poli-L-lisina. Suspensiones bacterianas formalinizadas de *N.meningitidis* serogrupo B15 a una concentración de  $10^9$  células por ml en PBS fueron incubadas toda la noche a 37°C en placas de microtitulación de fondo plano. El resto del ensayo fue llevado a cabo como en el apartado 10.2.

### **2.10.3.ELISA anti-PS-B con prerecubrimiento con lectinas**

WGA se utilizó en un ELISA anti-PS-B con MB-85 revelado con peroxidasa (ver apartado 10.2) en el que se empleaba esta lectina en un paso previo de pre-recubrimiento, usando PBS como tampón de trabajo.

Para el ELISA anti-PS-B con prerecubrimiento con limulina se utilizaron diferentes concentraciones de esta: 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ , así como dos concentraciones de PS-B: 1 y 5  $\mu\text{g/ml}$ . El tampón de trabajo utilizado era TBS-Ca 0,1 M y este mismo tampón se empleó posteriormente en los pasos siguientes. Después de

incubar con MB-85 en PBS conteniendo 0,05% de Tween 20 (Sigma) (PBS-T) y BSA 3%, se revelaba el ensayo con peroxidasa como anteriormente.

#### **2.10.4. Ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina**

50  $\mu$ l de un conjugado purificado por afinidad de inmunoglobulina de conejo anti-ratón y fosfatasa alcalina de intestino de ternera (AP-conjugado) (Código D314, Dakopatts, Copenhagen), en un rango final de concentraciones de 3,7 a 3.800 pg/ml, y 50  $\mu$ l de p-nitrofenil fosfato (pNPP, Sigma), a una concentración final de 1 mg/ml en tampón dietanolamina a pH 9,8 conteniendo 50 mM de dicloruro de magnesio (Sigma), fueron añadidos sucesivamente a los pocillos de fondo plano de tiras de poliestireno (Titertek, 78-591-99, Flow Laboratories, Holanda) e incubados a temperatura ambiente. Se realizaron lecturas de absorbancia a 405 nm a diferentes tiempos (24 h a 15 días) con un espectrofotómetro multicanal (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) sin parar la reacción. Los valores de fondo se obtuvieron a partir de pocillo control a los cuales solo se añadía sustrato.

#### **2.10.5. ELISA anti-PS-B con pre-recubrimiento con estreptavidina**

Tiras de poliestireno con pocillos de fondo plano fueron recubiertas con estreptavidina 5  $\mu$ g/ml (Sigma) en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 toda la noche a temperatura ambiente (278) y lavadas 3 veces con PBS-T. Estas tiras podían almacenarse a -20°C hasta 1 mes sin pérdida de reactividad (252).



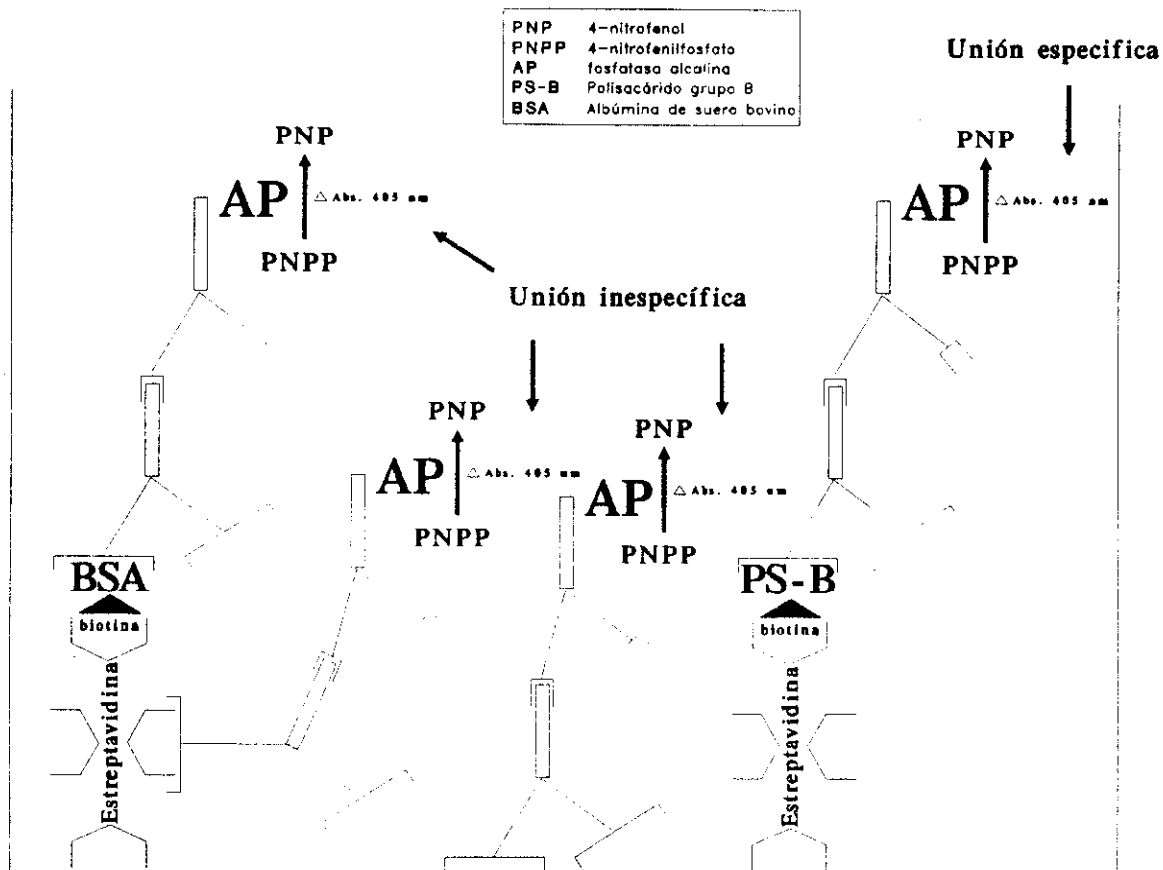


Figura 10. Esquema del ELISA anti-PS-B con prerecubrimiento con estreptavidina.

Las tiras se incubaban entonces con un  $1 \mu\text{g/ml}$  de polisacárido biotinilado en PBS que contenía BSA al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente, y se lavaban 3 veces con PBS-T. Todas las diluciones siguientes, tanto de sueros (o anticuerpo monoclonal) específicos como de los reactivos de desarrollo, fueron preparados en PBS-T que contenía suero de ternera fetal al 10% (PBS-T-FCS) o leche descremada al 10% (PBS-T-SkiM), con objeto de minimizar la unión inespecífica. Diluciones doblantes seriadas del suero o el anticuerpo monoclonal se añadían en un volumen de  $100 \mu\text{l}$ /pocillo, incubándose las placas toda la noche a

4°C. Después de lavadas, las placas se incubaban 4 horas a temperatura ambiente con el correspondiente AP-conjugado (anti-ratón 1/2.000 código D314, anti-conejo 1/2.000 código D306, Dakopatts; anti-IgM de ratón 1/1.000, Sigma; anti-IgG(H+L) de ratón 1/1.500, Bio-Yeda, Rehovot, Israel; anti-IgG(H+L) de conejo 1/2.000, Serotec, Oxford, Inglaterra). Después de la incubación las placas se lavaban 3 veces con PBS-T y agua, y se añadía el sustrato como anteriormente. Las placas se incubaban a temperatura ambiente, y la absorbancia se determinaba a diferentes tiempos (Fig.10). Para determinar la unión inespecífica, se usaron pocillos recubiertos con BSA biotinilada según el método de Guesdon y col.(104).

#### **2.10.6. Enzimoinmunoensayo competitivo directo (EIA)**

Tiras de poliestireno con pocillos de fondo plano fueron recubiertas con anticuerpo monoclonal (MB-85) a 5 µg/ml en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados con PBS-T, cada pocillo recibió 50 µl de diferentes inhibidores y 50 µl de PS-B biotinilado a una concentración de 20 ng/ml, ambos en PBS conteniendo BSA al 1%. Después de incubar toda la noche a 4°C y lavar, se llevaba a cabo una incubación adicional de 2 horas a temperatura ambiente con 100 µl de estreptavidina-fosfatasa alcalina 1/2.000 (código D396, Dakopatts) en PBS-T. Las placas fueron de nuevo lavadas con PBS-T y agua, y la absorbancia registrada después de 24 horas de incubación con el sustrato. Para la determinación de las concentraciones óptimas de anticuerpo y PS-B biotinilado para su uso en el EIA, se llevo a cabo una titulación cruzada, variando

simultáneamente las concentraciones de anticuerpo utilizados para el recubrimiento, así como las de PS-B biotinilado (177). Un EIA con H-46 fue llevado a cabo en la misma forma empleando una dilución 1/5.000 para el recubrimiento, pero utilizando PS-B purificado como único inhibidor.

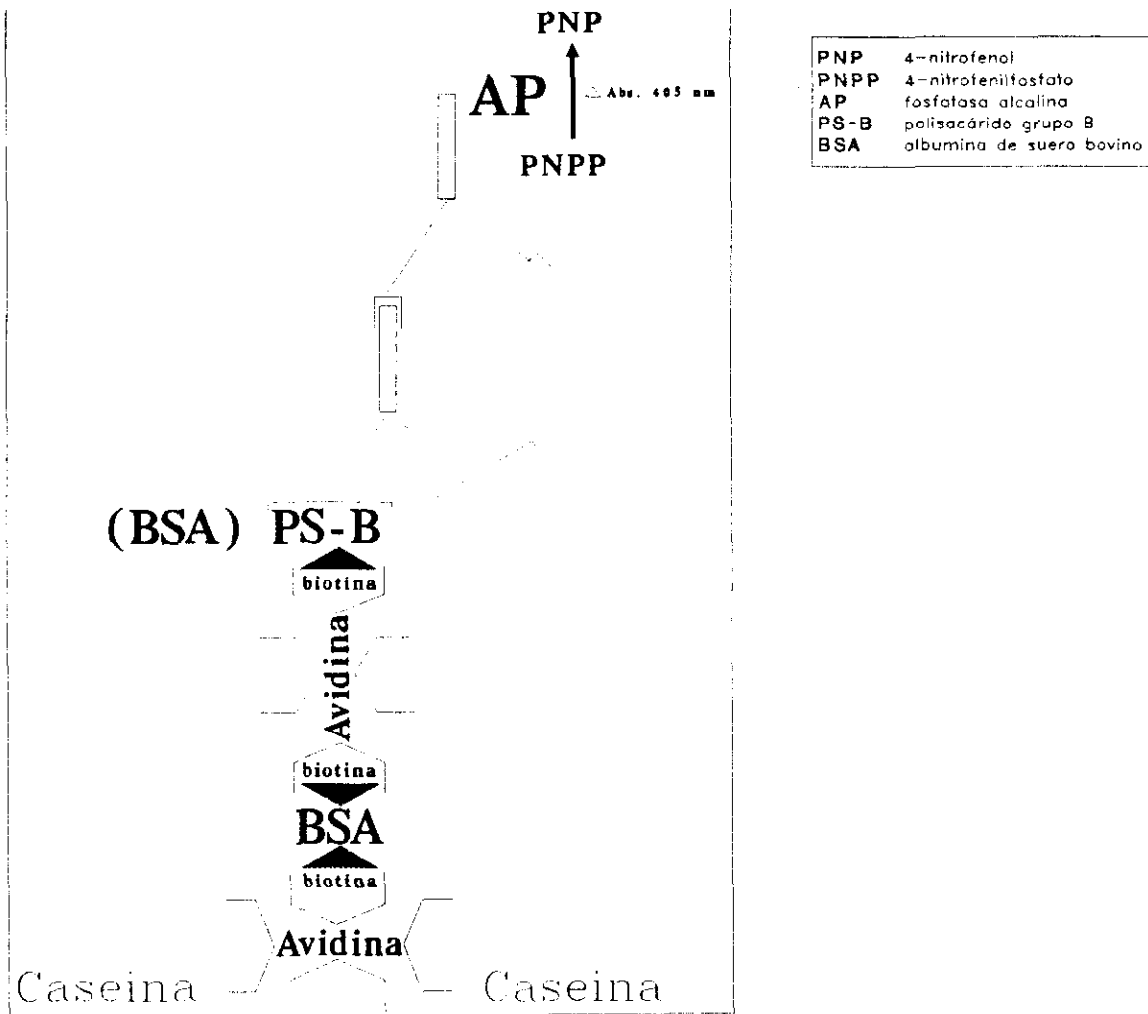


Figura 11. Esquema del ELISA anti-PS-B con precubrimiento de avidina/BSA biotinilado.

### **2.10.7.ELISA anti-PS-B con pre-recubrimiento con BSA biotinilado-avidina**

Placas de poliestireno fueron tratadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de BSA-biotinilada en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar se llevaron a cabo 3 incubaciones de 1 hora a temperatura ambiente con 50  $\mu\text{l}$  de avidina (10  $\mu\text{g/ml}$ ), BSA-biotinilada (1  $\mu\text{g/ml}$ ), y avidina (10  $\mu\text{g/ml}$ ), respectivamente. Después del último lavado se añadían 50  $\mu\text{l}$  de diferentes concentraciones de PS-B biotinilado: 0,5, 1, 2 y 4  $\mu\text{g/ml}$ . El resto del Elisa se realizó de la misma manera que en el apartado 10.4, excepto por el uso de tampón caseína-timerosal como bloqueante (131): 154 mM de NaCl, 0,5% de caseína (Sigma), 10 mM de Tris-HCl, 0,02% timerosal (Sigma), pH 7,6 (Fig.11).

### **2.10.8.ELISA anti-polisacárido en fase líquida**

Un complejo equimolecular de avidina y PS-B biotinilado, preparado mediante el procedimiento anteriormente descrito, fue incubado a diferentes concentraciones de contenido de PS-B biotinilado: 1,25, 2,5, 5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$ , con anticuerpo monoclonal MB-85 a una concentración constante de 690 ng/ml, en tampón caseína (Fig.12). Después de incubar toda la noche a 4°C, se realizaron diluciones doblantes de esta muestra en tampón caseína y se transfirieron a placas prereducidas con BSA biotinilado, donde se incubaron 2 horas a 4°C. Después de lavar con PBS-T, se añadió el AP-conjugado (anti-ratón 1/2.000 código D314, Dakopatts) incubando 90 minutos a 37°C, y posteriormente se reveló con pNPP.

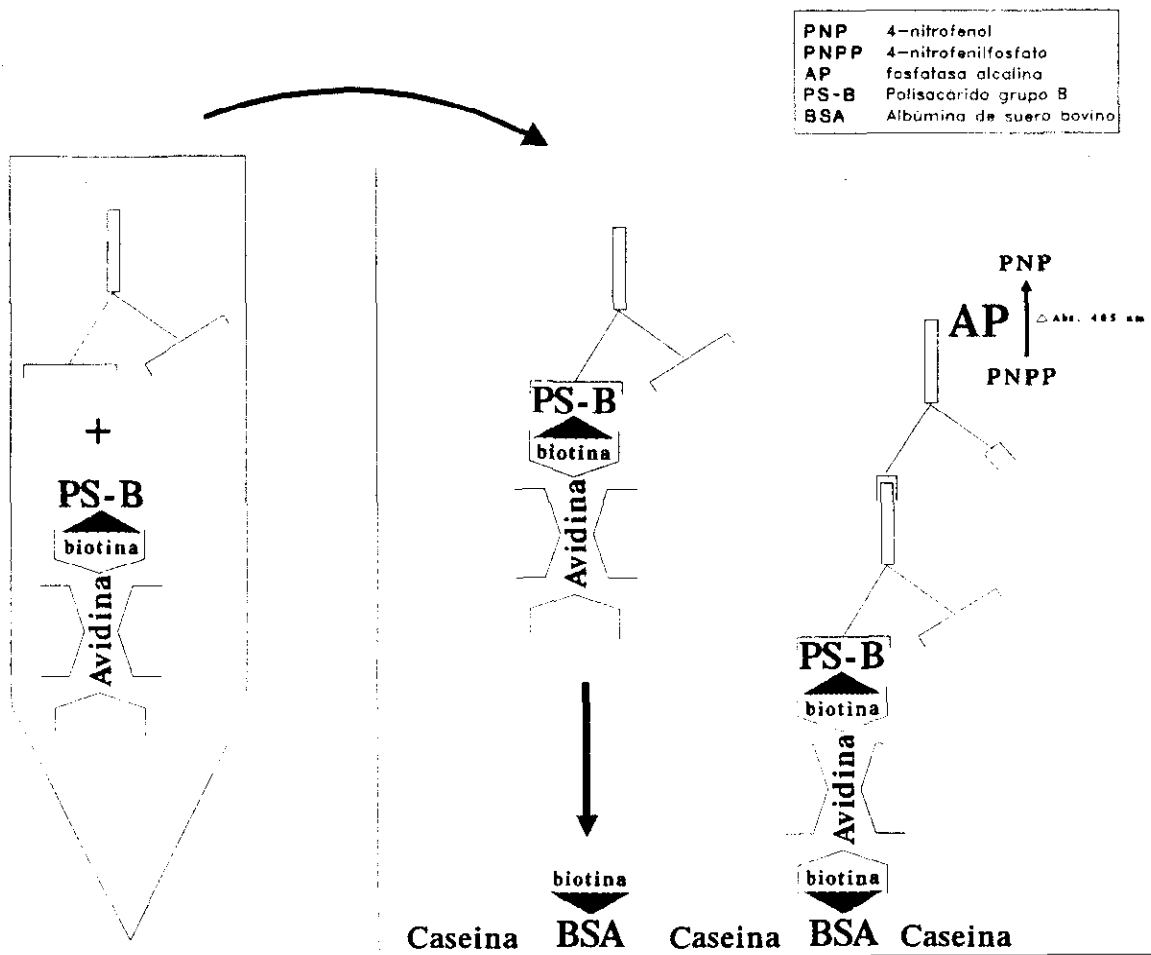


Figura 12. Esquema del ELISA anti-PS-B en fase líquida.

### 2.10.9. ELISA anti-polisacárido revelado con complemento

Placas recubiertas con estreptavidina y PS-B biotinilado como se describió anteriormente, fueron incubadas toda la noche a 4°C con MB-85. Después de lavar se bloqueo la placa con PBS-BSA 3% 1 hora a 37°C y se lavo la placa 3 veces con PBS-T, una con PBS y una mas con tampón veronal (125). A continuación se realizó una incubación con NHS diluido 1/100 en un tampón veronal que contenía

un 0,1 % de gelatina, durante 30 minutos a 37°C, y seguidamente se realizaron incubaciones consecutivas toda la noche a 4°C con anti-complemento C3 humano

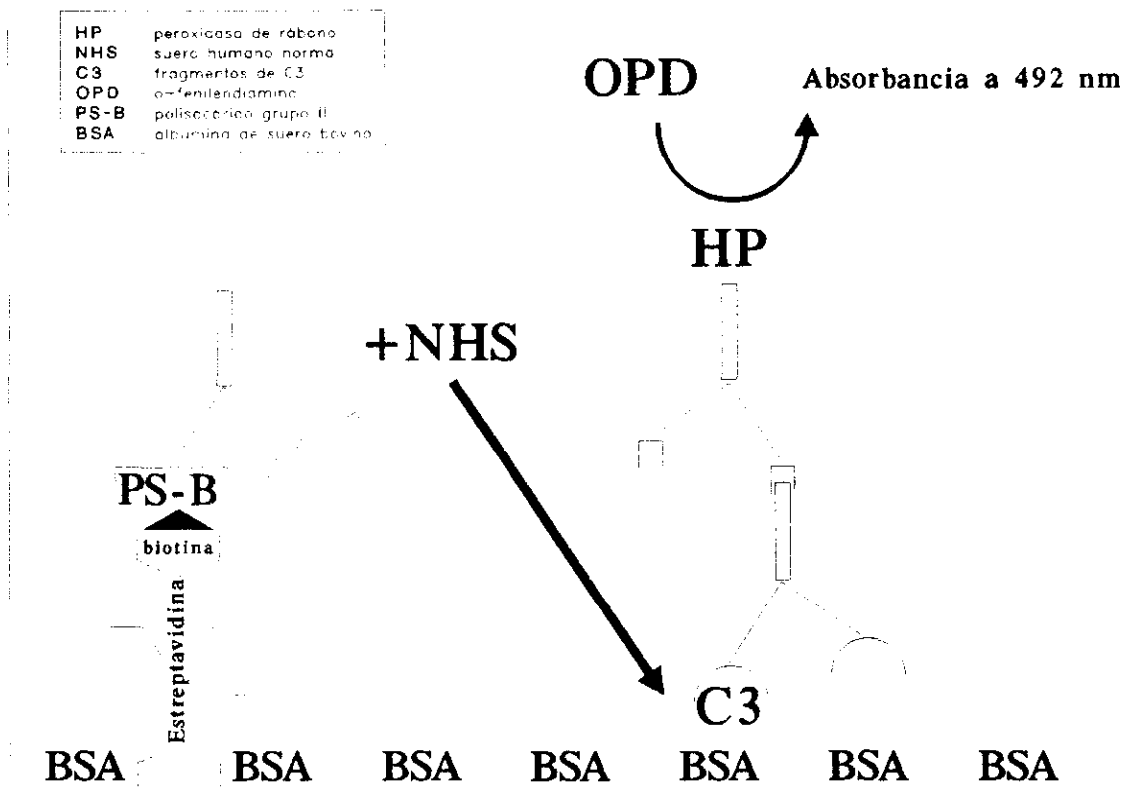


Figura 13. Esquema del ELISA anti-PS-B revelado con complemento.

Yeda, Rehovot, Israel) y un conjugado peroxidasa-anti-cabra (1/20.000, Sigma), ambos diluidos en PBS-T-FCS. de cabra (1/2.000, Miles-Finalmente se reveló con OPD tal y como se describió anteriormente (Fig.13). Adicionalmente, se realiza un ELISA anti-PS-B revelado con complemento idéntico al anteriormente descrito, pero sustituyendo MB-85 por limulina.

## **2.11. Ensayos hemolíticos**

En todos los ensayos descritos a continuación se llevaron a cabo controles de lisis del 0%, utilizando tampón veronal sin complemento, y del 100%, utilizando agua destilada, así como un blanco utilizando SRBC sin sensibilizar con el anticuerpo para los ensayos espectrofotométricos. Las incubaciones realizadas fuera de las placas de microtitulación se llevaron a cabo en tubo Eppendorf de 1,5 ml en un agitador orbital, mientras que las llevadas a cabo en placa se realizaron en un agitador de placas. La determinación de hemólisis se llevó a cabo por tres métodos diferentes: espectrofotometría a 405 nm, actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina y citofluorimetría de flujo.

### **2.11.1. Espectrofotometría a 405 nm**

Volúmenes de 100  $\mu$ l de SRBC al 5% en PBS fueron incubados 1 hora a 4°C con agitación con un volumen igual de diferentes concentraciones de anticuerpo policlonal de conejo anti-SRBC (Difco). Después de 2 lavados con PBS y uno con veronal, se resuspenden los eritrocitos al 5% con 100  $\mu$ l de este último tampón y se incuban alícuotas de 10  $\mu$ l de esta suspensión con un volumen igual de diferentes diluciones en tampón veronal de NHS en placas de microtitulación de fondo en 'V' durante 90 minutos a 37°C con agitación. Transcurrido este tiempo la reacción se paraba con 120  $\mu$ l de veronal frío y las placas se centrifugaban 1 minuto a 1500 r.p.m. a 4°C. 100  $\mu$ l de sobrenadante de cada pocillo se transfería a placas de fondo plano, y se realizaba las lecturas de absorbancia a 405 nm. El

porcentaje de lisis se calculaba como:

$$\frac{D.O.^{405 \text{ nm}} \text{ Muestra} - D.O.^{405 \text{ nm}} \text{ control lisis } 0\%}{D.O.^{405 \text{ nm}} \text{ control lisis } 100\% - D.O.^{405 \text{ nm}} \text{ control lisis } 0\%}$$

Siguiendo este mismo procedimiento se llevaron a cabo ensayos hemolíticos con SRBC sensibilizados con PS-B y anticuerpo monoclonal MB-85 (Fig.14).

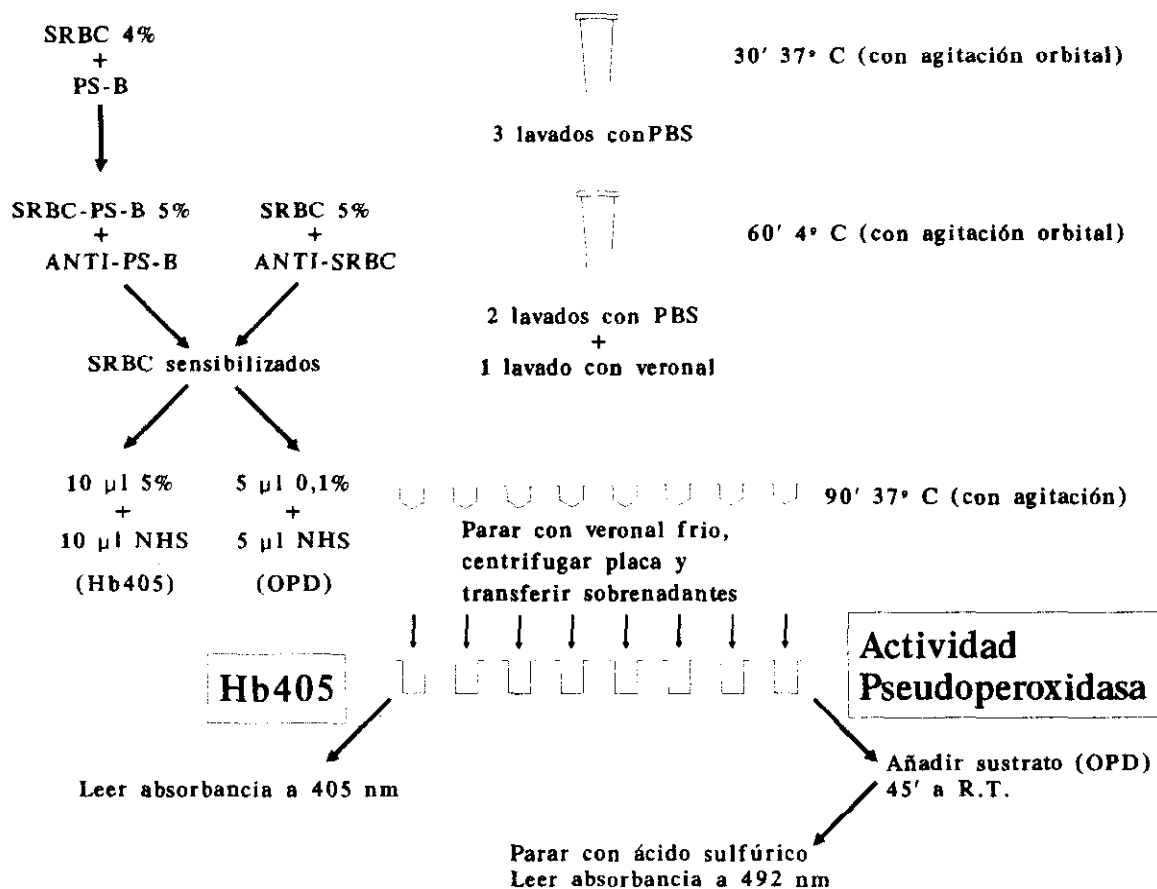


Figura 14. Esquema de los ensayos hemolíticos mediante espectrofotometría a 405 nm y actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina.



### 2.11.2. Actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina

El ensayo esta basado en la utilización de la actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina de los lisados de SRBC como amplificador del ensayo de hemólisis. Primeramente se llevaron a cabo calibraciones de lisis con los dos substratos de la peroxidasa elegidos: diaminobencidina (DAB), 1,6 mg/ml PBS + 16  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y OPD, 4 mg/ml tampón citrato 0,15 M pH 5,0 + 0,8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incubando 100  $\mu$ l de substrato con un volumen igual de diluciones doblantes de SRBC lisados con agua, con objeto de establecer el limite de detección y en consecuencia la concentración de SRBC sensibilizados a emplear.

El ensayo hemolítico en sí era básicamente igual al anteriormente descrito hasta la transferencia de sobrenadantes a las placas de fondo plano, excepto por la concentración de SRBC utilizados después de incubarlos con el anticuerpo: 0,5% en el caso de amplificación con DAB y 0,1% en el caso del OPD. El volumen de veronal para parar la reacción era de 200  $\mu$ l. Después de transferir 100  $\mu$ l de sobrenadantes a placas de fondo plano, se añadía el substrato de la peroxidasa, incubándose las placas a temperatura ambiente 45 minutos y leyéndose la absorbancia 492 después de parar con sulfúrico, en el caso del OPD, o leyendo la absorbancia a 450 nm en el caso de DAB. El porcentaje de lisis se calculaba como anteriormente, empleando las correspondientes lecturas de absorbancia (Fig. 14).

### 2.11.3. Citofluorimetría de flujo

En este caso el porcentaje de hemólisis se obtiene por la disminución en el número de eritrocitos de la muestra, tal y como se determina por citofluorimetría de flujo por comparación con una referencia interna de la muestra.

La primera parte del ensayo es similar a lo anteriormente visto: se emplea una concentración constante de anti-SRBC (1/200) y una concentración de SRBC sensibilizados del 0,5 % (Fig.15). Después de incubar con complemento, la reacción se para con PBS frío que contiene fluorosferas de referencia para alineamiento óptico (4 gotas/ml, Immuno-check, Coulter Corporation, Hialeah, FL.) capaces de emitir fluorescencia verde (525 nm), naranja (575 nm) y roja (635 nm), y se pasaron las muestras a viales Eppendorf de 1,5 ml en un volumen final de 1 ml. Estas muestras se corrieron en un citofluorímetro de flujo EPICS 751 (Coulter Corporation) equipado con un láser de argón sintonizado a 488 nm a una potencia de 200 mW, y conectado a una unidad MDADS II (Coulter Corporation) para la adquisición y análisis de los datos.

Se obtuvieron histogramas biparamétricos (64 x 64 canales) utilizando como parámetros la dispersión frontal (FALS) en el eje X y la integral de la fluorescencia verde (IGFL) en el eje Y, y ajustando el modo de parada al recuento de 1000 partículas fluorescentes. Con los datos recogidos se efectuó un análisis de cuadrantes mediante la colocación de separadores en el canal 44 de FALS y en el 18 de IGFL. La población de SRBC se definió como la del área correspondiente a

menor tamaño y fluorescencia, y el porcentaje de lisis se calculaba según la siguiente formula:

$$\frac{(\text{SRBC control } 0\% - \text{SRBC control } 100\%) - (\text{SRBC muestra} - \text{SRBC control } 100\%)}{\text{SRBC control } 0\% - \text{SRBC control } 100\%}$$

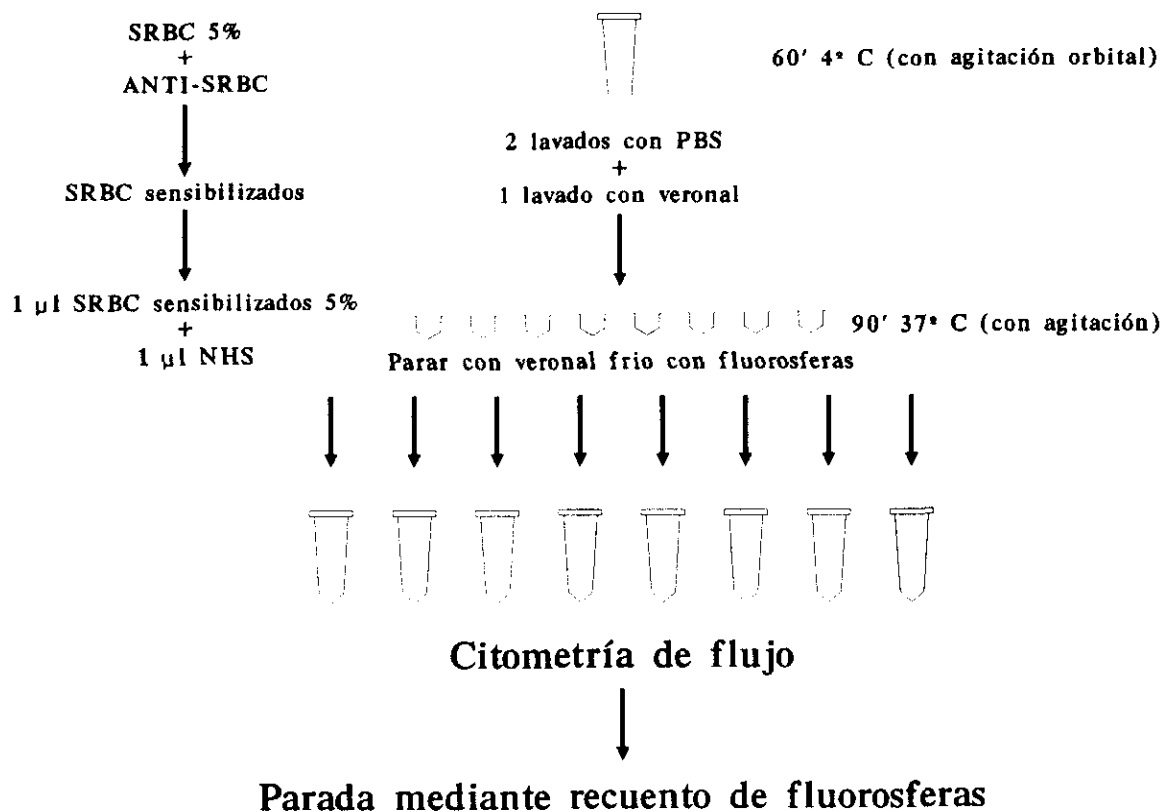


Figura 15. Esquema del ensayo hemolítico mediante citometría de flujo.

## **3.RESULTADOS**



### 3.1. Producción de PS-B a pequeña escala

Los resultados de la producción de 4 lotes diferentes de PS-B, partiendo en todos los casos de 5 litros de cultivo se muestran en la tabla I. Puede observarse que paralelamente al aumento en el rendimiento obtenido por la prolongación del tiempo de cultivo a 48 horas, se produce un aumento significativo de la cantidad de contaminantes. La reducción del tiempo de cultivo a 24 horas prácticamente elimina la contaminación por proteínas y LOS, niveles por debajo del límite de detección, pero hay una drástica caída en el rendimiento (menos del 50% del obtenido a 48 horas) y se sigue manteniendo una apreciable contaminación por a.nucléicos. Esta última se puede reducir sensiblemente acortando el tiempo de incubación a 16 horas sin afectar sensiblemente el rendimiento cuando se compara con 24 horas.

Tabla I. Producción de PS-B purificado.

Lote	Serotipo	Tiempo de cultivo	Rendimiento	% A.nucléicos	% Proteínas	% LOS
B1	B2a	48 horas	10 mg/ml	2,13	2,3	4,2
B2	B2a	24 horas	4,83 mg/ml	2	< 0,1	< 0,05
B3	B15	24 horas	4,76 mg/ml	0,93	< 0,1	< 0,05
B4	B15	16 horas	4,32 mg/ml	0,2	< 0,1	< 0,05

Cuando se ensayó la capacidad inhibitoria de los diferentes lotes de polisacáridos purificados en un ensayo de inhibición de la hemaglutinación con SRBC sensibilizados con un PS-B purificado empleado como referencia (ver apartado 2.2) y el anticuerpo monoclonal MB-85, los resultados fueron imprevistos.

En contra de lo que se podía esperar, el mejor inhibidor era el que contenía una mayor cantidad de contaminantes. De hecho se podía apreciar un correlación directa entre el grado de contaminación por ácidos nucleicos del polisacárido y su eficacia como inhibidor en el ensayo (Fig.16). En base a estos datos se eligió la utilización de PS-B purificado procedente de cultivos de 24 horas para su empleo en estos, al tener un bajo grado de contaminantes y una buena potencia inhibitoria.

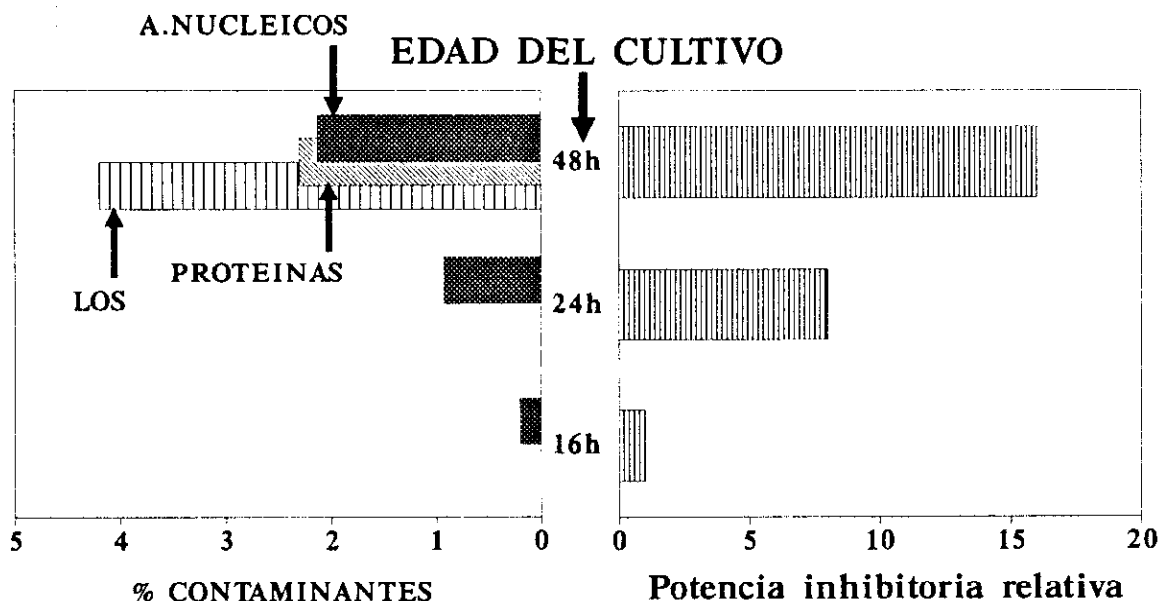
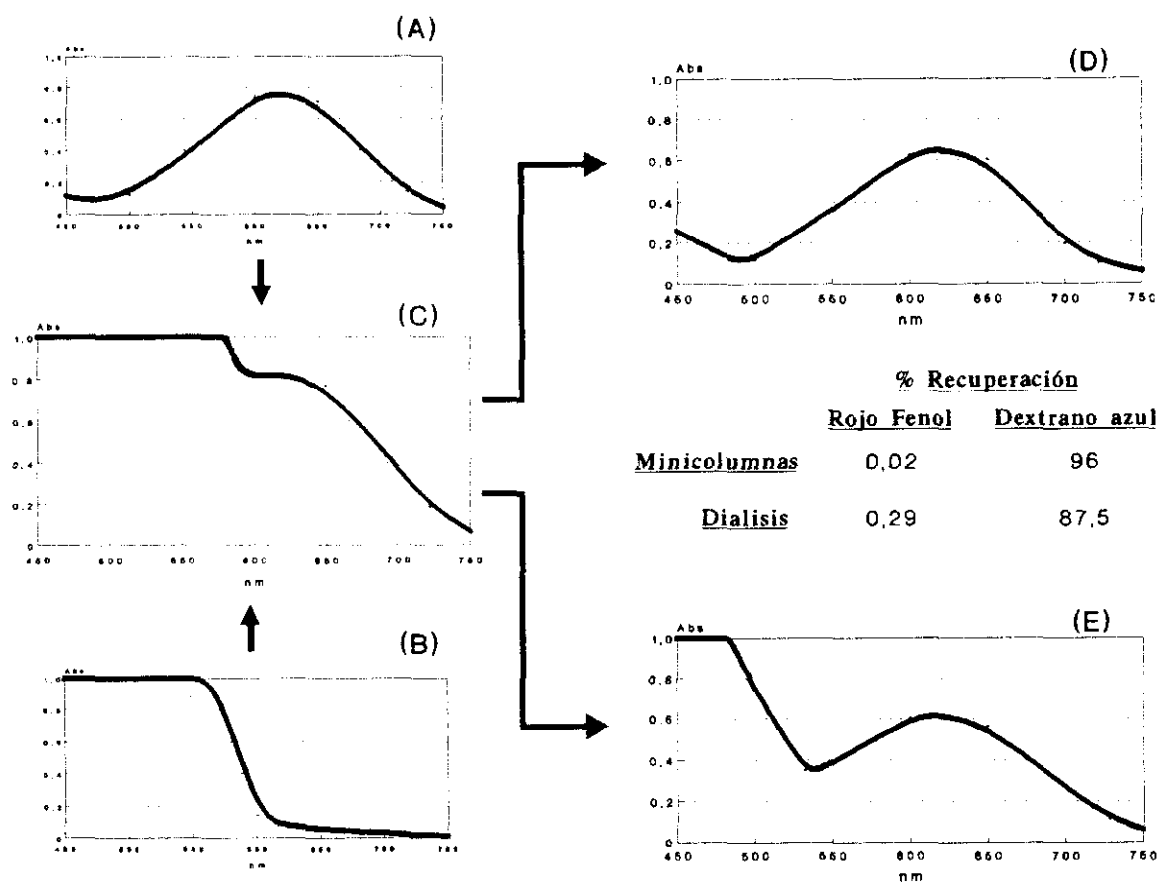


Figura 16. Correlación entre contenido en ácidos nucleicos del PS-B purificado y potencia inhibitoria relativa en un ensayo de inhibición de la hemaglutinación.

### 3.2.Preparación y calibración de minicolumnas

Después de ensayar diferentes alturas de columnas, los resultados óptimos se obtuvieron con dos columnas en serie, empaquetadas hasta una altura de 2 ml. De esta forma, la recuperación de muestra de alto peso molecular era de aproximadamente el 96 %, prácticamente libre de contaminantes de bajo peso

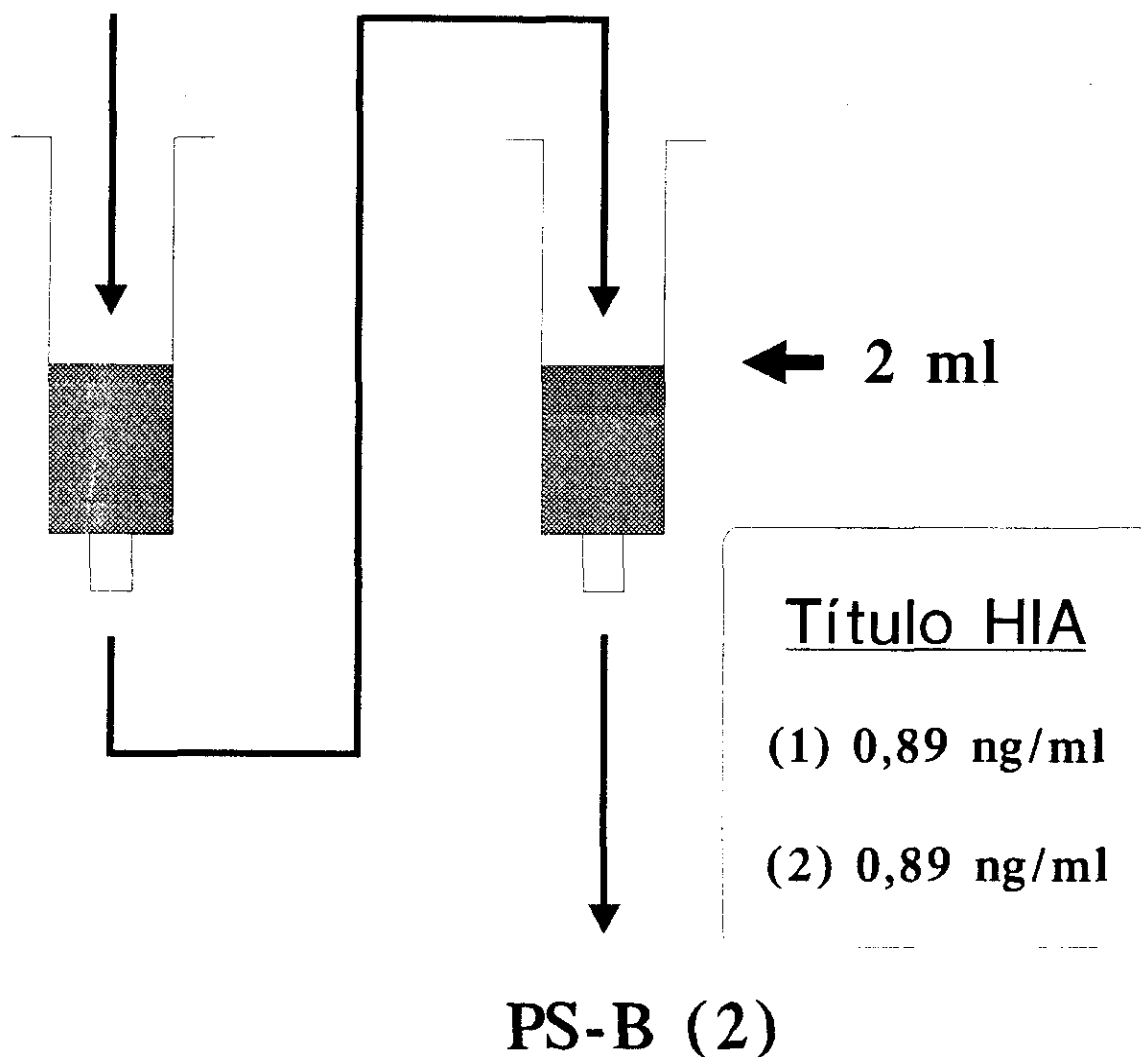
molecular. La comparación de este método con el de diálisis demostró una ventaja substancial en el uso de minicolumnas, tanto para la recuperación de material de alto peso molecular como en la eliminación de contaminantes de bajo peso molecular (Fig.17).



**Figura 17.** Calibración espectrofotométrica de las minicolumnas y comparación con la diálisis. Patrones espectrofotométricos de (A) dextrano azul, 1 ml de una solución de 1 mg/ml, (B) rojo fenol, 1 ml de una solución de 9 mg/ml, (C) una mezcla de A y B, (D) C después de pasar por las minicolumnas, (E) después de la diálisis. Condiciones de la diálisis: 8h a 4°C con 3 cambios de tampón. El porcentaje de recuperación se calculó del cociente entre la absorbancia inicial y la final, utilizando los máximos de absorbancia de los marcadores.



**PS-B (1)**



**Figura 18.** Minicolumnas en tándem: ensayo de inhibición de la hemaglutinación de PS-B antes y después de pasar por las dos minicolumnas.

Con objeto de confirmar la aplicabilidad de las minicolumnas al procedimiento de biotilación de PS-B, una muestra de PS-B purificado (30  $\mu\text{g/ml}$  en agua destilada) se paso consecutivamente a través de dos minicolumnas precalibradas recicladas con agua destilada, centrifugándose como en el procedimiento de

calibración. Alícuotas de la muestra antes y después de pasar por las minicolumnas se ensayaron en HIA, observándose un patrón de inhibición idéntico (Fig.18).

### 3.3. Biotinilación

Cinco diferentes lotes de polisacárido fueron biotinilados, cuatro de PS-B y uno de A + C, empleando 0,5 o 1 ml de una solución 1 mg/ml en agua destilada. El de PS-B biotinilado fue medido como recuperación de ácido siálico, mientras que en el caso de A + C solo se midió por idéntico procedimiento la recuperación de PS-C biotinilado, estimándose que la recuperación de PS-A biotinilado sería de similar magnitud. Los resultados de la tabla II muestran unos rendimientos de PS-B biotinilado de 52,7-67,8% con la solución de 0,5 ml, pudiéndose alcanzar el 76% doblando la cantidad de polisacárido empleado. En el caso de A + C el rendimiento es sensiblemente inferior, debido probablemente a la introducción de un paso adicional.

**Tabla II.** Recuperación de producto final en diferentes lotes de polisacárido biotinilado.

Lote	Serogrupo	Cantidad inicial	Volumen	% Recuperación
B2-1	B	500 µg	500 µl	67,8
B2-2	B	500 µg	500 µl	52,7
B2-3	B	500 µg	500 µl	56,3
B3-4	B	1000 µg	1000 µl	76
AC-5	A+C	500 µg + 500 µg	500 µl	33,3

### 3.4. Determinación de biotina incorporada por molécula de PS-B

La incorporación al método de Green de la disminución en la absorbancia a 350 nm, permite no sólo una cuantificación muy precisa de la incorporación de biotina a la avidina, sino que se observa una gran linealidad en las medidas (Fig.19). Por otra parte, la medida de una longitud de onda adicional en los máximos de absorbancia, 282 nm, permite incorporar un factor de corrección basado en variaciones en la concentración de muestra al estar midiendo directamente concentración de proteína (avidina).

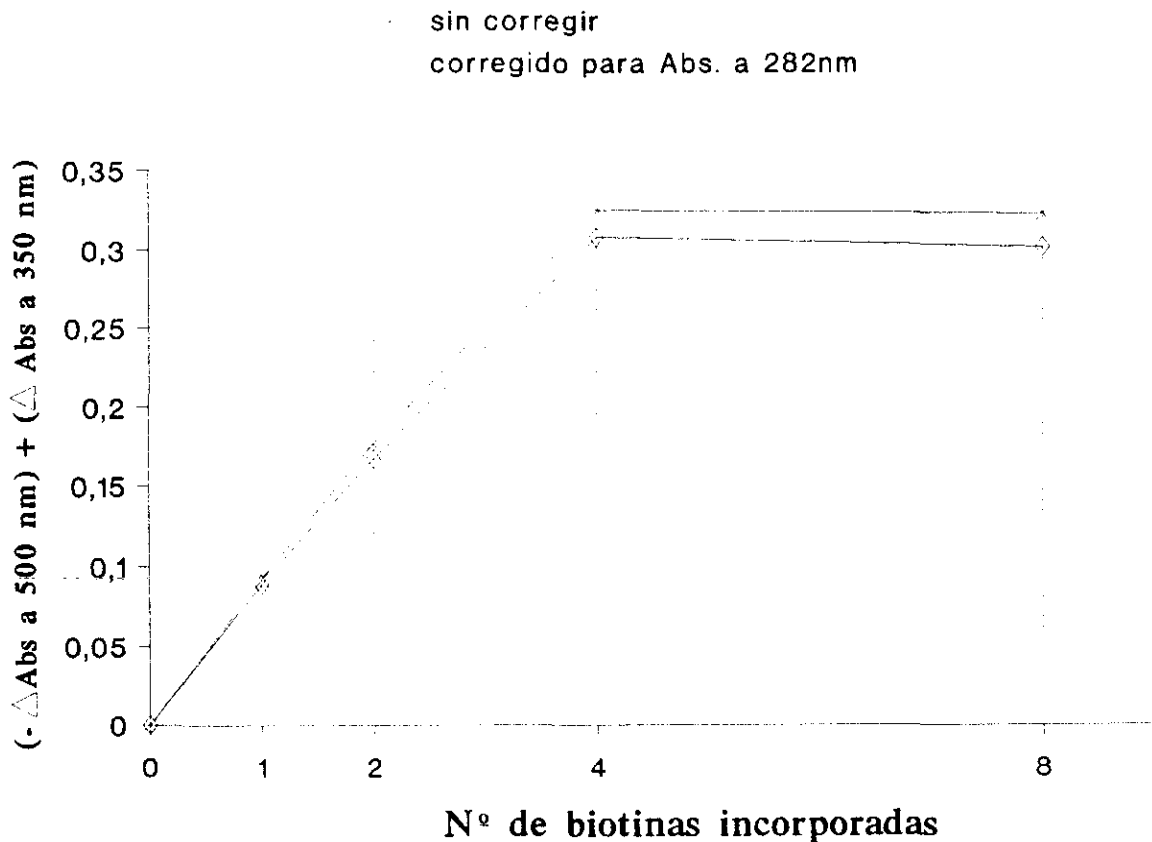


Figura 19. Recta patrón del número de biotinas incorporadas en una molécula de avidina.

**Tabla III.** Determinación espectrofotométrica de biotina incorporada en el PS-B.

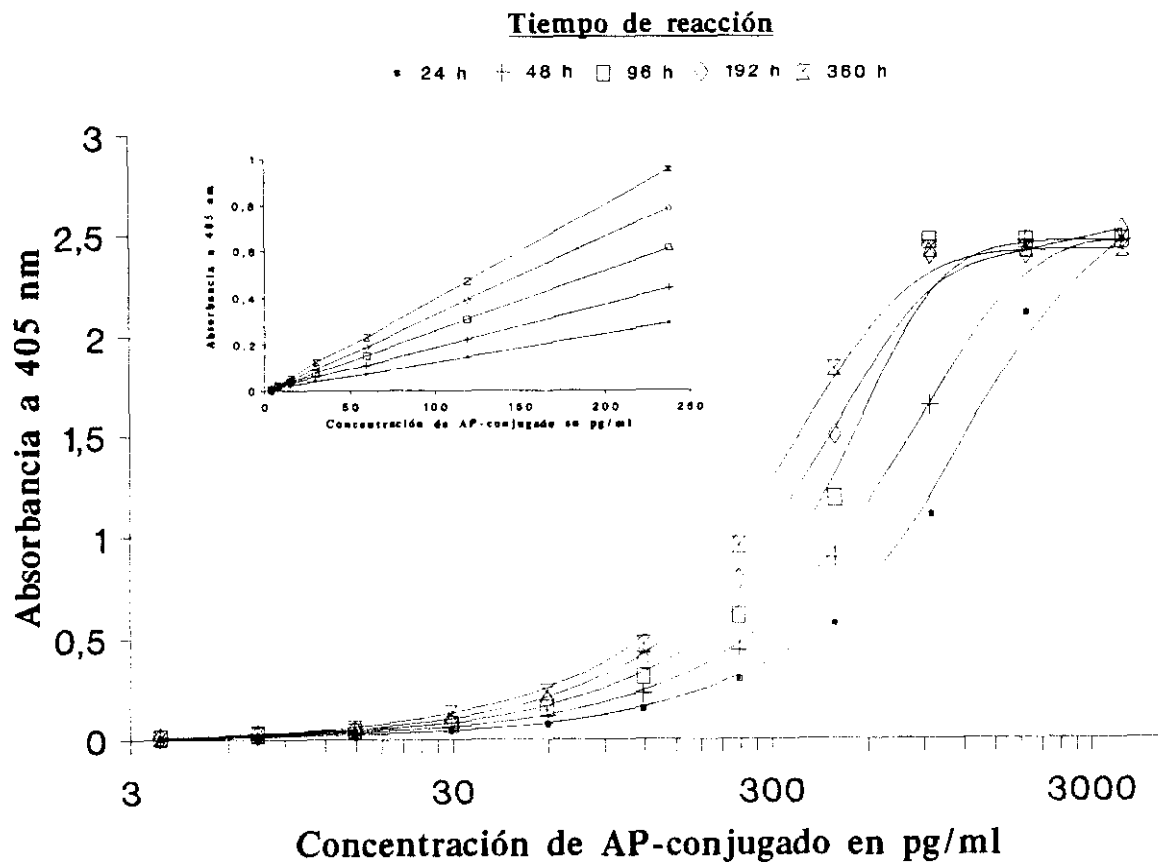
	+ <u>2.6 <math>\mu</math>g Biotina</u>	+ <u>100 <math>\mu</math>g PS-B-Biotina</u>
	↓	↓
	Avidina-Biotina <sup>1</sup>	PS-B-Biotina Avidina-HABA <sup>1</sup>
A500 + A350 <sup>2</sup>	228	52
% sitios ocupados <sup>3</sup>	100	22,8 (30)
biotina incorporada <sup>4</sup>	1.3	0,30 (0,39)

Avidin-HABA: 1.3 unidades de avidina + HABA (una solución saturada y diluida a 1/400); los valores de biotina incorporada se obtuvieron como el producto entre la tasa de ocupación de biotina y las unidades iniciales de avidina; entre paréntesis se encuentran los valores deducidos. 1. Volumen final de 400  $\mu$ l. 2. En unidades de absorbancia x 1000. 3. Sitios de la avidina ocupados por la biotina. 4. Valores dados en  $\mu$ g/ml.

El peso molecular de PS-B calculado para una longitud de 200 residuos es de 61.860 daltons. Asumiendo que únicamente se incorpora una molécula de biotina/molécula de PS-B, y que todas las moléculas de PS-B estén biotiniladas, la incorporación teórica de biotina es de 0,395  $\mu$ g por cada 100  $\mu$ g de PS-B. Considerando el factor de incertidumbre introducido al emplear una longitud para el PS-B no obtenida a partir de datos propios, se puede apreciar una razonable concordancia entre los valores experimentales y previstos de biotina incorporada aún sin incorporar el factor de corrección (tabla III), corroborando la eficacia del procedimiento de biotinilación. Aplicando el factor de corrección el porcentaje de sitios ocupados es aún más similar al deducido: 25,4 frente a 30.

### 3.5. Ensayo colorimétrico de fosfatasa alcalina

Con objeto de optimizar la sensibilidad del ELISA se realizaron pruebas para determinar la influencia del tiempo y la temperatura en el nivel señal/ruido de la pareja cromógeno/substrato elegida para ser utilizada en el desarrollo del ELISA anti-PS-B: fosfatasa alcalina (incorporada en un conjugado) y pNPP.



**Figura 20.** Cinética enzimática dependiente del tiempo del conjugado de inmunoglobulina y fosfatasa alcalina. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y sin parada. El gráfico pequeño muestra la última parte de las curvas a escala lineal.

En experimentos preliminares, se estableció la cinética dependiente de la temperatura de conjugados enzimáticos mediante incubación a 25°C y 37°C (resultados no mostrados). Se observaba que las mayores cantidades de cromógeno se desarrollaron a 25°C cuando se utilizaron tiempos prolongados de reacción de 24 h o más. La sensibilidad en función del tiempo de revelado para el conjugado-AP incubado a temperatura ambiente se muestra en la figura 20. Considerando el límite de detección como la concentración de conjugado que produce una absorbancia mayor de 0,02, este es de 5-10 pg/ml para los tiempos de revelado más largos.

### **3.6.ELISA anti-PS-B con precubrimiento con lectinas**

De las dos lectinas empleadas para los ensayos de precubrimiento, WGA y limulina, la primera no diferenciaba en ensayos de hemaglutinación entre SRBC sensibilizados con PS-B y SRBC sin sensibilizar (aglutina SRBC al 0,25 % a 4  $\mu\text{g/ml}$ ). El ácido N-acetil-neuramínico mostraba una baja capacidad de inhibición en un sistema de hemaglutinación SRBC-WGA: 5.000  $\mu\text{g/ml}$  era la última concentración inhibitoria frente a los 312,5  $\mu\text{g/ml}$  de la N-acetil-D-glucosamina, la principal especificidad de la WGA, y no se observaba una mejor captación de PS-B en placas recubiertas con WGA que en los controles sin precubrimiento.

Los ensayos llevados a cabo con la limulina demuestran una mayor afinidad de esta por el PS-B. La limulina, una lectina dependiente de calcio, en presencia de este hemaglutina mejor SRBC sensibilizados con PS-B que sin sensibilizar, y en un

tampón sin calcio falla en hemaglutinar SRBC que no están sensibilizados con PS-B (Tabla IV). Curiosamente, el monoclonal MB-85 falla en la hemaglutinación de SRBC sensibilizados con PS-B cuando el ensayo se realiza en presencia de calcio. Cuando se utilizó limulina en el recubrimiento de placas de microtitulación, se observó una unión del PS-B a las placas de microtitulación dependiente de la concentración de limulina empleada en el prerecubrimiento (Fig.21). Pero el sistema era muy sensible a las condiciones del ensayo: la unión del PS-B a las placas con limulina era abolida al utilizar tampones con suero de ternera fetal o leche descremada. Esto probablemente es debido a la interferencia con glicoproteínas sializadas y limita mucho el uso potencial de la limulina en un ELISA anti-PS-B.

**Tabla IV.** Hemaglutinación mediada por MB-85 o limulina de SRBC sensibilizados con PS-B y sin sensibilizar, en presencia y ausencia de calcio.

	SRBC-PS-B	SRBC
Limulina en TBS-Ca	625-312 ng/ml	1250-625 ng/ml
MB-85 en TBS-Ca	-	-
Limulina en PBS	625-312 ng/ml	-
MB-85 en PBS	270-135 ng/ml	-

Los valores representados son la última concentración que produce hemaglutinación y la primera que falla en producirla. El signo indicativo indica que no hay hemaglutinación a la concentración más alta empleada: para limulina 10  $\mu\text{g/ml}$  y 34,5  $\mu\text{g/ml}$  en el caso de MB-85.

## Prerecubrimiento

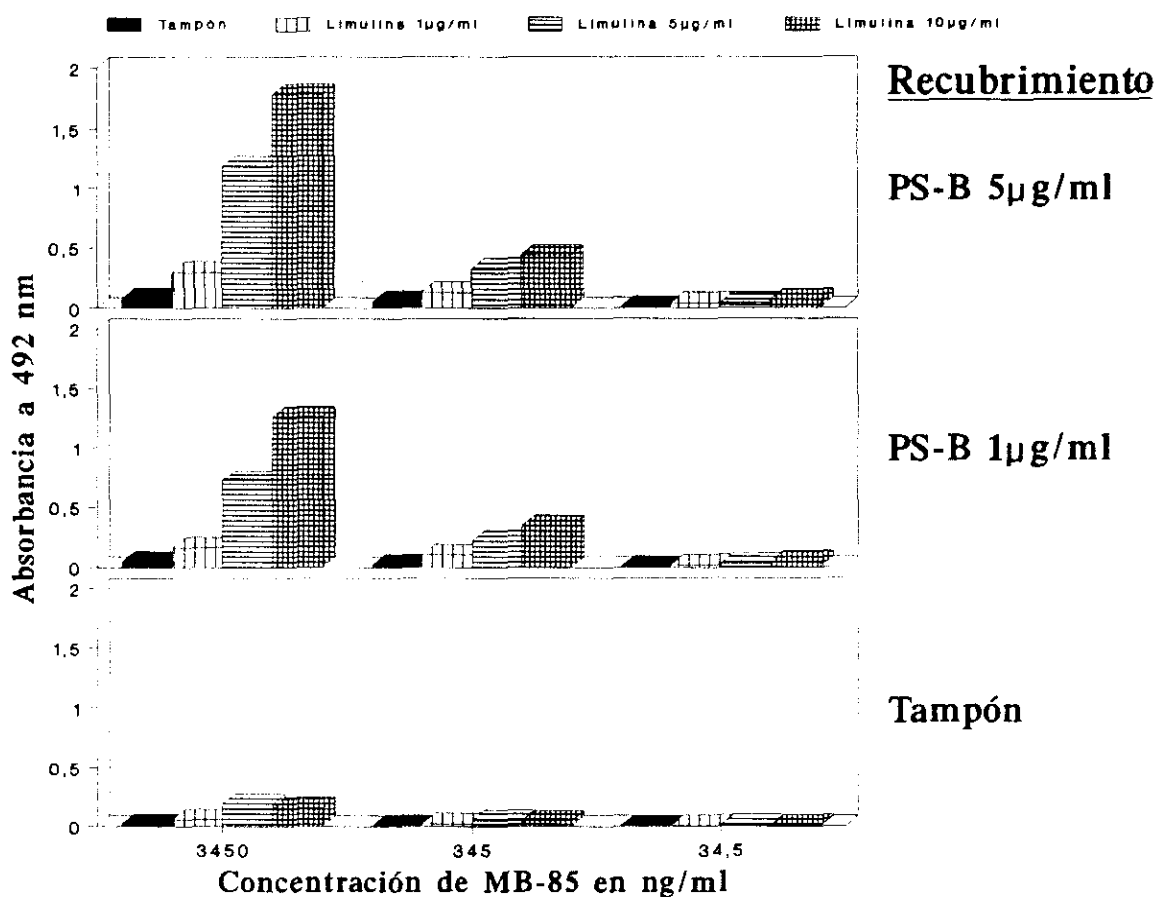


Figura 21. ELISA anti-S-B con prerecubrimiento con limulina.

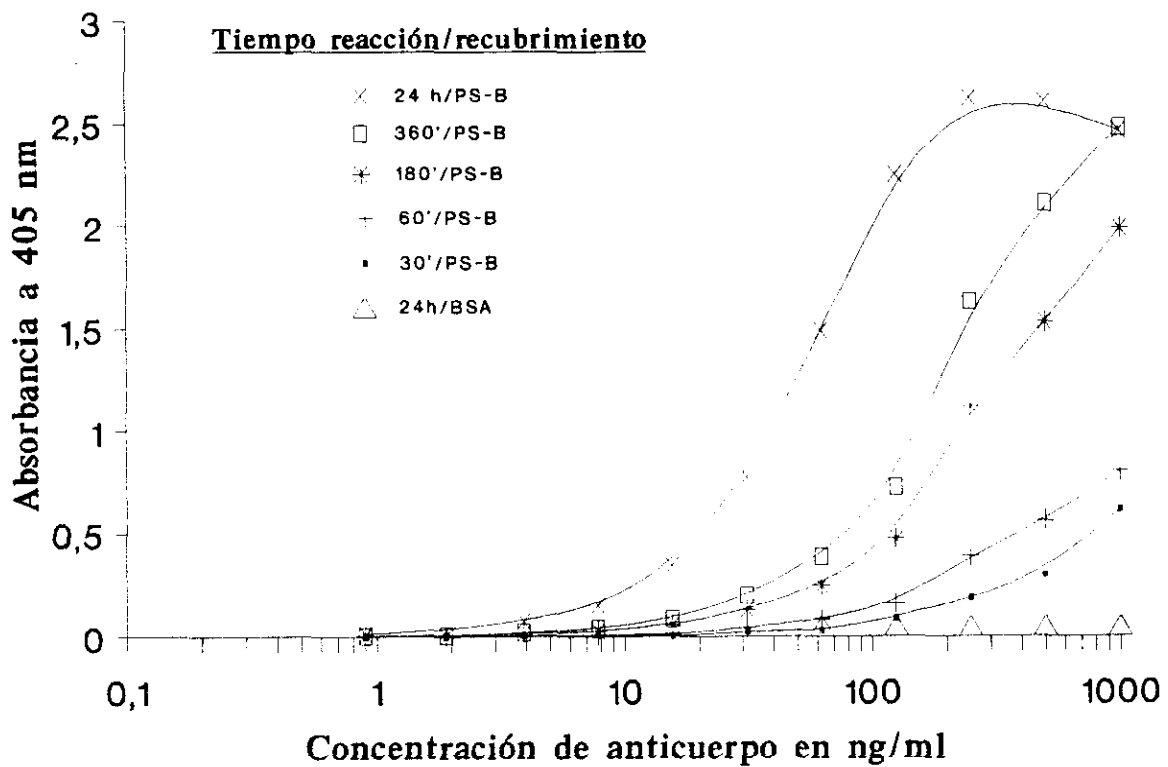
### 3.7. ELISA anti-PS-B con prerecubrimiento con estreptavidina

#### 3.7.1. Sensibilidad

Con objeto de averiguar la sensibilidad del ensayo, se empleó un anticuerpo monoclonal específico para PS-B: MB-85. Como controles de unión inespecífica se utilizaron pocillos con recubrimiento de BSA biotinilado, mostrando la figura 22 que no se producía señal de absorbancia en los mismos. El límite de detección disminuía a medida que aumentaba el tiempo de revelado, alcanzando 5 ng/ml a las



24 horas, considerando concentraciones de MB-85 que producen un valor de absorbancia mayor de 0,1. Este limite era reproducible en múltiples ensayos utilizando las mismas condiciones de temperatura y tiempos de incubación. La comparación con un ELISA convencional (Fig. 23), muestra claramente las ventajas del presente ensayo tanto en sensibilidad como en especificidad.



**Figura 22.** Sensibilidad del ELISA específico de PS-B con PS-B biotinilado para la medida del anticuerpo monoclonal MB-85. Representación de diferentes tiempos de revelado con p-NPP.

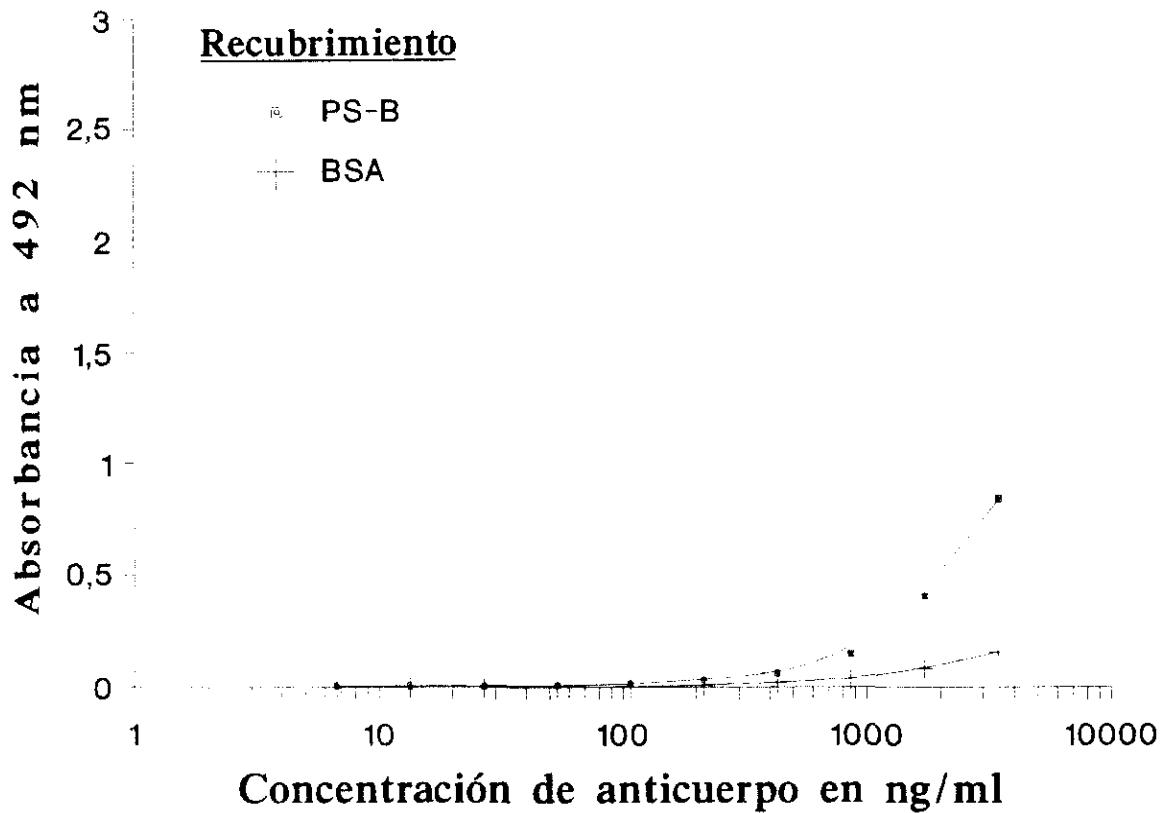
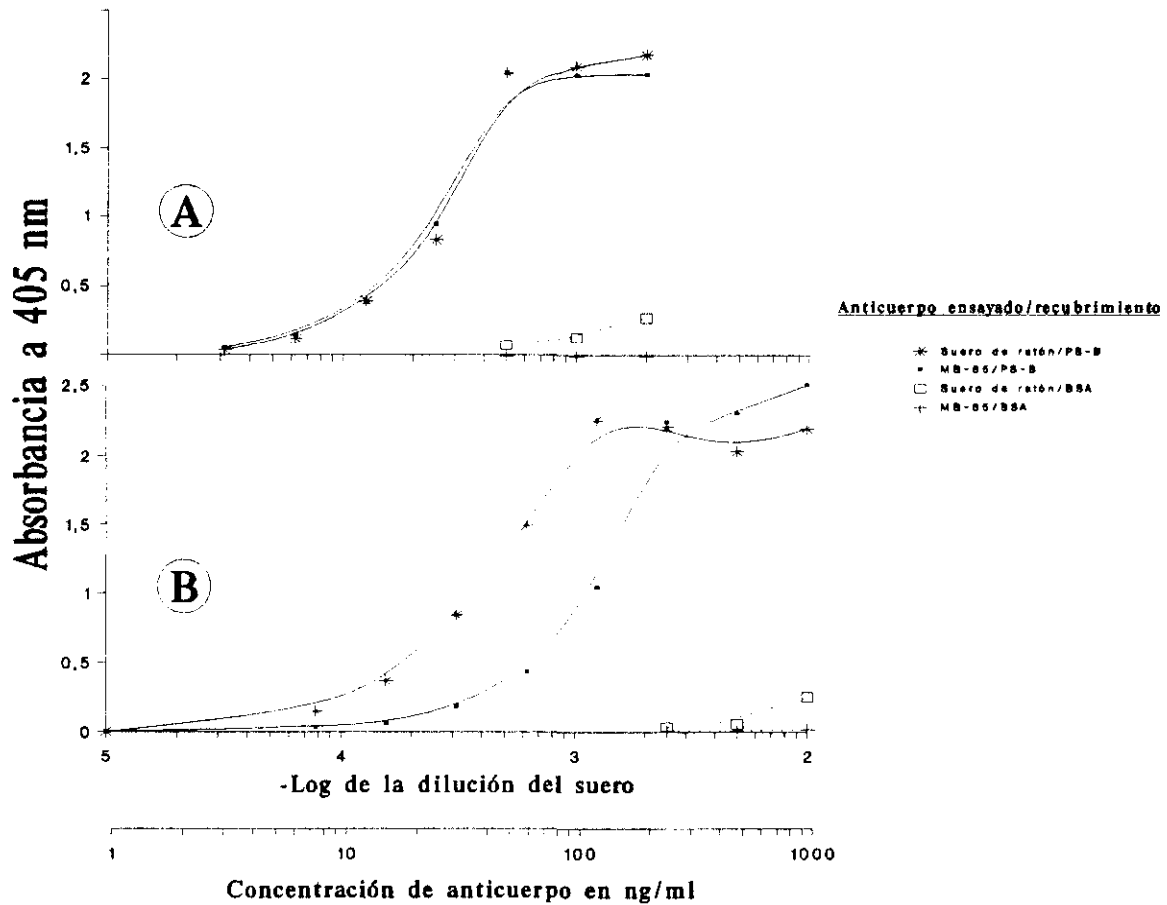


Figura 23. ELISA anti-PS-B con precubrimiento con poli-L-lisina. Titulación de MB-85.

### 3.7.2. Titulación de sueros de ratón PS-B específicos

Los niveles anti-PS-B en suero se determinaron en el "pool" (A) de sueros de ratón anti-PS-B (ver apartado 2.4), utilizando MB-85 como referencia. Con objeto de obtener la curva de calibración, los valores de absorbancia se representaron en función de el  $\log_{10}$  de la concentración de anticuerpo, y se ajustó una recta a partir de la porción lineal de la curva. De esta manera se estimaron títulos de anticuerpo de  $86 \mu\text{g/ml}$  para la respuesta anti-PS-B secundaria (Fig.24A) y de  $208 \mu\text{g/ml}$  para la respuesta terciaria (Fig.24B). Los controles de presangramiento para las

diluciones más bajas del suero no eran significativamente diferentes de los valores de unión inespecífica (no mostrado).



**Figura 24.** Titulación de un suero de ratón específico para PS-B utilizando el anticuerpo monoclonal MB-85 como patrón. A. Respuesta secundaria, 24 h de reacción con p-NPP; B. Respuesta terciaria, 2 h de reacción con p-NPP.

De forma similar se tituló un segundo "pool" (B) de sueros de ratón específicos de PS-B determinando en este caso tanto la respuesta total, como la fracción IgM y la fracción IgG de anticuerpos PS-B específicos. Los resultados de la figura 25 muestran la validez del ensayo, confirmando resultados previamente

publicados: una mayoritaria respuesta de IgM PS-B específicas con una mínima proporción de IgG.

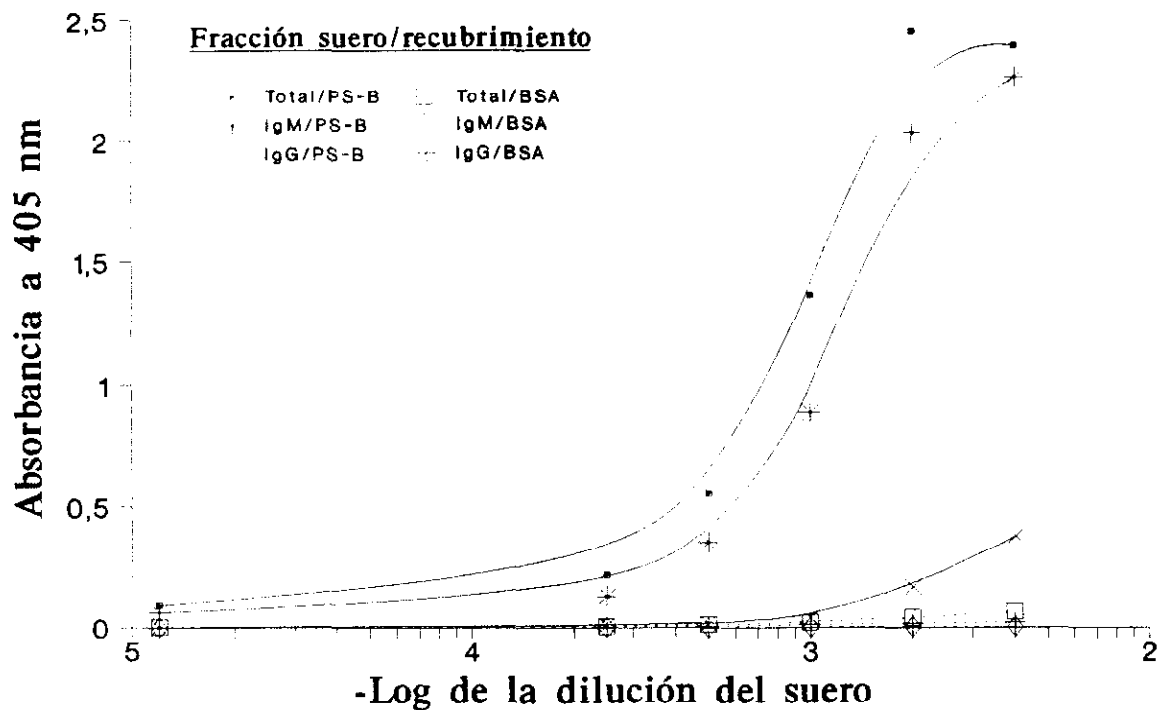


Figura 25. ELISA anti-PS-B específico de isotipos. Fracciones total, IgM e IgG de un suero de ratón específico.

### 3.7.3. Evaluación de bloqueantes

La sensibilidad y especificidad del ensayo mostraba una clara influencia por el diluyente empleado en la incubación del anticuerpo primario. Con el monoclonal MB-85 se podía observar al comparar SkiM con FCS, una sensibilidad disminuida junto con un aumento de la unión inespecífica, en el caso de SkiM (Fig.25).

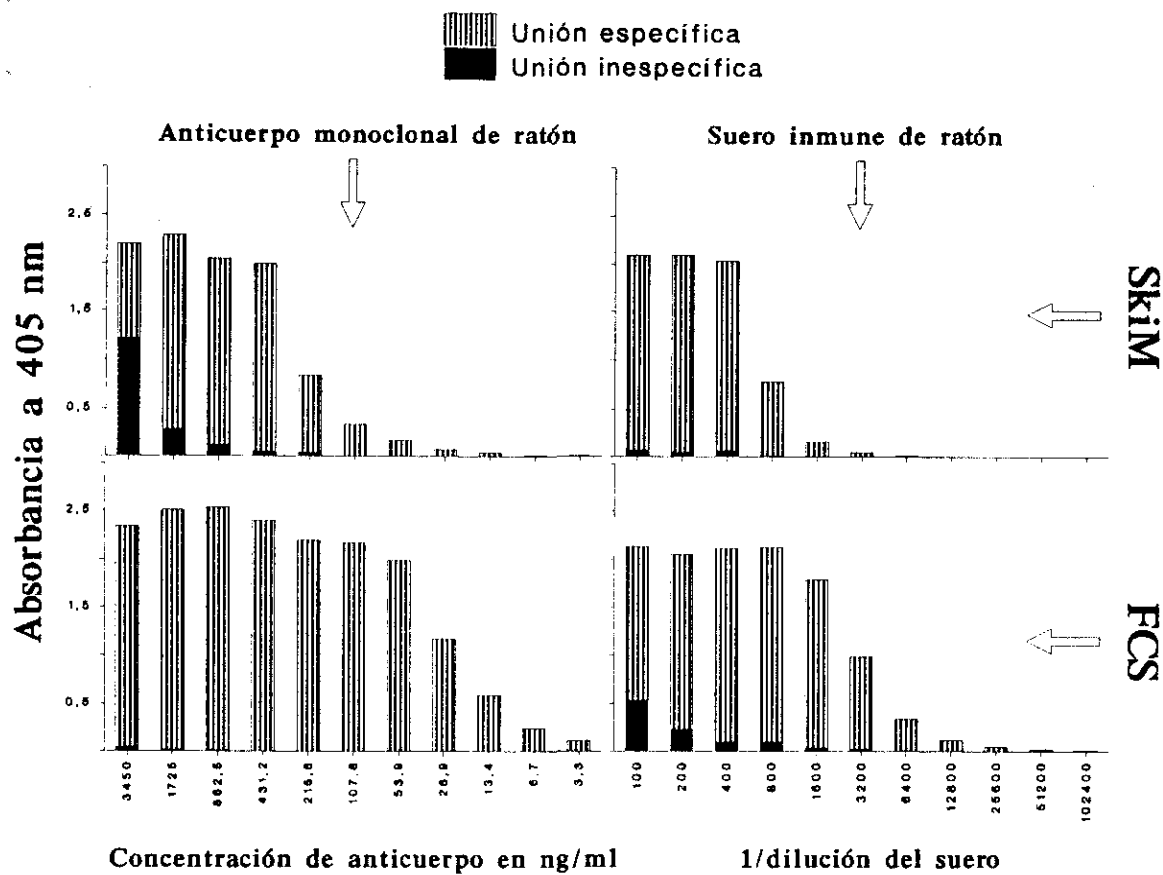


Figura 26. Efectos del agente bloqueante en sensibilidad y especificidad del ELISA anti-PS-B.

Al comparar los mismos diluyentes en la titulación de un suero de ratón con especificidad para PS-B ("pool" A), el patrón era algo diferente: mientras la leche disminuía la sensibilidad como en el caso del monoclonal, la unión inespecífica también se veía reducida al comparar con FCS.

### 3.7.4. Análisis de las condiciones óptimas del ensayo

El efecto de la temperatura de incubación en el sistema de ensayo podía ser un factor importante en la optimización del presente ELISA puesto que se ha

descrito la importancia de este parámetro en la interacción del PS-B con anticuerpos específicos (167). Con objeto de analizar el efecto de la temperatura en el ELISA anti-PS-B así como la concentración óptima de PS-B necesaria para sensibilizar las placas de microtitulación, se empleó una variante del ELISA con recubrimiento con estreptavidina: la fase sólida fue recubierta con capas alternas de BSA biotinilada y avidina (ver apartado 2.10.6). Los resultados de 2 ensayos realizados a 4°C y 37°C con diferentes concentraciones de PS-B y utilizando el anticuerpo monoclonal MB-85 pueden verse en la figura 26. Mientras que a 4°C el título del ELISA no se veía influido por la concentración de antígeno utilizada para sensibilizar las placas, a 37°C el ensayo era dependiente de la densidad antigénica. A la mayor concentración antigénica utilizada en los ensayos (4µg/ml) estas diferencias parecían borrarse.

Por otra parte, al comparar los resultados con los obtenidos con el recubrimiento con estreptavidina se observaba que la unión inespecífica era mayor en el ensayo con BSA biotinilado/avidina, a pesar de haber utilizado en este un bloqueante que funcionó mejor en experimentos preliminares: Caseína-timerosal, un bloqueante con propiedades bloqueantes similares a los de la leche pero que no produce las interferencias anteriormente observadas (resultados no mostrados).

Observando los ensayos a diferentes temperaturas se observaban también diferencias en la unión inespecífica: en contra de lo que podría esperarse la unión inespecífica era mayor a 4°C que a 37°C.

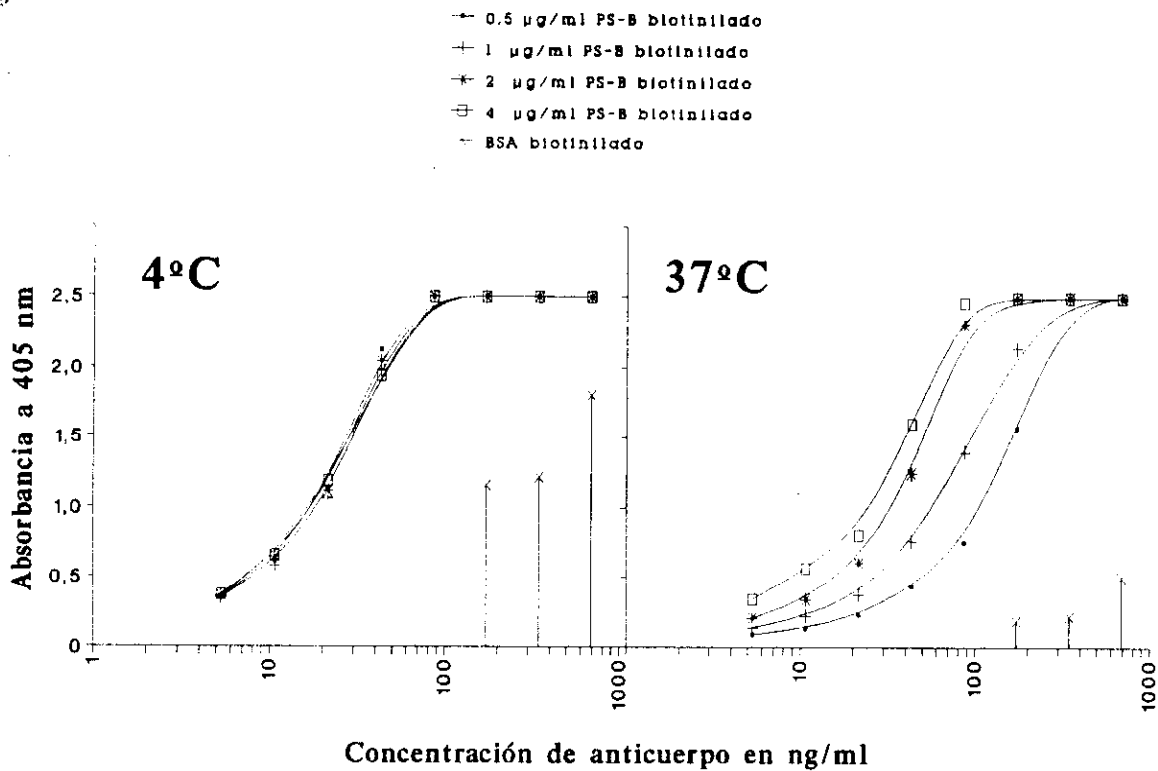
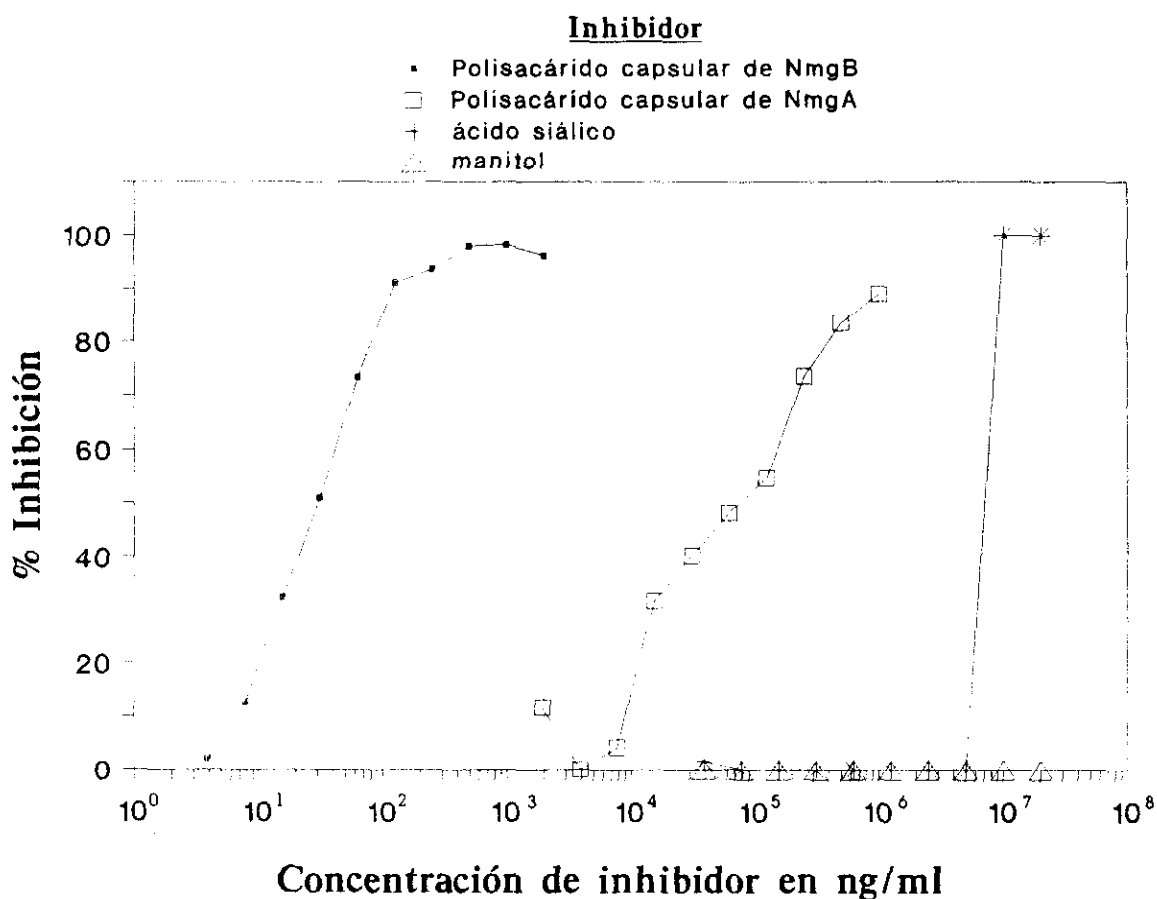


Figura 27. Dependencia de densidad antigénica y temperatura en la unión de MB-85 a PS-B.

### 3.8. Estudios de inhibición mediante EIA competitivo

Con objeto de comprobar el grado de especificidad de la interacción MB-85 y PS-B, se realizaron experimentos de inhibición mediante un EIA competitivo utilizando un diseño experimental similar al de Meikle y col. (177). Los resultados de un experimento representativo con diferentes inhibidores se muestran en la figura 27. La incubación de PS-B purificado con su conjugado de biotina originaba una inhibición específica de la unión del conjugado en una forma dependiente de la dosis. Cuando se calculaba el valor  $[I_{50}]$ , la concentración de inhibidor a la cual se obtiene una reducción del 50% de la unión, se obtuvo un valor de 30 ng/ml que

se correlaciona muy bien con el valor teórico previsto al suponer una identidad inmunológica completa entre el PS-B y su conjugado a biotina (20 ng/ml). Utilizando suero policlonal de caballo específico para sensibilizar la placas, se obtuvieron resultados similares, pero la sensibilidad del ensayo era mucho menor y no se empleó posteriormente para comparación con otros inhibidores.



**Figura 28.** Curvas de inhibición del anticuerpo monoclonal MB-85 con diferentes inhibidores.

Al observar el comportamiento de otros inhibidores, se pudo medir y cuantificar una actividad inhibitoria de la interacción PS-B biotinilado/MB-85 tanto con polisacárido capsular de NmgA como con ácido N-acetil-neuramínico. El control



negativo utilizado, manitol, no produjo inhibición a ninguna de las concentraciones empleadas. Definiendo un parámetro de especificidad relativa, expresado como el cociente entre el valor  $[I_{50}]$  del PS-B nativo y el de diferentes inhibidores, se obtenía un valor de  $0,5 \times 10^{-3}$  en el caso del polisacárido de NmgA, y de  $0,4 \times 10^{-5}$  para el ácido N-acetil-neuramínico. Comparando estos datos con los obtenidos por ensayos de inhibición de la hemaglutinación de SRBC sensibilizados con PS-B nativo, y substituyendo en este caso  $[I_{50}]$  por la concentración mínima que produce inhibición de la hemaglutinación para calcular la especificidad relativa (Tabla V), se podía observar una buena correlación entre los valores calculados por los dos métodos.

**Tabla V.** Especificidad relativa de la interacción MB-85/PS-B medida por EIA o HIA.

<b>Inhibidor</b>	<b><math>[I_{50}]</math></b>	<b>Especificidad relativa</b>	<b>Título HIA</b>
<b>PS-B</b>	30	1 (1)	1
<b>PS-A</b>	65.000	$0,5 \times 10^{-3}$ ( $0,2 \times 10^{-3}$ )	5.000
<b>ácido siálico</b>	$7,5 \times 10^6$	$0,4 \times 10^{-5}$ ( $0,5 \times 10^{-5}$ )	$2 \times 10^5$
<b>manitol</b>	-	-	-

La especificidad relativa medida por EIA aparece en paréntesis;  $[I_{50}]$  y el título de HIA (concentración mínima que produce hemaglutinación) se dan en ng/ml.

### **3.9. Estudio de la respuesta inmune a PS-B en diferentes especies animales**

Con objeto de estudiar la inducción de una respuesta específica al PS-B en diferentes especies animales, se utilizó el ELISA con recubrimiento con estreptavidina anteriormente descrito. Sueros anti-PS-B producidos en conejos,

hámsteres y ratones fueron analizados por este ensayo. Adicionalmente, se empleó también el ensayo de hemaglutinación con objeto de comparar la sensibilidad y especificidad de ambos ensayos, y para valorar el título del suero policlonal de caballo H46, que presenta especificidad para el PS-B.

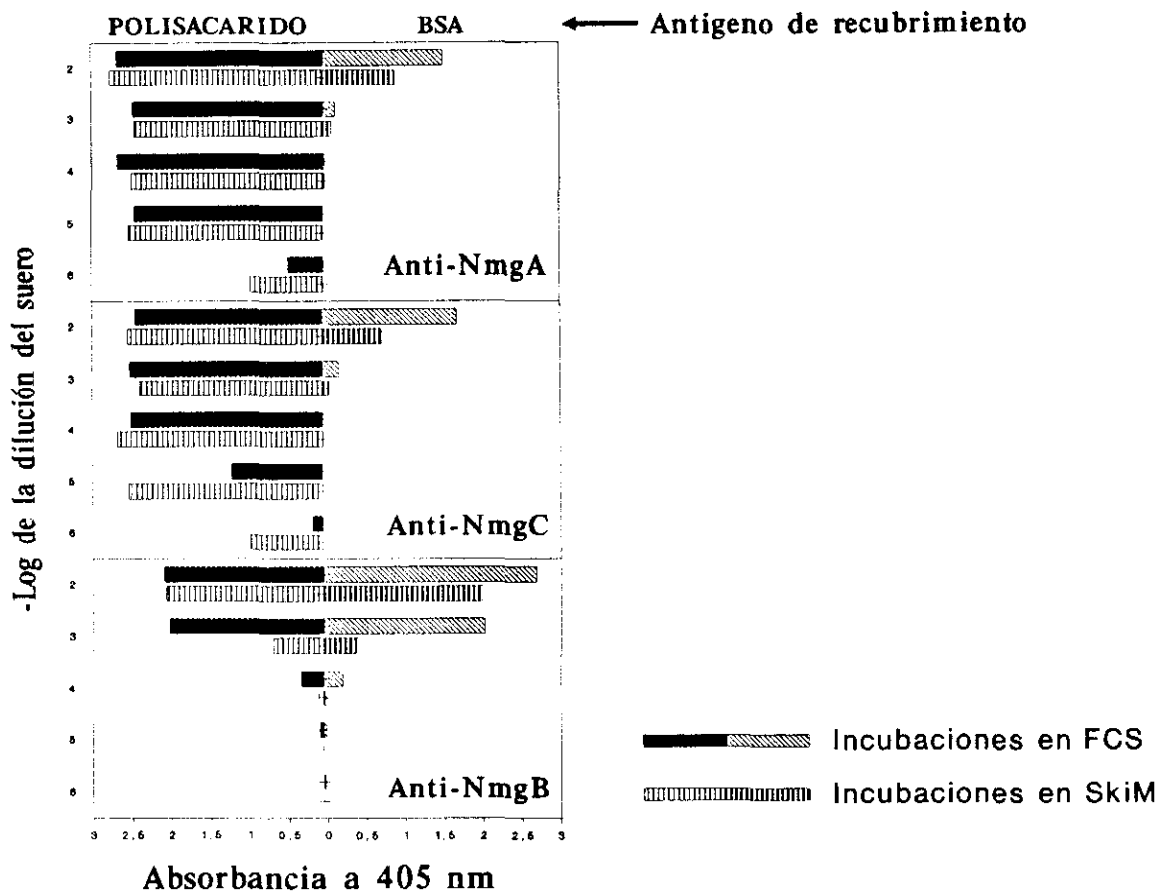
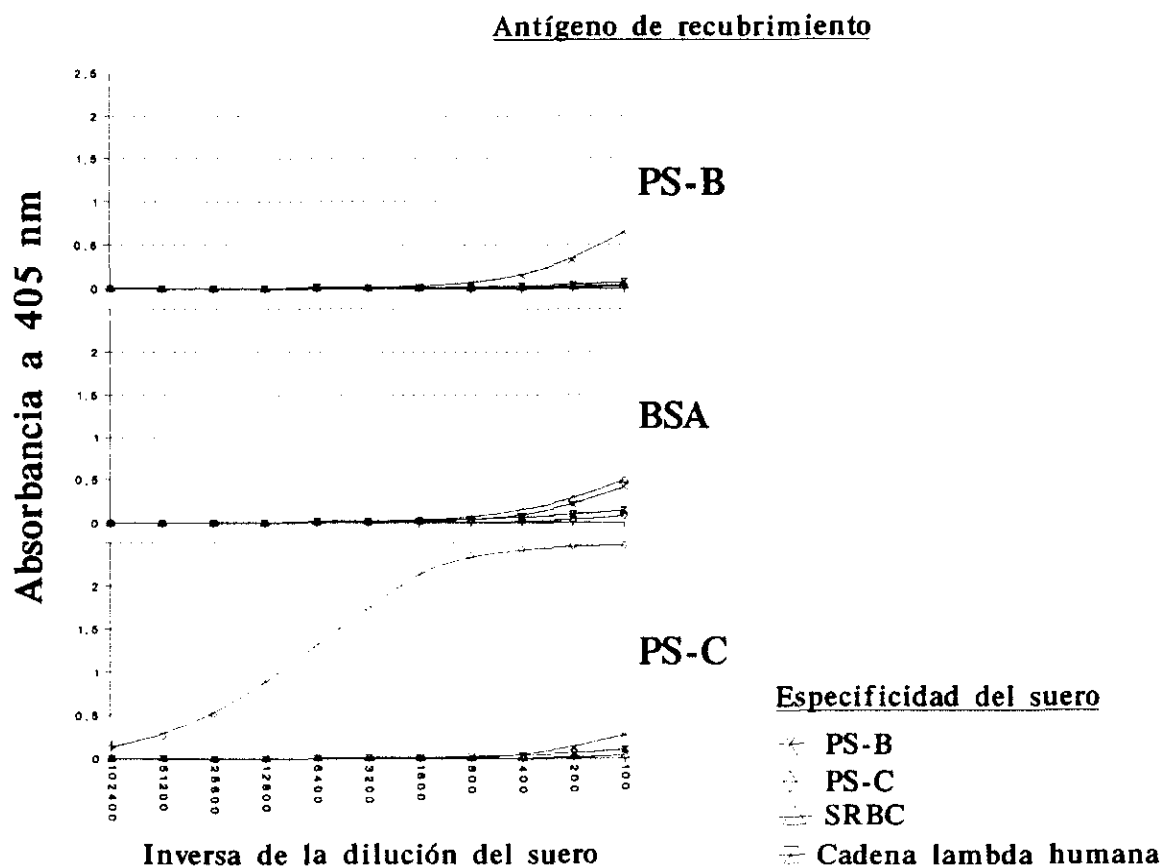


Figura 29. Evaluación del título y especificidad de antisueros de conejo para serogrupo y comparación de dos agentes bloqueantes.

### 3.9.1. Conejo

En primer lugar se evaluó el título y especificidad de un suero comercial inmune de conejo producido por hiperinmunización con la bacteria completa

(*N.meningitidis* grupo B) utilizado habitualmente en diagnóstico para la identificación del serogrupo, y comparándolo a sueros similares específicos para los grupos A y C. Los resultados de este ELISA, en el que también se evaluaron las propiedades como bloqueantes de SkIM y FCS se muestran en la figura 29. En contraste con los grupos A y C, para los que se observó que los sueros presentaban un título alto, *N.meningitidis* grupo B parecía fallar en originar una respuesta específica: el título no sólo era bajo sino que se prácticamente se solapaba con la unión inespecífica. Los resultados obtenidos con sueros de dos fuentes comerciales (Difco y Pasteur) no fueron significativamente diferentes.



**Figura 30.** Especificidad del suero de conejo anti-PS-B. Pruebas comparativas con otros sueros y antígenos de recubrimiento.

Por otra parte, y contrariamente a lo observado anteriormente, se comprobó que en este caso la leche funcionaba mejor como bloqueante que el suero de ternera fetal. Con objeto de comprobar si esta respuesta anti-PS-B era realmente específica, se comparó la unión de otros sueros policlonales de conejo a placas recubiertas con PS-B, o con otros antígenos (Fig.30). Se puede comprobar que el suero policlonal de conejo anti-PS-B tiene realmente especificidad por el polisacárido puesto que es el único en unirse a placas recubiertas con PS-B, pero también tiene otras especificidades puesto que también se une significativamente a placas recubiertas con BSA y polisacárido capsular de *N.meningitidis* grupo C.

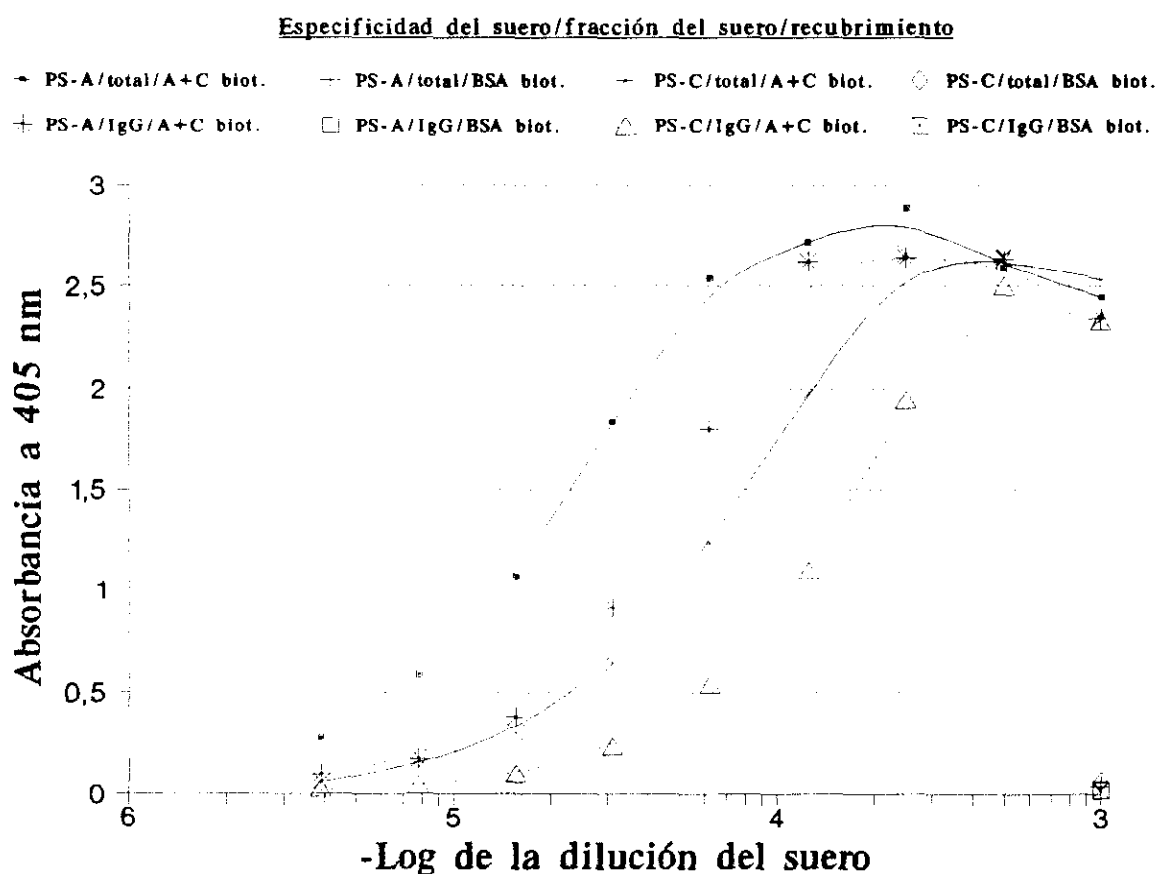


Figura 31. Determinación de la fracción IgG de los sueros de conejo anti-PS-A y anti-PS-C.

Como en el caso anterior con el suero de ratón anti-PS-B, en los sueros de conejo también era posible medir isotipos, y se pudo observar en los caso de los polisacáridos de NmgA y C que una parte importante de la respuesta era debida a IgG (Fig.31). Al comparar los resultados obtenidos por el ELISA con estreptavidina con los obtenidos por hemaglutinación (Tabla VI), se observa una sensibilidad 100 veces mayor en el caso del ELISA , tanto para los sueros policlonales de conejo, como para el monoclonal MB-85 anteriormente titulado. Además, y contrariamente a lo que sucedía en conejo, la hiperinmunización con NmgB si inducía en caballo un título alto de anticuerpos anti-PS-B, equiparable al inducido en conejo con NmgA o NmgC.

**Tabla VI.** Títulos de hemaglutinación de MB-85 y anticuerpos policlonales de conejo y caballo con SRBC sensibilizados con el polisacárido homólogo o con polisacáridos heterólogos.

	<u>Polisacárido utilizado para sensibilizar eritrocitos</u>		
	PS-A	PS-B	PS-C
<b>MB-85</b>	N.D.	430-860 ng/ml	N.D.
<b>Suero anti-B</b>	1/400-1/800	-	-
<b>Suero anti-A</b>	-	1/16.000-1/32.000	-
<b>Suero anti-C</b>	-	-	1/8.000-1/16.000
<b>H-46</b>	N.D.	1/8.000-1/16.000	N.D.

El signo negativo indica que no hay hemaglutinación a la concentración más alta empleada (1/100). Los valores representados son la última concentración que produce hemaglutinación y la primera que falla en producirla. Con objeto de comparación con valores de ELISA, se toma el valor medio entre estos dos valores. Las concentraciones se dan en ng/ml de anticuerpo monoclonal o dilución del suero para los policlonales. N.D.: no determinado.

### 3.9.2. Hámster

Con objeto de comprobar si el fallo en la obtención de títulos altos de anti-PS-B mediante hiperinmunización, era un caso aislado en conejos o se podía generalizar para otras especies, se realizó un seguimiento temporal de la respuesta a PS-B utilizando un protocolo de hiperinmunización en hámsteres sirios, una especie no muy alejada filogenéticamente del conejo. La figura 32 muestra que la hiperinmunización en hámster producía también una pobre respuesta anti-PS-B: se requerían 4 inmunizaciones para obtener una respuesta significativa, y los títulos caían después de la quinta inmunización.

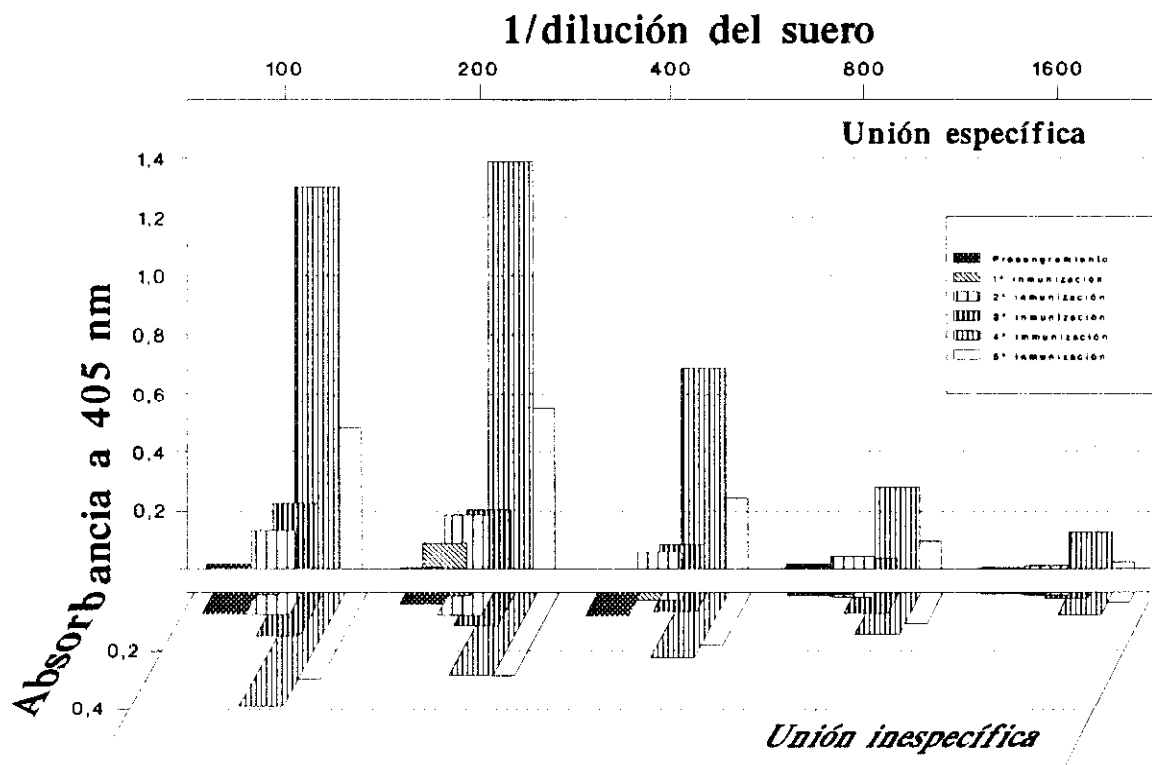
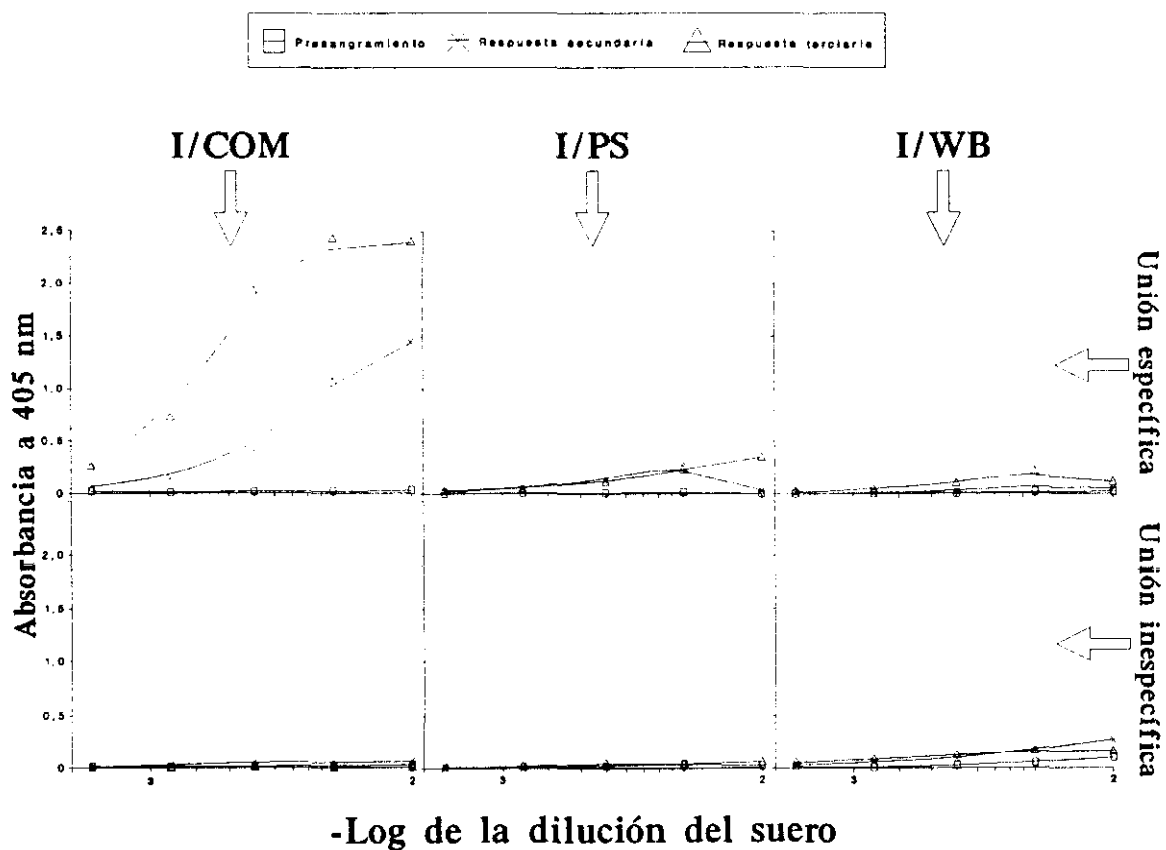


Figura 32. Seguimiento temporal de la respuesta específica en hámster por hiperinmunización con *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

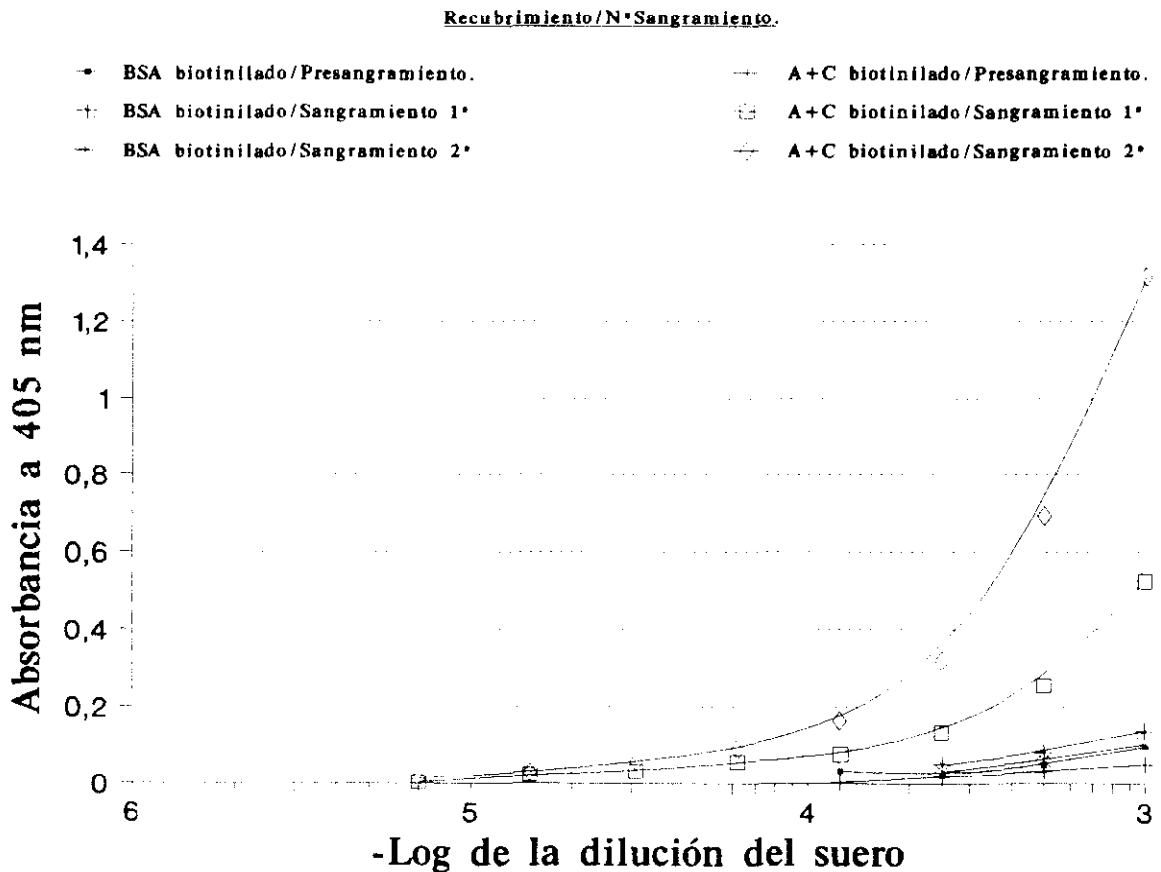
### 3.9.3. Ratón

Se produjeron sueros de ratón utilizando tres inmunógenos diferentes: bacterias (NmgB) formalinizadas, polisacárido purificado, y complejo no covalente de proteínas de membrana externa y PS-B. El título y especificidad de las respuestas secundarias y terciarias se analizaron por ELISA (la respuesta primaria fue muy baja con los tres inmunógenos). La figura 33 muestra que únicamente el complejo inducía un título moderadamente alto de respuesta específica a PS-B, mientras que las respuestas inducidas por PS-B o bacterias enteras eran muy bajas, solapando esta última con las curvas de unión inespecífica.



**Figura 33.** Inmunización en ratón con diferentes inmunógenos. I/COM=inmunización con complejo no covalente de proteínas de membrana externa y PS-B; I/PS=inmunización con PS-B purificado; I/WB=inmunización con la bacteria entera.

La diferencia en las respuestas obtenidas entre el PS-B purificado y el complejo no covalente no podía explicarse en base a diferencias inmunológicas del polisacárido en los dos inmunógenos, puesto que cuando ambos fueron comparados en un ensayo de inhibición de la hemaglutinación, el título resultante fue idéntico cuando se comparaban en base a cantidad de ácido siálico presente en las dos muestras (resultados no mostrados). Por otra parte, al estudiar la respuesta originada por otro polisacárido capsular purificado (el de NmgA) se podía observar un título significativo desde la primera inmunización (Fig.34).



**Figura 34.** Respuesta anti-polisacárido de ratón inmunizado con polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A.



### **3.10.Nuevos formatos de ELISA**

A pesar de las ventajas del ELISA con prerecubrimiento con estreptavidina para la determinación de anticuerpos anti-PS-B, el ensayo mostraba altas uniones inespecíficas cuando se empleaban sueros poco diluidos (diluciones menores de 1/100). Nuestros esfuerzos para eliminar esta inespecificidad a través tanto de la optimización de los diferentes pasos del ensayo como de cambios cualitativos y cuantitativos en la solución bloqueante fueron infructuosos. El principal factor que contribuía a la unión específica en nuestro sistema era el tiempo de incubación entre la fase sólida y el suero. Al trabajar con anticuerpos anti-PS-B que suelen ser de baja afinidad, se requieren tiempos de incubación con la fase sólida más largos, con objeto de aumentar la sensibilidad del ensayo, resultando en mayores valores de fondo inespecífico debido a la deposición inespecífica de anticuerpos. Con objeto de resolver estos inconvenientes se plantearon dos abordajes experimentales cuyos resultados se enumeran a continuación.

#### **3.10.1.ELISA en fase líquida**

En este tipo de ensayo se intentó resolver el problema anteriormente mencionado disminuyendo el tiempo de incubación del anticuerpo con la fase sólida sin que existiera la consiguiente reducción en el tiempo de interacción antígeno/anticuerpo. Para ello esta última interacción se sacó fuera de la placa de microtitulación. La titulación de MB-85 con varias concentraciones de complejo avidina/PS-B se muestra en la figura 35 a dos tiempos de revelado con p-NPP.

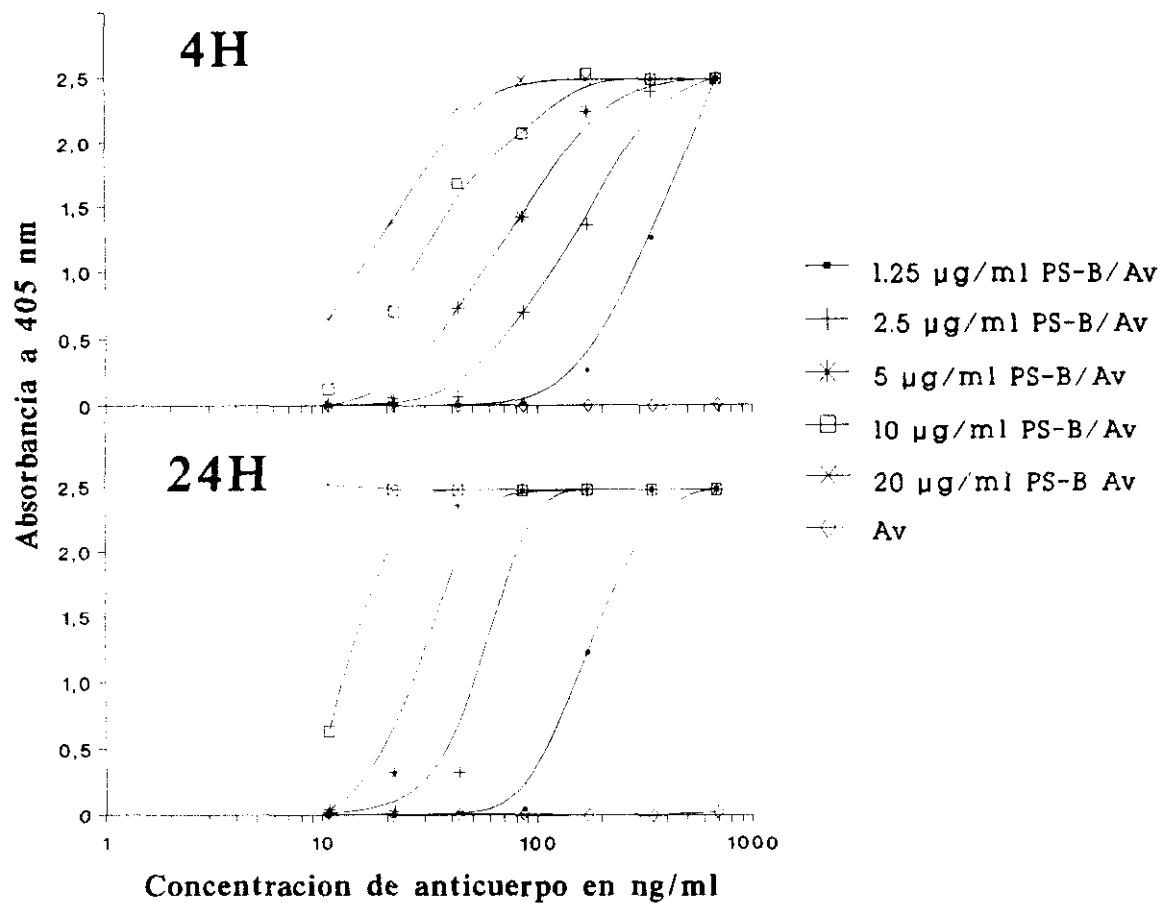
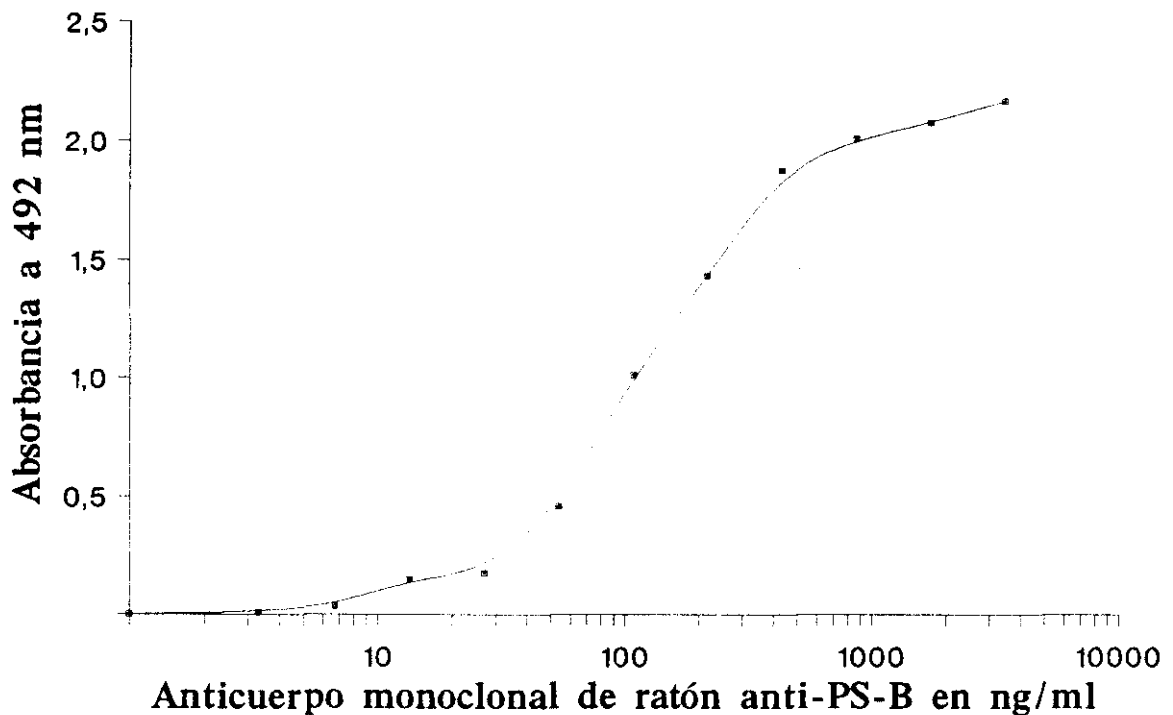


Figura 35. ELISA en fase líquida: comparación de diferentes tiempos de revelado.

### 3.10.2. ELISA revelado con complemento

Mediante este abordaje experimental se intentó eliminar la unión inespecífica cambiando el sistema de revelado: se introducía un paso adicional después de la incubación antígeno/anticuerpo de incubación con una fuente de complemento y se desarrollaba el ELISA detectando un determinado tipo de fragmento de complemento (C3) depositados teóricamente por la presencia de complejos antígeno/anticuerpo, discriminando así entre inmunoglobulinas depositadas en la

fase sólida específicamente (por interacción con el antígeno) e inespecíficamente (por meras interacciones físicas). Los resultados de la figura 36 muestran un ensayo de este tipo utilizando MB-85.



**Figura 36.** ELISA anti-PS-B revelado con complemento. Controles con BSA en lugar de polisacárido no mostraban ninguna señal de absorbancia.

Aunque los resultados mostrados son prometedores este tipo de ensayos también presentaba limitaciones: incubaciones más largas de 30 minutos o con diluciones menores de 1/100 con la fuente de complemento mostraban una deposición inespecífica de C3 en las placas (resultados no mostrados).

Utilizando el mismo diseño experimental se realizó un ensayo en el que se sustituyó el anticuerpo monoclonal MB-85 por limulina, con objeto de averiguar si

esta era capaz de inducir activación de complemento. Los resultados (no mostrados) indicaron que al menos en este sistema la limulina no activaba el complemento.

### **3.11 Nuevos formatos de ensayos hemolíticos**

La capacidad de sensibilizar eritrocitos con PS-B por incubación directa de ambos, convierte a este tipo de ensayos en simples, rápidos y flexibles para el estudio de la respuesta inmune al PS-B. El inconveniente que presentan los sistemas tradicionales era la gran cantidad de reactivos que consumía el ensayo que se solía realizar en tubos de ensayos. A continuación se presentan 3 tipos de ensayos que persiguen un objetivo común: la miniaturización de los ensayos de hemólisis y el consiguiente ahorro en reactivos.

#### **3.11.1. Espectrofotometría a 405 nm**

Este método es una adaptación de uno preexistente para medir activación de la vía alternativa de complemento y no precisa incubación posterior a la lisis de los eritrocitos. El ensayo mide valores de absorbancia a 405 nm del lisado de eritrocitos y mediante este ensayo se llevó a cabo un estudio de la influencia de la densidad antigénica de los eritrocitos y la fuente de complemento en la activación de complemento (hasta la última etapa de inserción del complejo de ataque) mediada por anticuerpos anti-PS-B utilizando el anticuerpo MB-85. En la figura 37 se puede apreciar una estricta dependencia tanto de la concentración de anticuerpo

como de la densidad antigénica en la activación de la vía clásica del complemento.

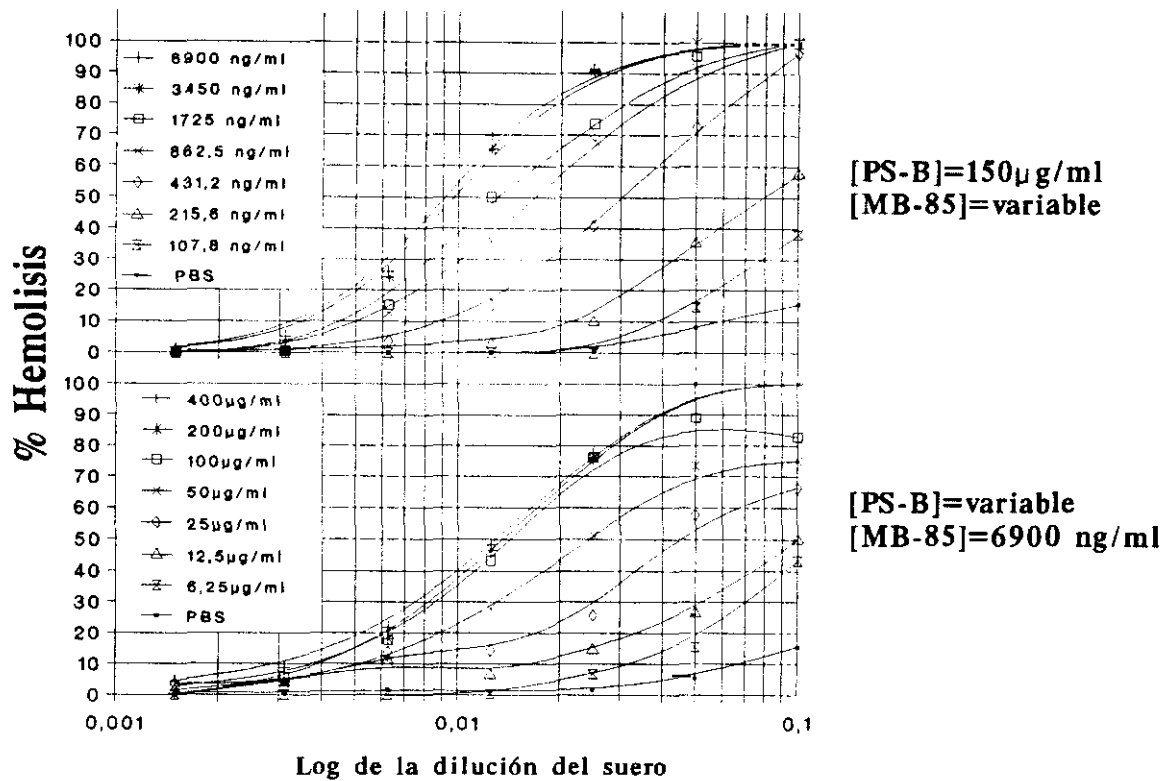


Figura 37. Dependencia de la densidad antigénica de PS-B para la activación de la vía clásica del complemento.

El anterior ensayo fue llevado a cabo con suero humano normal como fuente de complemento. Cuando el ensayo fue llevado a cabo con una fuente homóloga a la del anticuerpo empleado, es decir ratón, no se pudo apreciar ninguna señal de activación de complemento por encima de los niveles del control (resultados no mostrados), a pesar de emplear dos lotes diferentes de suero normal de ratón, obtenidos a partir de diferentes grupos de ratones. Esta fuente de complemento fallaba en lisar también el sistema SRBC/anti-SRBC.

### 3.11.2. Actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina

El ensayo utiliza la actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina para amplificar la señal producida en la lisis de los eritrocitos mediante la adición de un substrato adecuado. Primeramente se evaluaron dos substratos diferentes utilizados corrientemente como substrato de la peroxidasa: DAB y OPD. La figura 38 muestra claramente la mayor señal producida por el OPD por lo que fue éste el substrato empleado en el ensayo de hemólisis.

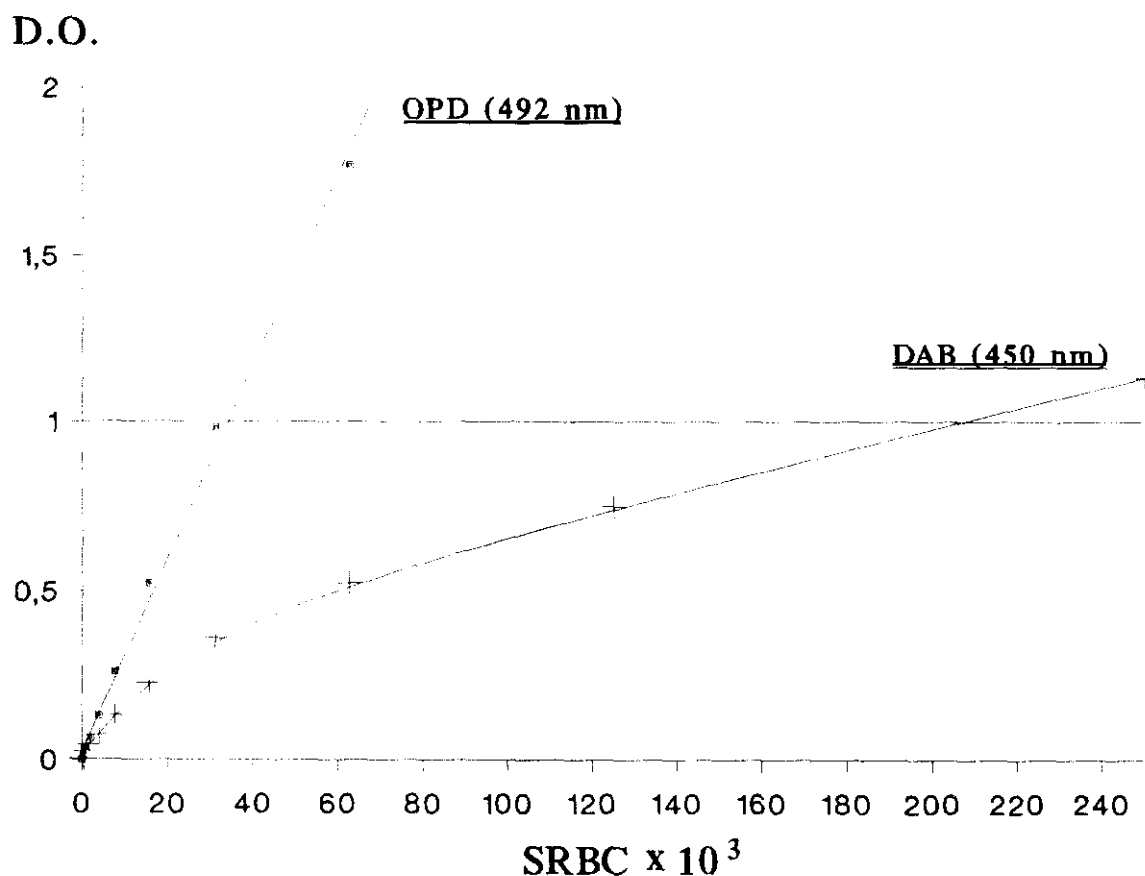
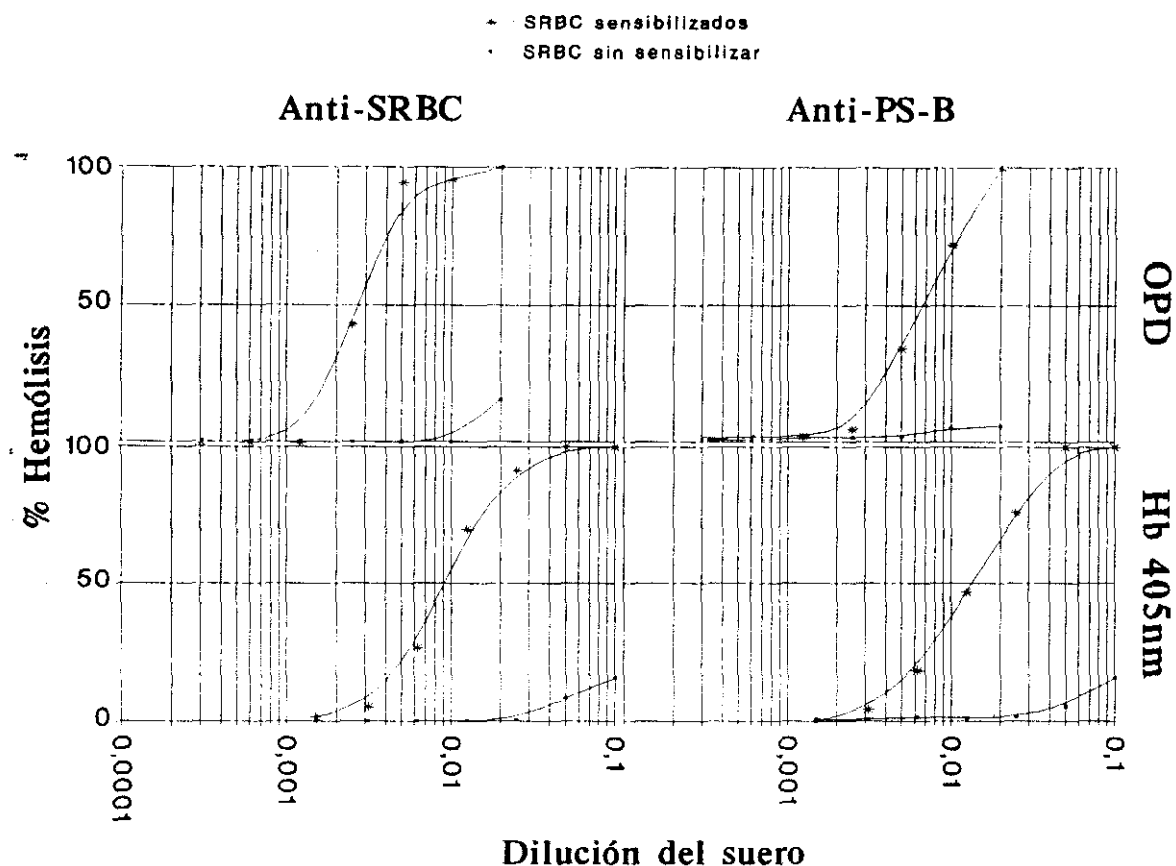


Figura 38. Comparación de DAB y OPD como substratos para medir la actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina.

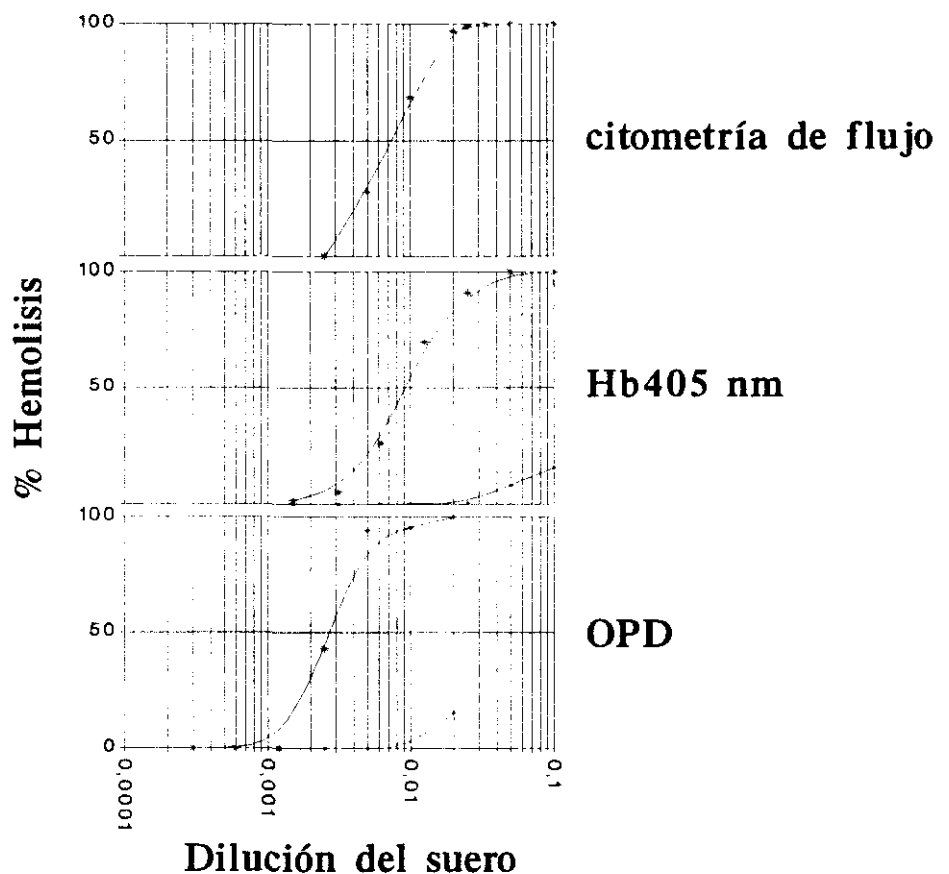


**Figura 39.** Hemólisis medida por absorbancia a 405 nm o mediante la actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina. Los eritrocitos fueron sensibilizados con anti-SRBC o anti-PS-B.

Los ensayos de hemólisis realizados mediante la medida de la actividad pseudoperoxidasa resultaron mucho más sensibles que su contrapartida mediante absorbancia a 405 nm (Fig.39), tanto para medir eritrocitos sensibilizados con anti-SRBC como con anti-PS-B, con la ventaja añadida de utilizar volúmenes mucho menores de reactivos.

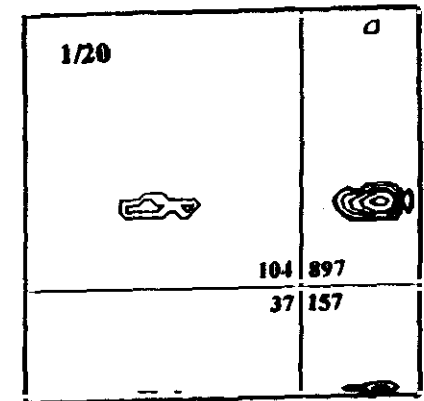
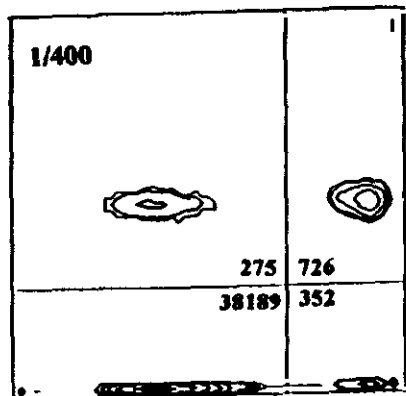
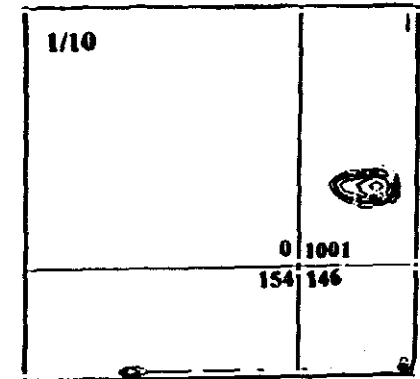
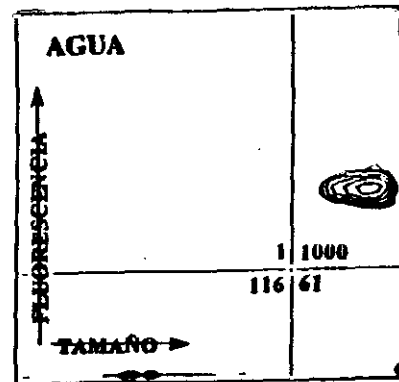
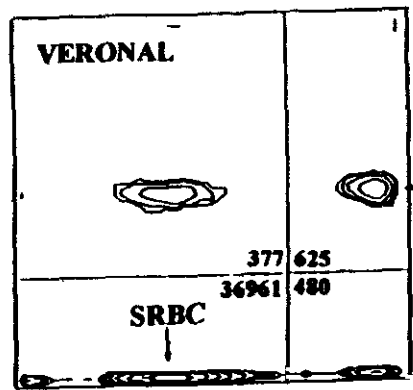
### 3.11.3. Citofluorimetría de flujo

Los anteriores ensayos de hemólisis tenían en común que ambos medían hemólisis a partir del lisado. En el ensayo desarrollado mediante la técnica de citometría de flujo la hemólisis es medida en función de la desaparición de los eritrocitos sensibilizados. Los resultados de la hemólisis medida por este método en el sistema SRBC/anti-SRBC y su comparación con los obtenidos por los métodos espectrofotométricos anteriormente descritos, y los histogramas a partir de los cuales se generaron estos, se muestran en la figura 40 y 41, respectivamente.



**Figura 40.** Hemólisis medida por citometría de flujo: comparación con absorbancia a 405 nm y actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina.





**DILUCIÓN DEL SUERO**

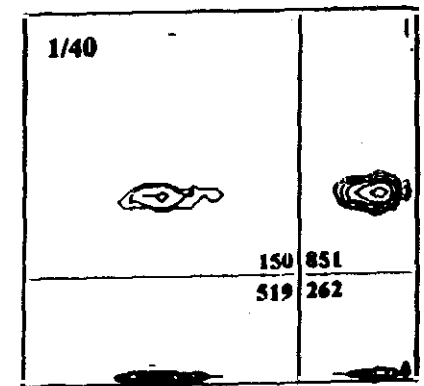
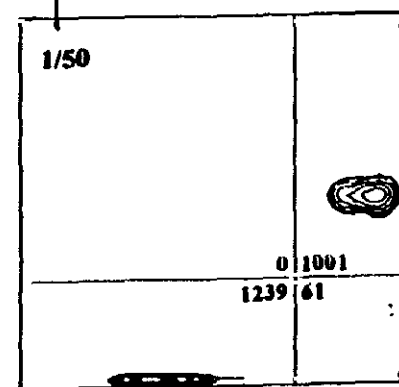
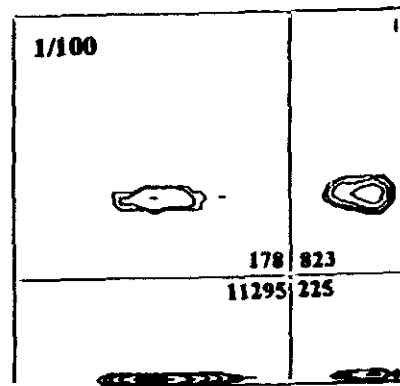
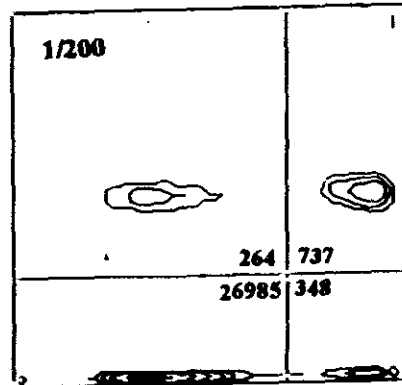


Figura 41. Histogramas biparamétricos mostrando los cuatro cuadrantes en que se dividen y el número de partículas por cuadrante.

## 4.DISCUSIÓN



#### 4.1.ELISA: algunas consideraciones teóricas

La fuerza de unión de un anticuerpo a antígenos multivalentes, afinidad funcional o avidéz, es principalmente función de dos componentes: afinidad intrínseca y valencia efectiva (97). La primera representa la fuerza de la interacción para una sola pareja epítopo-parátopo, mientras que la flexibilidad segmental del anticuerpo y la distribución de epítopos del antígeno, determinan la valencia efectiva: el número de parátopos que pueden interaccionar simultáneamente con los epítopos. La fuerte dependencia del ELISA de la densidad de epítopos se ha demostrado en cierto número de estudios, y especialmente en aquellos que emplean anticuerpos de baja afinidad (153,207). Por tanto, uno de los requerimientos más importantes de las placas de microtitulación empleadas en ELISA es que deberían ser capaces de unir suficiente antígeno, y que este permaneciera unido a la placa durante todo el ensayo. La máxima cantidad de unión de material soluble a la superficie sólida depende de las características de esta. El cloruro de polivinilo y las placas de poliestireno son los materiales empleados más frecuentemente en ELISA, debido a su inherente capacidad de ser "pegajosas" para muchas proteínas. La medida de anticuerpos de baja afinidad requeriría modificaciones especiales en las condiciones del inmunoensayo para conseguir independencia de la afinidad, tales como una alta densidad de epítopo y de concentración de antígeno (102). Una de las posibles opciones para aumentar la densidad antigénica en placas de microtitulación sería la de establecer un "puente" entre la placa y el antígeno que mejore la capacidad de unión a este último de la fase sólida.

## 4.2. Utilización de lectinas con especificidad para siálico

Los primeros candidatos a actuar como "puente" entre fase sólida y PS-B fueron dos lectinas con capacidad de unión a NeuNAc: WGA y limulina. WGA fue escogida a partir de la revisión de unos estudios en los que se había utilizado esta lectina con este mismo objeto, así como para la preparación de columnas de afinidad, en un sistema que utilizaba polisacáridos de estreptococo grupo B que contenían NeuNAc en su estructura (95,111). A pesar de que la unión a WGA se encuentra bien documentada (95,111,227), en nuestro sistema falló completamente en unir PS-B, comprobando con posterioridad por diversos trabajos que la especificidad principal de esta lectina es N-acetil-glucosamina y sólo une NeuNAc con una muy baja afinidad (75,176).

La lectina de *Limulus polyphemus*, conocida como limulina o proteína reactiva-C de *Limulus polyphemus*, es una glicoproteína de 400 Kda que reconoce como ligandos principales, en una unión dependiente de calcio, NeuNAc y fosforilcolina (176,214). La limulina ha demostrado mayor afinidad para homopolímeros de NeuNAc que para heteropolímeros o NeuNAc, y en el presente trabajo demostró unirse de forma independiente de la presencia de calcio al PS-B. Cuando se probó su capacidad como puente entre PS-B y las placas de microtitulación mostró resultados bastante aceptables, pero también una fuerte dependencia del tampón utilizado en el ensayo. Así, en ensayos que emplearon suero de ternera fetal, la unión del PS-B a la fase sólida mediada por limulina resultaba abolida. Esto es explicable por la presencia en el suero de ternera fetal

de fetuína, una glicoproteína por la que muestra una afinidad alta la limulina. Puesto que en otros sueros es previsible la presencia de gran número de glicoproteínas, algunas de las cuales podrían estar sializadas, el uso de limulina en este tipo de ELISA quedaba bastante limitado. No obstante podría ser de gran utilidad en el desarrollo de columnas de afinidad, similares a las preparadas con WGA para purificar polisacáridos de estreptococo grupo B (95), para la obtención y purificación de PS-B, que en la actualidad resulta un proceso lento, complejo y laborioso como pudimos ver en la sección correspondiente de materiales y métodos.

#### **4.3. La biotinilación selectiva**

En el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas, ha existido un gran auge en la aplicación de la interacción de alta afinidad avidina/estreptavidina-biotina desde los primeros trabajos de Guesdon y col. (104). Algunos de estos trabajos se han enfocado en la preparación de polisacáridos bacterianos biotinilados y su aplicación a ensayos de ELISA para cuantificar anticuerpos específicos (252,278). Estos métodos implicaban el acoplamiento a biotina mediante un derivado de hidrazida adipídico o a través de un grupo carboxilo o hidroxilo. Además de ser complejos y tediosos, estos procedimientos daban como resultado la introducción de múltiples grupos de biotina en los polisacáridos con el riesgo concomitante de alteración conformacional. En el caso especial del polisacárido de EcK1, indistinguible inmunológicamente de PS-B, la biotina es acoplada por modificación del grupo carboxilo. Sin embargo se ha demostrado que modificaciones del grupo carboxilo



en PS-B abolían la inmunogenicidad (154). El método presentado aquí intenta resolver estos problemas mediante dos abordajes experimentales: la utilización de minicolumnas de centrifugación en los pasos intermedios de purificación y la selectividad del método de biotinylación empleado, mediante una oxidación suave con periodato del residuo terminal del polisacárido.

La tecnología de minicolumnas centrifugadas ("spin-column"), ampliamente utilizada en técnicas de PCR y clonaje molecular (66) y recientemente reevaluada para la concentración de soluciones de proteínas diluidas (231), permite reducir el tiempo de marcaje de días a horas. También permite la utilización de muestras iniciales muy pequeñas y mejora el marcaje gracias a la casi instantánea eliminación del exceso de reactivos en los pasos intermedios, evitando así la producción final de posibles inhibidores de la interacción polisacárido biotinylado-avidina (278).

Una contribución adicional a la especificidad del método es la de introducir una única molécula de biotina en el polisacárido, siendo minimizada la posible distorsión de la estructura tridimensional de este. Esto es particularmente importante en el caso del polisacárido, para el cual se ha postulado la existencia de determinantes conformacionales. Por otra parte, la biotinylación selectiva permite la determinación de la longitud del PS-B de forma rápida y simple mediante la medida simultánea de PS-B como cantidad de ácido siálico, que es una determinación rutinaria para calcular los rendimientos de PS-B biotinylado, y biotina (96). Pueden prepararse de esta manera, complejos no covalentes de avidina/estreptavidina-PS-B de composición conocida mediante un puente de

biotina. Esto podría potenciar el estudio de complejos proteína-polisacárido en el desarrollo de nuevas vacunas, y facilitaría la incorporación de adyuvantes e inmunomoduladores previamente biotinilados, dado que un complejo equimolecular de avidina-biotina-PS-B dispone aún de tres sitios libres para unir biotina.

#### **4.4. Incubaciones extendidas con AP**

Con objeto de posibilitar la detección de bajas concentraciones de muestra, la optimización de las condiciones del ensayo es un factor importante a la hora de conseguir este objetivo. La elección adecuada de una alternativa enzima/substrato cromógeno adecuada puede mejorar substancialmente la sensibilidad del ensayo. Entre las diferentes combinaciones empleadas como marcadores en inmunoensayos enzimáticos heterogéneos dos son los más comunes: La peroxidasa de rábano/o-fenilendiamina (HRP/OPD) y la fosfatasa alcalina/p-nitrofenil fosfato (AP/pNPP). La peroxidasa cataliza la reducción de  $H_2O_2$  con la consiguiente oxidación de un cromógeno que produce un cambio de color medible ópticamente. OPD parece ser el cromógeno que da las lecturas más altas de absorbancia pero también produce uno de los fondos más altos debido a la baja estabilidad que da como resultado la descomposición espontánea al cabo de pocas horas (6). Además la incubación prolongada enzima/substrato no mejora los límites de detección puesto que el enzima es inactivado a tiempos largos por su propio substrato:  $H_2O_2$ . AP cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfato para dar fosfato inorgánico y un grupo fenólico saliente (255). La formación de este grupo fenólico puede seguirse espectrofotométricamente con p-NPP. Tanto p-NPP como su producto de reacción,



p-nitrofenol, son muy estables a temperatura ambiente (213).

Una revisión de la literatura reciente sobre sistemas de detección enzimática (45), muestra que se pueden obtener resultados comparables en los niveles de detección de antígeno mediante AP cuando esta es empleada en un sistema de detección amplificado a tiempos cortos (40 min.), o cuando se emplea pNPP, el substrato convencional del enzima, en períodos de incubación extendida de hasta 24 h. Se obtuvieron datos esclarecedores cuando se probaron tiempos de incubación extendidos con conjugado de AP, empleados para revelar sistemas de ELISA, utilizando pNPP como substrato: la sensibilidad aumentaba a medida que lo hacían los tiempos de incubación, incluso hasta 15 días. Cuando esto se aplicó a ELISAs antígeno-específicos, solo el nivel de unión inespecífica fue un factor limitante en la sensibilidad del ensayo (114). Este es prácticamente insignificante en el caso del conjugado de AP (Fig.20), pero es apreciable cuando existe una incubación previa con anticuerpo y especialmente cuando se emplean sueros (Fig.24).

#### **4.5.El ELISA con recubrimiento con estreptavidina**

La sensibilidad obtenida con este ensayo es excelente, particularmente al considerar que los anticuerpos anti-PS-B son de baja avidéz (167). Esta resulta ser unas 100 veces mayor que el ensayo de hemaglutinación o el ELISA con recubrimiento con poli-L-lisina, y la comparación con un ELISA recientemente optimizado para el polisacárido neumocócico tipo III (SSS-III) mostró que el límite

de detección del presente ensayo, 5 ng/ml, se encuentra por debajo del de SSS-III, para anticuerpos monoclonales de ratón del mismo isotipo (IgM) que los detectados aquí (68).

La especificidad del ensayo fue probada en experimentos de inhibición con el polisacárido nativo en un EIA competitivo, que invierte las diferentes capas del ensayo: Anticuerpo monoclonal-PS-B biotinilado-estreptavidina (marcada con enzima) en lugar de estreptavidina-PS-B biotinilado-anticuerpo monoclonal que es la disposición del ELISA. No solo se demostró la especificidad de la interacción entre el anticuerpo monoclonal MB-85 y el PS-B biotinilado, sino que también se pudo observar una débil reactividad cruzada con un polisacárido capsular estructuralmente no relacionado, el de NmgA, y un patrón de inhibición cuantificable para NeuNAc, el monómero de PS-B, similar a la descrita en estudios anteriores por electroforesis de afinidad (212). Estos datos confirmaban ensayos de inhibición anteriores llevados a cabo mediante un HIA muy sensible capaz de detectar menos de 1 ng/ml de PS-B, y le capacitan como una potente herramienta para el estudio de determinantes en PS-B (118,154).

Una comparación de las respuestas anti-PS-B en ratones inmunizados con un complejo no covalente de OMPs y PS-B tal y como se determinaron por el presente ELISA con los datos obtenidos por un radioinmunoensayo en fase sólida (SPRIA) que utilizaba el mismo inmunógeno y calibrado con el mismo anticuerpo monoclonal que el empleado aquí (MB-85) (159), reveló resultados muy similares entre ambos. Los valores del ELISA para la respuesta secundaria a día 7 eran de

86  $\mu\text{g/ml}$  comparados a los 64,3  $\mu\text{g/ml}$  del SPRIA, y los valores para la respuesta terciaria fueron de 208  $\mu\text{g/ml}$  a día 10 por ELISA comparados con los 274  $\mu\text{g/ml}$  a día 7 y 121  $\mu\text{g/ml}$  a día 14 del SPRIA. Así, el ELISA proporciona una alternativa al SPRIA, un ensayo que es técnicamente complejo y prohibitivamente caro debido a la inestabilidad de los reactivos. El ensayo podía también aplicarse al estudio de isotipos (Fig.25).

#### **4.6.Efecto del bloqueante en el ELISA anti-PS-B**

Con objeto de minimizar la unión inespecífica, dos de los bloqueantes de uso más generalizado fueron comparados en un estudio utilizando tanto sueros como un anticuerpo monoclonal (Fig.26). Los resultados muestran un comportamiento anómalo de la leche descremada, y especialmente en el caso del anticuerpo monoclonal. Se ha publicado que la leche contiene un inhibidor de la interacción biotina-estreptavidina (110), pero en este caso la leche fue empleada en un paso posterior a esta interacción, y cuando fue empleada en un ELISA con polisacáridos A y C biotinilados (Fig.29) demostró ser un excelente bloqueante que disminuía la unión inespecífica. A partir de estos datos y otros publicados (215,284), deben recalcarse las precauciones a la hora de emplear leche descremada en sistemas de ELISA y especialmente en el caso del ELISA PS-B específico, puesto que esta interfiere en una forma aún no determinada. Como alternativa a la leche descremada, se podría emplear la caseína que ha demostrado ser una de las proteínas purificadas más efectivas en reducir la unión inespecífica en ELISA (131,142,284).

#### 4.7. Características del reconocimiento de polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 por anticuerpos específicos: dependencia de la temperatura

La extrema dificultad tanto en la producción de antisueros como de anticuerpos monoclonales específicos para polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 (82,189), ha obstaculizado el estudio de las interacciones existentes entre polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 y anticuerpos dirigidos contra epítomos presentes en esta estructura, aunque actualmente existen numerosos anticuerpos monoclonales de esta especificidad, tanto de isotipo IgM (183,189,218,304) como IgG (82,246). El concepto tradicional sobre reconocimiento por anticuerpos de antígenos polisacáridos de que tan solo seis o siete residuos forman el epítomo de unión (15,123,199), no se ajusta a los datos conocidos de la interacción entre el polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 con anticuerpos específicos (108,121,156).

La conformación de un homopolímero lineal de un único azúcar unido por un único tipo de enlace glicosídico viene determinada por el tipo de éste, que controla la posición de cada anillo del azúcar respecto a los residuos adyacentes a los que se encuentra unido (214). La naturaleza repetitiva del patrón de unión resulta en una estructura periódica regular del polímero. Se han llevado a cabo diferentes estudios que han tratado de dilucidar la estructura tridimensional del polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 por resonancia magnética nuclear. Existen estudios que sugieren que el polímero adopta una estructura helicoidal en solución (297). Otros estudios en cambio postulan que el polisacárido existe predominantemente en solución en

forma de enrollamiento al azar, con la presencia ocasional de hélices locales de tipo extendido (39), siendo estas el epítipo reconocido por anticuerpos anti-polyNeuNAc $\alpha$ 2-8.

Oligosacáridos más pequeños de la misma estructura repetitiva son capaces de inhibir completamente la unión del anticuerpo al polisacárido nativo a altas concentraciones (121,211,246), e incluso es posible inhibir esta unión con NeuNAc (59,211), indicando que los mismos anticuerpos unen antígenos más pequeños que el polisacárido nativo pero con menor afinidad.

La presencia de epitopos conformacionales explicaría como se puede producir una respuesta de anticuerpos específicos por un polisacárido que tenga unidades estructurales repetitivas idénticas a la del oligosacárido del hospedador sin producir reacciones cruzadas entre los anticuerpos antipolisacárido y los antígenos del hospedador (295), como es el caso de sialogangliósidos y sialoglicoproteínas con cadenas cortas de NeuNAc unido por enlaces  $\alpha$ (2-8) presentes de forma ubicua en superficies celulares (156), pero no descartaría la posibilidad de reactividad cruzada *in vivo* con largas cadenas de polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 presentes en NCAM.

Además de los requisitos conformacionales, existe otro tipo de restricción en la interacción entre polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 y sus anticuerpos específicos: la temperatura. Anticuerpos anti polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 muestran una reducción en la avidéz muy acusada cuando se incrementa la temperatura de 4° a 37° (167). Esta

diferencia de avidéz aún es considerable cuando se comparan temperaturas de 22° y 37° (233). Esta disminución de avidéz a 37° se traduce en una dependencia de la concentración antigénica para la unión del anticuerpo (60). Sólo superficies con una alta densidad de polyNeuNAc $\alpha$ 2-8, como las cápsulas de NmgB o EcK1, serían reconocidas por el anticuerpo específico a 37°, mientras que células del hospedador con esta estructura no cumplirían estos requisitos *in vivo*, aunque polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 de NCAM podría ser reconocido en ensayos *in vitro* realizados generalmente a 4° o temperatura ambiente.

Un comportamiento similar en la dependencia de la densidad antigénica y de la temperatura se ha observado en ciertas macroglobulinas de Waldeström IgM con actividad de aglutininas y crioglobulinas (265,291). Ambas propiedades parecen tener como base común la unión inmune a residuos de ácido siálico: a carbohidratos que contienen NeuNAc en las membranas de los eritrocitos o en propias las macroglobulinas, respectivamente. Estos estudios aportan un nuevo punto de vista respecto a la naturaleza de la respuesta inmune al PS-B.

#### **4.8. Estudio de la respuesta inmune a PS-B en diferentes especies animales**

Los estudios realizados en diferentes especies animales utilizando el ELISA de precubrimiento con estreptavidina han puesto de manifiesto el fallo de las bacterias enteras en la obtención de una respuesta a PS-B. Podría deducirse que este es un fallo extendido en diversas especies animales, y explicaría las reacciones dudosas y falsos positivos en procedimientos diagnósticos que emplean reactivos

policlonales PS-B específicos (258) y la gran dificultad en la obtención de anticuerpos monoclonales específicos (189). El alto título de un suero policlonal de caballo parece ser la excepción. Experimentos previos han sugerido que la respuesta inmune del caballo a antígenos polisacáridos difiere de la de ratón (168), y un comportamiento substancialmente diferente al de otros anticuerpos anti-PS-B se ha publicado para H46 (154).

Los complejos no covalentes han demostrado ser los inmunógenos óptimos para obtener una respuesta anti-PS-B. Las OMPs derivadas de NmgB han demostrado actividad mitogénica para linfocitos y esta actividad ha sido aprovechada en vacunas conjugadas para inducir fuertes respuestas IgG contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenza* tipo b (160), pero suponer que la respuesta anti-PS-B al complejo es debida exclusivamente al efecto del soporte protéico es cuestionable. Meningococos enteros han mostrado ser inmunogénicos para linfocitos humanos de sangre periférica (178), pero en nuestros experimentos fallaban en inducir una respuesta anti-PS-B, y la respuesta inducida por los complejos estaba restringida a IgM. El aumento de inmunogenicidad del PS-B en ratones se relacionaba con un aumento en el grado de unión del polímero a OMPs en complejos no covalente (159). En nuestros estudios, hemos utilizado complejos preparados por el método de Moreno y col.(184) que mostraban una proporción alta de PS-B/OMPs. Complejos no covalentes con una baja proporción de estos componentes o complejos covalentes que utilizan una molécula de toxóide tetánico como soporte protéico, inducen respuestas anti-PS-B de baja magnitud (119,159).

¿Que podría explicar las diferencias asociadas al inmunógeno en la respuesta anti-PS-B?. Tanto los mecanismos de activación de células B por antígenos T-independientes, como la naturaleza del epítipo asociado con este antígeno nos podrían proporcionar la respuesta. El "cross-linking" de receptores antigénicos, IgM e IgD, en los linfocitos B maduros por ligandos multivalentes, juega un papel crítico en la fase inductiva de la respuesta humoral (112,182). En relación con esto se ha postulado, modelo del "inmunon"(63,64), que un número mínimo de receptores antigénicos deben estar conectados juntos como un grupo espacialmente compacto ("inmunon") antes de que la señal inmunogénica pueda ser liberada al receptor celular. También predice el requerimiento de un número mínimo de haptenos unidos espacialmente para la inmunogenicidad. Moléculas que se encuentren por debajo del valor umbral tanto de valencia de haptenos (epitopos) como de masa molecular, sería incapaces de formar un agregado de receptores antigénicos suficiente para la formación del inmunon. Los polisacáridos capsulares son antígenos T-independientes compuestos de poco epitopos pero muy repetidos, que les capacitan a realizar el "crosslinking" de los recptores específicos en las células B y disparar la respuesta inmune humoral sin ayuda de las células T, aunque se ha postulado un papel modulador para estas últimas (23), y de nuevo es un mecanismo de "crosslinking" (mediado por IgD (49)), el que podría explicar, al menos parcialmente, este último proceso.

En el caso de la molécula de PS-B, la presencia propuesta de un epítipo conformacional resultaría probablemente en una baja proporción de epítipos/molécula. Así, el epítipo presentado en el polisacárido purificado nativo



o en un complejo equimolecular con un soporte protéico (119), es incapaz de disparar la respuesta inmune por que la estructura antigénica se encontraría por debajo de los valores umbral de la valencia de epítomos. Por analogía, cuando el epítomo se presenta en una superficie, como una bacteria o una vesícula de membrana externa, el espaciamiento entre los epítomos puede ser crítico para inducir una respuesta específica. Sólo un agrupamiento compacto de epítomos, directamente dependiente de la densidad antigénica en este caso, podría funcionar como estímulo. Tan sólo los complejos con una proporción PS-B/OMP alta parecen reunir estos requisitos, y los complejos con una baja proporción de PS-B/OMP así como las bacterias enteras, fallan en este aspecto. En contraste, las bacterias enteras son buenos inmunógenos para la inducción de una respuesta específica a los polisacáridos capsulares de NmgA y NmgC (y al menos el polisacárido capsular del primero parece ser también un inmunógeno aceptable). Ambos presentan epítomos convencionales: lineales y repetitivos, en los cuales el agrupamiento de epítomos esta presente en la misma molécula del polisacárido. Factores adicionales, tales como la estabilidad y concentración del antígeno, o el número, afinidad y movilidad de los receptores específicos, deben también jugar un papel importante en la interacción célula B-antígeno, y cualquier de ellos podría ser la base para explicar la diferente respuesta anti-PS-B equina.

#### **4.9.El ELISA en fase líquida**

Las ventajas de este formato de ELISA respecto a los convencionalmente utilizados son evidentes. En primer lugar, el riesgo de alteración en la presentación

y/o conformación del antígeno se minimiza, evitando los posibles impedimentos estéricos durante la asociación antígeno anticuerpo y los inconvenientes de una difusión unidireccional restringida al ligando soluble, puesto que la interacción antígeno-anticuerpo es llevada a cabo antes de la absorción a la fase sólida. Por otra parte, el pocillo de una placa de microtitulación es un área con una superficie limitada para la unión de antígeno, dando como resultado una progresiva saturación, incluso cuando se establecen puentes entre la fase sólida y el antígeno, como es el caso del ELISA con prerecubrimiento con estreptavidina. Por encima de un nivel óptimo, la unión de antígeno no es aumentada por la cantidad de antígeno utilizada para el recubrimiento. En el ensayo en fase líquida se observa un aumento en la sensibilidad al utilizar concentraciones crecientes de antígeno (Fig.35).

Por otra parte, los resultados del ELISA en fase líquida corroboran una proposición anterior: el bajo número de epítopos funcionales existentes por molécula de polisacárido. Suponiendo un peso molecular de 900.000 para la IgM de ratón y de 60.000 para PS-B, a la máxima concentración empleada de PS-B (20  $\mu\text{g/ml}$ ) la relación molecular PS-B/IgM es de más de 400:1, y aún así se observa un incremento en la señal como consecuencia de una mayor cantidad de anticuerpo monoclonal unido por el polisacárido. Probando otras concentraciones crecientes de PS-B podríamos averiguar a que concentración se produce el equilibrio en la unión PS-B/anti-PS-B.

Por último el ELISA en fase líquida podría permitir examinar diversas cuestiones planteadas por las peculiaridades de la respuesta anti-PS-B. La casi

completa ausencia de una respuesta IgG a PS-B, incluso cuando este forma un complejo con proteínas ¿representa realmente una restricción isotópica, o simplemente refleja un defecto en el ensayo en la medida de anticuerpos de baja avidéz que carecen del efecto "multiplicador" de la polivalencia?. Datos obtenidos previamente por ELISA con parejas de anticuerpos monoclonales IgG-IgM específicos para la cápsula de Eck1 que compartían regiones V idénticas (217), no descartan esta última posibilidad. La posibilidad de emplear concentraciones crecientes de antígeno en el ELISA en fase líquida facilitaría la contestación a este tipo de cuestiones.

#### **4.10.ELISA revelado con complemento**

El ELISA revelado con complemento ofreció excelentes resultados cuando se empleó en el sistema MB-85/NHS, después de un proceso de optimización en el que se tuvieron que investigar los factores que podían interferir en este tipo de ensayo y que se pudieron delimitar a la deposición inespecífica de C3 en las placas de poliestireno a concentraciones altas del suero utilizado como fuente de complemento o incubaciones más prolongadas del mismo, un proceso que ha sido descrito en la literatura (194). Este tipo de ensayo ha sido aplicado con éxito en la determinación de anticuerpos IgM policlonales de conejo específicos para lípido A y LPS (143) y a la identificación viral (150), aunque en este caso se utilizó un componente purificado del complemento marcado con peroxidasa (C1q).

Este ensayo fue también llevado a cabo sustituyendo el anticuerpo

monoclonal por limulina con objeto de ver si esta era capaz de activar complemento. Esta cuestión se planteó al observar la gran homología existente entre la limulina y la proteína reactiva-C humana, una proteína del suero que es producida rápidamente en respuesta a estímulos inflamatorios. Ambas muestran aproximadamente un 25% de identidad global y comparten la capacidad de unión a fosforilcolina (191), y estudios preliminares han indicado que la proteína reactiva-C humana es un potente activador de la vía clásica del complemento en presencia del polisacárido C neumocócico (198), y puede proteger a ratones contra infecciones por *Streptococcus pneumonia* (38,181). Los resultados del ensayo fallaron en indicar cualquier indicio de activación de complemento por limulina.

#### **4.11. Ensayos hemolíticos**

Las características físicas del PS-B que permiten unirlo a la superficie de eritrocitos mediante una simple incubación a 37° sin ningún tipo de manipulación especial, ha hecho que los ensayos con eritrocitos sensibilizados con PS-B hayan sido utilizados en el estudio de la respuesta inmune a este antígeno desde hace mucho tiempo (48,307). Hoy en día y a pesar de las críticas sobre la dificultad de cuantificación precisa de este tipo de ensayos, constituyen en alguno de sus formatos ensayos económicos rápidos y sensibles: el HIA empleado en nuestros estudios era superior en el nivel de detección al EIA. Nosotros hemos empleado estos eritrocitos sensibilizados para el desarrollo de diferentes ensayos hemolíticos que nos permitan obtener un mejor conocimiento de la posible funcionalidad de los anticuerpos anti-PS-B en la activación del complemento y las diversas variables que

inciden en esta funcionalidad.

Se desarrollaron tres ensayos diferentes: dos de ellos basados en determinaciones espectrofotométricas del lisado procedente de la ruptura de los eritrocitos (absorbancia a 405 nm y actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina), y el tercero basado en la determinación del número de eritrocitos que desaparecidos durante el proceso de hemólisis (citofluorimetría de flujo). A pesar que tanto la determinación de la actividad pseudoperoxidasa como la citofluorimetría de flujo se mostraron muy superiores en sensibilidad y ahorro de reactivos, se eligió la absorbancia a 405 nm para el estudio de una serie de variables en el sistema de activación de complemento de PS-B/anti-PS-B, debido principalmente a la mayor rapidez (no necesita incubaciones ni manipulaciones adicionales) y al hecho de estar mejor optimizada por haber sido el primero de los tres métodos puestos a punto. Los resultados de estos estudios pusieron de manifiesto varias cosas: como en el ELISA anteriormente descrito, se observa una estricta dependencia de la densidad antigénica en estos ensayos, de tal forma que sólo aquellos eritrocitos densamente recubiertos con PS-B son hemolisados por el anticuerpo monoclonal MB-85 en conjunción con complemento humano. Por otra parte la fuente de complemento es crítica como veremos en el siguiente apartado.

#### **4.12.El papel de anticuerpos anticapsulares en la protección contra NmgB**

Basándose en la premisa anteriormente enunciada de la necesidad de que cualquier antígeno propuesto como candidato a vacuna meningocócica debe inducir anticuerpos bactericidas dependientes de complemento, se ha postulado que

anticuerpos humanos a la cápsula de NmgB no serían protectores en el hombre debido al fallo de estos en inducir actividad bactericida en conjunción con complemento homólogo (304,306). En contra de esta afirmación está el hecho de que anticuerpos monoclonales anticapsulares de ratón son claramente protectores contra la infección por NmgB en modelos de protección pasiva (154,218) a pesar de que, mediante el microensayo hemolítico de fijación de complemento, comprobamos que estos anticuerpos no lisan eritrocitos sensibilizados con polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 en presencia de complemento homólogo. La razón de este fallo puede encontrarse en la bien documentada ineficiencia citolítica del suero murino (234,267). Por otra parte, la absorción con polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 de diferentes antisueros preparados por hiperinmunización contra diferentes serotipos de NmgB, eliminaba completamente la actividad protectora de estos en un modelo de embrión de pollo (76). A la vista de estos datos ¿Cual o cuales serían los mecanismos implicados en el efecto protector de los anticuerpos anticapsulares?.

En primer lugar deberíamos considerar el papel de los anticuerpos anticapsulares en la fagocitosis de NmgB. La importancia relativa de la actividad bactericida del suero en relación con la destrucción mediada por neutrófilos de meningococos no se ha podido definir con precisión (155,224), pero se ha podido comprobar que el suero humano normal (no inmune) tiene capacidad de opsonizar NmgB que son fagocitados por leucocitos polimorfonucleares (224,290). Tanto complemento como anticuerpo son necesarios para este proceso, y aunque la especificidad de estos últimos no ha sido demostrada de forma concluyente, existen datos que apuntan directamente a la cápsula: la necesidad de activación

de la vía clásica para que se produzca opsonización y fagocitosis (290), y la deposición de C3 a nivel de la cápsula, sugieren que ésta última está mediada por activación de la vía clásica de anticuerpos anticapsulares. Además la eficiencia y cinética de opsonización es muy similar en diversas cepas, independientemente de su serotipo (290), y se ha descrito la presencia de títulos bajos de anticuerpos anticapsulares en la mayoría de la población adulta (151,156,304). El mecanismo anterior dependiente de la vía clásica y de células fagocíticas, funcionaría a bajos títulos de anticuerpo y probablemente sería capaz de prevenir o al menos ralentizar la proliferación bacteriana hasta un determinado nivel de carga bacteriana, previniendo la diseminación del inóculo infectante.

Por encima de un nivel crítico de anticuerpos anticapsulares se dispararía un segundo mecanismo: la deposición en localizaciones subcápsulares de C3 por la vía alternativa mediante el efecto anteriormente descrito de inactivación de la capacidad anticomplementaria de la cápsula mediada por anticuerpos anticapsulares (115), y la consiguiente activación del complejo de ataque de la membrana que conduciría a la lisis bacteriana. Este comportamiento bimodal a diferentes concentraciones de anticuerpos ha sido descrito para otras bacterias capsuladas con superficies con propiedades anticomplementarias (67).

Aún se podría sugerir un tercer mecanismo por el que los anticuerpos anticapsulares podrían ejercer un papel de protección para NmgB. Mediante el mismo mecanismo que posibilita la deposición de C3 por la vía alternativa en localizaciones subcápsulares, se podría potenciar el acceso de anticuerpos dirigidos

contra antígenos subcapsulares habitualmente enmascarados por la cápsula, y que gracias a este acceso facilitado podrían ejercer su acción bactericida mediante la vía clásica del complemento. Este mecanismo explicaría la sinergia observada en cuanto a su función protectora entre anticuerpos capsulares y no capsulares, tanto en EcK1 como NmgB (76,137).

#### **4.13. Estructura de la cápsula: cationes divalentes y a.nucléicos**

La cápsula *in vivo* es heterogénea debido a la capacidad de absorción de una variedad de iones y macromoléculas. La influencia de cationes divalentes en el reconocimiento por anticuerpos de polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 puede ponerse de manifiesto mediante ensayos de hemaglutinación usando polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 purificado como sensibilizante. Añadiendo Ca<sup>++</sup> (CICa 0,1 M) al tampón del ensayo, se puede bloquear la hemaglutinación de eritrocitos sensibilizados con polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 con un anticuerpo monoclonal específico de este. La influencia de los cationes divalentes en la expresión de epítomos ha sido puesta de manifiesto también en LOS (99).

Aunque la cápsula parece ser una entidad estructural uniforme, es muy probable que se produzca una mezcla con LPS (27). De hecho, se ha descrito la formación de complejos entre antígenos O y polisacárido capsular en EcK1 basados en interacciones no covalentes (196). Y se ha podido determinar que las sales de calcio y magnesio del LPS forman estructuras extendidas de forma acintada (129), que podrían constituir el armazón sobre el que se estructurarían las fibras densas



de la capa interna de la cápsula de EcK1 (129). Por otra parte, durante los procesos de purificación de material capsular se observa una estrecha asociación entre polisacáridos y ácidos nucleicos (27). Utilizando polisacárido capsular purificado a partir de cultivos de NmgB crecidos a diferentes tiempos, hemos podido establecer en nuestro laboratorio una correlación entre el contenido en a.nucleicos del polisacárido purificado y su capacidad como inhibidor en un sistema de hemaglutinación con un policlonal de caballo (Fig.16). Un hecho hace mucho tiempo conocido es que el RNA, una molécula acídica, puede unirse no covalentemente a otras moléculas acídicas mediante cationes divalentes formando complejos sumamente estables (91). Por otra parte, polifosfatos de alto peso molecular de unos 200 residuos de longitud son encontrados estrechamente unidos a la superficie de diferentes especies de Neisseria (259). El polifosfato, que tiene una alta afinidad por cationes divalentes y trivalentes, podría actuar también en este caso como armazón de la cápsula mediante interacciones con el polyNeuNAc $\alpha$ 2-8 mediadas de nuevo por cationes divalentes.

## **5.CONCLUSIONES**



Aunque diseñado para resolver los problemas de asociados al recubrimiento con PS-B, el procedimiento de biotinilación presentado es aplicable a otros polisacáridos susceptibles de oxidación selectiva con periodato, y la biotinilación de los polisacáridos capsulares de NmgA y NmgC fue también llevada a cabo con éxito en nuestro laboratorio. Esto permite la utilización de polisacáridos biotinilados de los principales serogrupos asociados con enfermedad meningocócica en el desarrollo de ensayos para la evaluación de la inmunogenicidad de nuevas vacunas.

Las bacterias enteras son inapropiadas como inmunógenos para obtener respuestas específicas a PS-B en las especies de animales más empleadas para obtener anticuerpos monoclonales y policlonales: ratón y conejo respectivamente. A este respecto serían preferibles protocolos que emplearan complejos no covalentes de membrana externa y PS-B.

Tanto el ELISA con precubrimiento con estreptavidina, como el EIA, el ELISA en fase líquida, el ELISA desarrollado con complemento o los diferentes ensayos hemolíticos descritos en este trabajo constituyen unas potentes herramientas que pueden afianzar los estudios encaminados a la obtención de una vacuna contra NmgB basada en su polisacárido capsular, pudiendo servir como base para la estandarización metodológica que posibilite la comparación de resultados entre los diferentes grupos empeñados en el desarrollo de este tipo de vacuna.

La interacción de PS-B con un anticuerpo monoclonal específico presenta interesantes peculiaridades: no sólo es dependiente de la temperatura, sino que en función de esta presenta o no dependencia de la densidad antigénica. Esto puede tener importantes repercusiones a la hora de plantearse la cuestión de la posible reactividad cruzada entre PS-B y antígenos del sistema nervioso central.

La activación de complemento por anticuerpos anti PS-B, también presenta una serie de rasgos característicos: no sólo es dependiente de la densidad antigénica, sino que con un anticuerpo monoclonal de ratón el suero homólogo falla en activar el complemento, a pesar de que este anticuerpo es capaz de inducir protección en este modelo animal. Esto abre nuevos interrogantes sobre el posible papel protector que pudieran inducirse en el hombre mediante la inducción de anticuerpos de esta especificidad.

## **6.BIBLIOGRAFÍA**



1. **Acheson, A., J. L. Sunshine, and U. Rutishauser.** 1991. NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *J Cell Biol.* **114**:143-153.
2. **Achtman, M.** 1991. Clonal properties of meningococci from epidemic meningitis. *Trans.R.Soc.Trop.Med Hyg.* **85 Suppl 1**:24-31.
3. **Adlam, C., J. M. Knights, A. Mugridge, J. M. Williams, and J. C. Lindon.** 1987. Production of colominic acid by Pasteurella haemolytica serotype A2 organisms. *FEMS Microbiol.Lett.* **42**:23-25.
4. **Ahmed, H. and H. J. Gabius.** 1989. Purification and properties of a Ca<sup>2+</sup> -independent sialic acid-binding lectin from human placenta with preferential affinity to O-acetylsialic acids. *J Biol.Chem.* **264**:18673-18678.
5. **Aho, E. L.** 1989. Molecular biology of class 5 outer membrane proteins of Neisseria meningitidis. *Microb.Pathog.* **7**:249-253.
6. **Al-Kaissi, E. and A. Mostratos.** 1983. Assesment of substrates for horseradich peroxidase in enzyme immunoassay. *J Immunol.Methods* **58**:127-132.
7. **Ala'Aldeen, D. A., N. B. Powell, R. A. Wall, and S. P. Borriello.** 1993. Localization of the meningococcal receptors for human transferrin. *Infect.Immun.* **61**:751-759.
8. **Alcantara, J., R. H. Yu, and A. B. Schryvers.** 1993. The region of human transferrin involved in binding to bacterial transferrin receptors is localized in the C-lobe. *Mol.Microbiol.* **8**:1135-1143.
9. **Allen, P. Z., M. Glode, R. Schneerson, and J. B. Robbins.** 1982. Identification of immunoglobulin heavy-chain isotypes of specific antibodies of horse 46 group B meningococcal antiserum. *J Clin.Microbiol.* **15**:324-329.
10. **Amako, K., Y. Meno, and A. Takade.** 1988. Fine structures of the capsules of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli K1. *J Bacteriol.* **170**:4960-4962.
11. **Ambrosino, D. M., D. Bolon, H. Collard, R. Van Etten, M. V. Kanchana, and R. W. Finberg.** 1992. Effect of Haemophilus influenzae polysaccharide outer membrane protein complex conjugate vaccine on macrophages. *J Immunol.* **149**:3978-3983.
12. **Ambrosino, D. M., S. K. Sood, M. C. Lee, D. Chen, H. R. Collard, D. L. Bolon, C. Johnson, and R. S. Daum.** 1992. IgG1, IgG2 and IgM responses to two Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines in young infants. *Pediatr.Infect.Dis.J* **11**:855-859.
13. **Andreoni, J., H. Käyhty, and P. Densen.** 1993. Vaccination and the role of



capsular polysaccharide antibody in prevention of recurrent meningococcal disease in the late complement component-deficient individuals. *J Infect. Dis.* **168**:227-231.

14. Anthony, B. F., N. F. Concepcion, S. A. McGeary, J. I. Ward, D. C. Heiner, P. Shapshak, and R. A. Insel. 1982. Immunospecificity and quantitation of an enzyme-linked immunosorbent assay for group B streptococcal antibody. *J Clin. Microbiol.* **2**:350.

15. Arakatsu, Y., G. Ashwell, and E. A. Kabat. 1966. Immunochemical studies on dextrans. V. Specificity and cross-reactivity with dextrans of the antibodies formed in rabbits to isomaltonic and isomaltotronic acids coupled to bovine serum albumin. *J Immunol.* **97**:858-866.

16. Arakere, G. and C. E. Frasch. 1991. Specificity of antibodies to O-acetyl-positive and O-acetyl-negative group C meningococcal polysaccharides in sera from vaccinees and carriers. *Infect. Immun.* **59**:4349-4356.

17. Arakere, G., M. Kessel, N. Nguyen, and C. E. Frasch. 1993. Characterization of a stress protein from group B Neisseria meningitidis. *J Bacteriol.* **175**:3664-3668.

18. Arko, R. J. 1989. Animal models from pathogenic *Neisseria* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**:S56-S59.

19. Artenstein, M. S., B. L. Brandt, E. C. Tramont, W. C. Branche, H. D. Fleet, and R. L. Cohen. 1971. Serologic studies of meningococcal infection and polysaccharides vaccination. *J Infect. Dis.* **124**:277-288.

20. Ashton, F. E., L. Mancino, A. J. Ryan, J. T. Poolman, H. Abdillahi, and W. D. Zollinger. 1991. Serotypes and subtypes of Neisseria meningitidis serogroup B strains associated with meningococcal disease in Canada, 1977-1989. *Can. J Microbiol.* **37**:613-617.

21. Ashton, F. E., A. Ryan, B. Diena, and H. J. Jennings. 1983. A new serogroup (L) of Neisseria meningitidis. *J Clin. Microbiol.* **17**:722-727.

22. Ashton, F. E., J. A. Ryan, F. Michon, and H. J. Jennings. 1989. Protective efficacy of mouse serum to the N-propionyl derivative of meningococcal group B polysaccharide. *Microb. Pathog.* **6**:455-458.

23. Baker, P. J. 1990. Regulation of magnitude of antibody response to bacterial polysaccharide antigens by thymus-derived lymphocytes. *Infect. Immun.* **58**:3465-3468.

24. Banerjee Bhatnagar, N. and C. E. Frasch. 1990. Expression of Neisseria meningitidis iron-regulated outer membrane proteins, including a 70-kilodalton transferrin receptor, and their potential for use as vaccines. *Infect. Immun.*

58:2875-2881.

25. **Barington, T., C. Heilmann, and V. Andersen.** 1990. Quantitation of antibody-secreting cells in the blood after vaccination with Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine. *Scand.J Immunol.* **31**:515-522.

26. **Barra, A., D. Schulz, P. Aucouturier, and J. L. Preud'homme.** 1988. Measurement of anti-Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide antibodies by ELISA. *J Immunol.Methods* **115**:111-117.

27. **Bayer, M. E.** 1990. Visualization of the bacterial polysaccharide capsule. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **150**:129-157.

28. **Bayer, M. E. and H. Thurow.** 1977. Polysaccharide capsule of Escherichia coli: microscope study of its size, structure, and sites of synthesis. *J Bacteriol.* **130**:911-936.

29. **Bhattacharjee, A. K., E. E. Moran, J. S. Ray, and W. D. Zollinger.** 1988. Purification and characterization of H.8 antigen from group B Neisseria meningitidis. *Infect.Immun.* **56**:773-778.

30. **Bhattacharjee, A. K., E. E. Moran, and W. D. Zollinger.** 1990. Antibodies to meningococcal H.8 (Lip) antigen fail to show bactericidal activity. *Can.J Microbiol.* **36**:117-122.

31. **Bjune, G., E. A. Hoiby, J. K. Gronnesby, O. Arnesen, J. H. Fredriksen, A. Halstensen, E. Holten, A. K. Lindbak, H. Nokleby, E. Rosenqvist, and et al.** 1991. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* **338**:1093-1096.

32. **Blackwell, C. C., K. Jonsdottir, D. M. Weir, M. F. Hanson, K. A. Cartwright, J. Stewart, D. Jones, and I. Mohammed.** 1989. Blood group, secretor status and susceptibility to bacterial meningitis. *FEMS Microbiol.Immunol.* **1**:351-356.

33. **Blake, M. S. and C. Eastby.** 1991. Studies on the gonococcal IgA1 protease II. Improved methods of enzyme purification and production of monoclonal antibodies to the enzyme. *J Immunol.Methods* **144**:215-221.

34. **Bortolussi, R. and P. Ferrieri.** 1980. Protection against Escherichi coli K1 infection in newborn rats by antibody to K1 capsular polysaccharide. *Infect.Immun.* **28**:111-117.

35. **Boulnois, G. J. and K. Jann.** 1989. Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. *Mol.Microbiol.* **3**:1819-1823.

36. **Bovre, K., K. Bryn, O. Closs, N. Hagen, and L. O. Froholm.** 1983. Surface polysaccharide of Moraxella non-liquefaciens identical to Neisseria meningitidis group B capsular polysaccharide. A chemical and immunological investigation. *NIPH.Ann.* **6**:65-73.

37. Brandtzaeg, P. 1992. Humoral immune response patterns of human mucosae: induction and relation to bacterial respiratory tract infections. *J Infect.Dis.* **165** Suppl 1:S167-S176.
38. Briles, D. E., C. Forman, J. C. Horowitz, J. E. Volanakis, W. H. J. Benjamin, L. S. McDaniel, J. Eldridge, and J. Brooks. 1989. Antipneumococcal effects of C-reactive protein and monoclonal antibodies to pneumococcal cell wall and capsular antigens. *Infect.Immun.* **57**:1457-1464.
39. Brisson, J. R., H. Baumann, A. Imberty, S. Perez, and H. J. Jennings. 1992. Helical epitope of the group B meningococcal alpha(2-8)-linked sialic acid polysaccharide. *Biochemistry* **31**:4996-5004.
40. Brooks, G. F., C. J. Lammel, M. S. Blake, B. Kusecek, and M. Achtman. 1992. Antibodies against IgA1 protease are stimulated both by clinical disease and asymptomatic carriage of serogroup A Neisseria meningitidis. *J Infect.Dis.* **166**:1316-1321.
41. Carlone, G. M., C. E. Frasch, G. R. Siber, S. Quataert, L. L. Gheesling, S. H. Turner, B. D. Plikaytis, L. O. Hesel, W. E. DeWitt, W. F. Bibb, and et al. 1992. Multicenter comparison of levels of antibody to the Neisseria meningitidis group A capsular polysaccharide measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin.Microbiol.* **30**:154-159.
42. Cartwright, K. A., J. M. Stuart, D. M. Jones, and N. D. Noah. 1987. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and Neisseria lactamica. *Epidemiol.Infect.* **99**:591-601.
43. Caugant, D. A., L. F. Mocca, C. E. Frasch, L. O. Froholm, W. D. Zollinger, and R. K. Selander. 1987. Genetic structure of Neisseria meningitidis populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol.* **169**:2781-2792.
44. Ceesay, S. J., S. J. Allen, A. Menon, J. E. Todd, K. Cham, G. M. Carlone, S. H. Turner, L. L. Gheesling, W. DeWitt, B. D. Plikaytis, and B. Greenwood. 1993. Decline in the meningococcal antibody levels in african children 5 years after vaccination and the lack of an effect of booster immunization. *J Infect.Dis.* **167**:1212-1216.
45. Chantler, S. M. and A. L. Clayton. 1988. The use of ELISA for rapid diagnosis: viral antigen detection in clinical specimens, p.293. In D.M. Kemeny and S.J. Challacombe (ed.), *ELISA and other solid phase immunoassays*, Wiley, Chichester.
46. Chen, C. Y., C. A. Genco, J. P. Rock, and S. A. Morse. 1989. Physiology and metabolism of Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis: implications for pathogenesis. *Clin.Microbiol.Rev.* **2** Suppl:S35-S40.
47. Christodoulides, M., B. T. McGuinness, and J. E. Heckels. 1993. Immunization

with synthetic peptides containing epitopes of the class 1 outer-membrane protein of Neisseria meningitidis: production of bactericidal antibodies on immunization with a cyclic peptide. *J Gen.Microbiol.* **139**:1729-1738.

48. Cohen, R. L. and M. S. Artenstein. 1972. Hemagglutination inhibition for serogrouping of *Neisseria meningitidis*. *Appl.Microbiol.* **23**:289-292.

49. Coico, R. F., G. W. Siskind, and G. J. Thorbecke. 1988. Role of IgD and T delta cells in the regulation of the humoral immune response. *Immunol.Rev.* **105**:45-67.

50. Cole, M. F. and C. A. Hale. 1991. Cleavage of chimpanzee secretory immunoglobulin A by Haemophilus influenzae IgA1 protease. *Microb.Pathog.* **11**:39-46.

51. Coombs, R. R., M. L. Scott, and M. P. Cranage. 1987. Assays using red cell-labelled antibodies. *J Immunol.Methods* **101**:1-14.

52. Costantino, P., S. Viti, A. Podda, M. A. Velmonte, L. Nencioni, and R. Rappuoli. 1992. Development and Phase 1 Clinical Testing of a Conjugate Vaccine Against *Meningococcus A* and *Meningococcus C*. *Vaccine* **10**:691-698.

53. de Moraes, J. C., B. A. Perkins, M. C. Camargo, N. T. Hidalgo, H. A. Barbosa, C. T. Sacchi, I. M. Gral, V. L. Gattas, H. Vasconcelos, B. D. Plikaytis, and et al. 1992. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* **340**:1074-1078.

54. Decker, M. D., K. M. Edwards, R. Bradley, and P. Palmer. 1992. Comparative trial in infants of four conjugate Haemophilus influenzae type b vaccines. *J Pediatr.* **120**:184-189.

55. Densen, P. 1989. Interaction of complement with Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae. *Clin.Microbiol.Rev.* **2 Suppl**:S11-S17.

56. Densen, P. 1991. Complement deficiencies and meningococcal disease. *Clin.Exp.Immunol.* **86S1**:57-62.

57. Devi, S. J., R. Schneerson, W. Egan, W. F. Vann, J. B. Robbins, and J. Shiloach. 1991. Identity between polysaccharide antigens of Moraxella non-liquefaciens, group B Neisseria meningitidis, and Escherichia coli K1 (non-O acetylated). *Infect.Immun.* **59**:732-736.

58. Devoe, I. W. and J. E. Gilchrist. 1973. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of Neisseria meningitidis. *J Exp.Med* **138**:1156-1167.

59. Diaz Romero, J. and I. Otschoorn. 1993. Selective biotinylation of Neisseria meningitidis group B capsular polysaccharide and application in an improved ELISA

for the detection of specific antibodies. *J Immunol.Methods* **160**:35-47.

60. Diaz Romero, J. and I. Otschoorn. 1993. Detection of antibodies to Neisseria meningitidis serogroup B capsular polysaccharide by a liquid-phase ELISA, p.39-48. In J. Roth, U. Rutishauser, and F.A. Troy (ed.), *Polysialic acid: from microbes to man*, Birkhäuser Verlag, Basel.

61. Diaz Romero, J. and I. M. Otschoorn. 1993. A comparative study of the immune response to poly-[ $\alpha$ (2-8)-N-acetyl-neuraminic acid], J.M. McGhee, J. Mestecky, and H. Tlaskalova (ed.), *Recent advances in mucosal immunology*, Plenum, New York. En prensa.

62. Dick, W. E. J. and M. Beurret. 1989. Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens. A survey and consideration of design and preparation factors. *Contrib.Microbiol.Immunol.* **10**:48-114.

63. Dintzis, R. Z., M. Okajima, M. H. Middleton, G. Greene, and H. M. Dintzis. 1989. The immunogenicity of soluble haptenated polymers is determined by molecular mass and hapten valence. *J Immunol.* **143**:1239-1244.

64. Dintzis, R. Z., B. Vogelstein, and H. M. Dintzis. 1982. Specific cellular stimulation in the primary immune response: experimental test of a quantized model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **79**:884-888.

65. Donnelly, J. J., R. R. Deck, and M. A. Liu. 1990. Immunogenicity of a Haemophilus influenzae polysaccharide-Neisseria meningitidis outer membrane protein complex conjugate vaccine. *J Immunol.* **145**:3071-3079.

66. DuBose, R. F. and D. L. Hartl. 1990. Rapid purification of PCR products for DNA sequencing using Sepharose CL-6B spin columns. *Biotechniques* **8**:271-274.

67. Edwards, M. S., A. Nicholson-Weller, C. J. Baker, and D. L. Kasper. 1980. The role of specific antibody in alternative complement pathway-mediated opsonophagocytosis of type III group B Streptococcus. *J Exp.Med* **151**:1275-1287.

68. Elkins, K. L., P. W. Stashak, and P. J. Baker. 1990. Analysis of the optimal conditions for the adsorption of type III pneumococcal polysaccharide to plastic for use in solid-phase ELISA. *J Immunol.Methods* **130**:123-131.

69. Feavers, I. M., A. B. Heath, J. A. Bygraves, and M. C. Maiden. 1992. Role of horizontal genetic exchange in the antigenic variation of the class 1 outer membrane protein of Neisseria meningitidis. *Mol.Microbiol.* **6**:489-495.

70. Fernandez de Cossio, M. E., M. Ohlin, M. Llano, B. Selander, S. Cruz, J. del Valle, and C. A. Borrebaeck. 1992. Human monoclonal antibodies against an epitope on the class 5c outer membrane protein common to many pathogenic strains of Neisseria meningitidis. *J Infect.Dis.* **166**:1322-1328.

71. Ferron, L., C. M. Ferreiros, M. T. Criado, and M. Pintor. 1992. Immunogenicity and antigenic heterogeneity of a human transferrin-binding protein in Neisseria meningitidis. *Infect.Immun.* **60**:2887-2892.
72. Figueroa, J. E. and P. Densen. 1991. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin.Microbiol.Rev.* **4**:359-395.
73. Finne, J., D. Bitter Suermann, C. Goridis, and U. Finne. 1987. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J Immunol.* **138**:4402-4407.
74. Finne, J., M. Leinonen, and P. H. Mäkelä. 1983. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* **2**:355-357.
75. Frasch, C. E. 1980. Role of lipopolysaccharide in wheat germ agglutinin-mediated agglutination of Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae. *J Clin.Microbiol.* **12**:498-501.
76. Frasch, C. E., L. Parkes, R. M. McNelis, and E. C. Gotschlich. 1976. Protection against group B meningococcal disease. I. Comparison of group-specific and type-specific protection in the chick embryo model. *J Exp.Med* **144**:319-329.
77. Frasch, C. E. and M. S. Pepler. 1982. Protection against group B Neisseria meningitidis disease: preparation of soluble protein and protein-polysaccharide immunogens. *Infect.Immun.* **37**:271-280.
78. Frasch, C. E., J. M. Zahradnik, L. Y. Wang, L. F. Mocca, and C. M. Tsai. 1988. Antibody response of adults to an aluminum hydroxide-adsorbed Neisseria meningitidis serotype 2b protein-group B polysaccharide vaccine. *J Infect.Dis.* **158**:710-718.
79. Frasch, C. E., W. D. Zollinger, and J. T. Poolman. 1985. Serotype antigens of Neisseria meningitidis and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev.Infect.Dis.* **7**:504-510.
80. Frosch, M. and U. Edwards. 1993. Molecular mechanisms of capsule expression in Neisseria meningitidis serogroup B, p.49-57. In J. Roth, U. Rutishauser, and F.A. Troy (ed.), *Polysialic acid. From microbes to man*, Birkhäuser Verlag, Basel.
81. Frosch, M., U. Edwards, K. Bousset, B. Krausse, and C. Weisgerber. 1991. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol.Microbiol.* **5**:1251-1263.
82. Frosch, M., I. Gorgen, G. J. Boulnois, K. N. Timmis, and D. Bitter Suermann.

1985. NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of Escherichia coli K1 and group B meningococci. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **82**:1194-1198.

83. Frosch, M., D. Muller, K. Bousset, and A. Muller. 1992. Conserved outer membrane protein of Neisseria meningitidis involved in capsule expression. Infect.Immun. **60**:798-803.

84. Frosch, M. and A. Müller. 1993. Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in Neisseria meningitidis. Mol.Microbiol. **8**:483-493.

85. Frosch, M., C. Weisgerber, and T. F. Meyer. 1989. Molecular characterization and expression in Escherichia coli of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of Neisseria meningitidis group B. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **86**:1699-1673.

86. Gawinowicz, M. A., G. Merlini, S. Birken, E. F. Osserman, and E. A. Kabat. 1991. Amino acid sequence of the FV region of a human monoclonal IgM (NOV) with specificity for the capsular polysaccharide of the group B meningococcus and of Escherichia coli K1, which cross-reacts with polynucleotides and with denatured DNA. J Immunol. **147**:915-920.

87. Gebran, S. J., E. L. Romano, H. A. Pons, L. Cariani, and A. N. Soyano. 1992. A modified colorimetric method for the measurement of phagocytosis and antibody-dependent cell cytotoxicity using 2,7-diaminofluorene. J Immunol.Methods **151**:255-260.

88. Gibson, B. W., W. M. Melaugh, N. J. Phillips, M. A. Apicella, A. A. Campagnari, and J. M. Griffiss. 1993. Investigation of the structural heterogeneity of lipooligosaccharides from pathogenic Haemophilus and Neisseria species and of R-type lipopolysaccharides from Salmonella typhimurium by electrospray mass spectrometry. J Bacteriol. **175**:2702-2712.

89. Gigliotti, F. and J. L. Shenep. 1985. Failure of monoclonal antibodies to core glycolipid to bind intact strains of Escherichia coli. J Infect.Dis. **151**:1005-1011.

90. Glode, M. P., E. B. Lewin, A. Sutton, C. T. Le, E. C. Gotschlich, and J. B. Robbins. 1979. Comparative immunogenicity of vaccines prepared from capsular polysaccharides of group C Neisseria meningitidis O-acetyl-positive and O-acetyl-negative variants and Escherichia coli K92 in adult volunteers. J Infect.Dis. **139**:52-59.

91. Goodman, J. W., G. E. Roelants, and V. S. Byers. 1973. RNA-antigen complexes: mechanism of formation and the testing of a postulated mode of action. Ann.N.Y.Acad.Sci. **207**:288-300.

92. Gotschlich, E. C., B. A. Fraser, O. Nishimura, J. B. Robbins, and T. Y. Liu. 1981. Lipid on capsular polysaccharides of gram-negative bacteria. *J Biol.Chem.* **256**:8915-8921.
93. Gotschlich, E. C., T. Y. Liu, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. *J Exp.Med* **129**:1349-1365.
94. Graham, L. L. 1992. Freeze-substitution studies of bacteria. *Electron Microsc.Rev.* **5**:77-103.
95. Gray, B. M., H. C. J. Dillon, and D. G. Pritchard. 1984. Interaction of group B streptococcal type-specific polysaccharides with wheat germ agglutinin and other lectins. *J Immunol.Methods* **72**:269-277.
96. Green, N. M. 1970. Spectrophotometric determination of avidin and biotin, p.418-424. In D.B. McCormick and L.D. Wright (ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York.
97. Greenspan, N. S. and L. J. N. Cooper. 1992. Intermolecular cooperativity: a clue to why mice have IgG3? *Immunol.Today* **13**:164-168.
98. Griffiss, J. M., M. A. Apicella, B. Greenwood, and P. H. Mäkelä. 1987. Vaccines against encapsulated bacteria: a global agenda. *Rev.Infect.Dis.* **9**:176-188.
99. Griffiss, J. M., H. Schneider, R. E. Mandrell, R. Yamasaki, G. A. Jarvis, J. J. Kim, B. W. Gibson, R. Hamadeh, and M. A. Apicella. 1988. Lipooligosaccharides: the principal glycolipids of the neisserial outer membrane. *Rev.Infect.Dis.* **10 Suppl 2**:S287-S295.
100. Griffiss, J. M., R. Yamasaki, M. Estabrook, and J. J. Kim. 1991. Meningococcal molecular mimicry and the search for an ideal vaccine. *Trans.R.Soc.Trop.Med Hyg.* **85 Suppl 1**:32-36.
101. Griffiths, E., P. Stevenson, and A. Ray. 1990. Antigenic and molecular heterogeneity of the transferrin-binding protein of Neisseria meningitidis. *FEMS Microbiol.Lett.* **57**:31-36.
102. Griswold, W. R. and R. R. Chalquest. 1991. Theoretical analysis of the accuracy of calibrated immunoassays for measuring antibody concentration. *Mol.Immunol.* **28**:727-732.
103. Gu, X. X. and C. M. Tsai. 1993. Preparation, characterization, and immunogenicity of meningococcal lipooligosaccharide-derived oligosaccharide-protein conjugate. *Infect.Immun.* **61**:1873-1880.



104. Guesdon, J. L., T. Ternynck, and S. Avrameas. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem.Cytochem.* **27**:1131-1139.
105. Guttormsen, H. K., R. Bjerknes, A. Halstensen, A. Næss, E. A. Hoiby, and C. O. Solberg. 1993. Cross-reacting serum opsonins to meningococci after vaccination. *J Infect.Dis.* **167**:1314-1319.
106. Hajishengallis, G., E. Nikolova, and M. W. Russell. 1992. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A (S-IgA) antibodies to cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA1 protease cleavage. *Infect.Immun.* **60**:5057-5064.
107. Hallenbeck, P. C., F. Yu, and F. A. Troy. 1987. Rapid separation of oligomers of polysialic acid by high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem.* **161**:181-186.
108. Hayrinen, J., D. Bitter Suermann, and J. Finne. 1989. Interaction of meningococcal group B monoclonal antibody and its Fab fragment with alpha 2-8-linked sialic acid polymers: requirement of a long oligosaccharide segment for binding. *Mol.Immunol.* **26**:523-529.
109. Higgins, C. F. and M. M. Gottesman. 1992. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends.Biochem.Sci.* **17**:18-21.
110. Hoffman, W. L. and A. A. Jump. 1989. Inhibition of the streptavidin-biotin interaction by milk. *Anal.Biochem.* **181**:318-320.
111. Holm, S. E. and S. Hakansson. 1988. A simple and sensitive enzyme immunoassay for determination of soluble type-specific polysaccharide from group B streptococci. *J Immunol.Methods* **106**:89-94.
112. Hombach, J., T. Tsubata, L. Leclercq, H. Stappert, and M. Reth. 1990. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* **343**:760-762.
113. Hubert, B., L. Watier, P. Garnerin, and S. Richardson. 1992. Meningococcal disease and influenza-like syndrome: a new approach to an old question. *J Infect.Dis.* **166**:542-545.
114. Ishikawa, E., S. Hashida, and T. Kohno. 1991. Development of ultrasensitive enzyme immunoassay reviewed with emphasis on factors which limit the sensitivity. *Molecular and cellular probes* **5**:81-95.
115. Jarvis, G. A. and N. A. Vedros. 1987. Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. *Infect.Immun.* **55**:174-180.
116. Jennings, H. J. 1989. The capsular polysaccharide of group B *Neisseria*

meningitidis as a vehicle for vaccine development. *Contrib.Microbiol.Immunol.* **10**:151-165.

117. Jennings, H. J., A. Gamian, and F. E. Ashton. 1987. N-propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique epitope on group B Neisseria meningitidis. *J Exp.Med* **165**:1207-1211.

118. Jennings, H. J., A. Gamian, F. Michon, and F. E. Ashton. 1989. Unique intermolecular bactericidal epitope involving the homosialopolysaccharide capsule on the cell surface of group B Neisseria meningitidis and Escherichia coli K1. *J Immunol.* **142**:3585-3591.

119. Jennings, H. J. and C. Lugowski. 1981. Immunochemistry of groups A, B and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. *J Immunol.* **127**:1011-1018.

120. Jennings, H. J., R. Roy, and A. Gamian. 1986. Induction of meningococcal group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice by using an N-propionylated B polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *J Immunol.* **137**:1708-1713.

121. Jennings, H. J., R. Roy, and F. Michon. 1985. Determinant specificities of the groups B and C polysaccharides of Neisseria meningitidis. *J Immunol.* **134**:2651-2657.

122. Jones, D. M. and A. E. Jephcott. 1991. *Neisseria*, *Brahamaella*, *Moraxella* and *Kingella*, p.304-314. In M.T. Parker and B.I. Duerden (ed.), *Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. Vol.2. Systematic Bacteriology*, 8th ed. B.C.Decker, Philadelphia.

123. Kabat, E. A. 1961. Inhibition reactions, p.241-267. In E.A. Kabat and M.M. Mayer (ed.), *Experimental Immunochemistry*, Charles C. Thomas, Springfield,IL.

124. Kabat, E. A., J. Liao, E. F. Osserman, A. Gamian, F. Michon, and H. J. Jennings. 1988. The epitope associated with the binding of the capsular polysaccharide of the group B meningococcus and of *Escherichia coli* K1 to a human monoclonal macroglobulin, IgMNOV. *J Exp.Med* **168**:699-711.

125. Kabat, E. A. and M. W. Mayers. 1961. *Experimental immunochemistry*, Thomas,C.C., Springfield, IL..

126. Kabat, E. A., K. G. Nickerson, J. Liao, L. Grossbard, E. F. Osserman, E. Glickman, L. Chess, J. B. Robbins, R. Schneerson, and Y. H. Yang. 1986. A human monoclonal macroglobulin with specificity for alpha(2-8)-linked poly-N-acetyl neuraminic acid, the capsular polysaccharide of group B meningococci and Escherichia coli K1, which cross-reacts with polynucleotides and with denatured DNA. *J Exp.Med* **164**:642-654.

127. Kaetzel, C. S., J. K. Robinson, K. R. Chintalacharuvu, J. P. Vaerman, and M. E. Lamm. 1991. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cell: a local defense function for IgA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**:8796-8800.
128. Kasper, D. L., J. L. Winkelhake, W. D. Zollinger, B. L. Brandt, and M. S. Artenstein. 1973. Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of Escherichia coli 07:K1(L):NM and group B Neisseria meningitidis. *J Immunol.* **110**:262-268.
129. Kato, N. 1993. Crystalization and electron microscopy of bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Micron* **24**:91-114.
130. Käyhty, H., J. Poolman, H. Abdillahi, A. Sivonen, J. Eskola, E. Tarkka, and H. Peltola. 1989. Sero- and subtypes of group B meningococci causing invasive infections in Finland in 1976-87. *Scand.J Infect.Dis.* **21**:527-535.
131. Kenna, J. G., G. N. Major, and R. S. Williams. 1985. Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol.Methods* **85**:409-419.
132. Kertesz, D. A., S. K. Byrne, and A. W. Chow. 1993. Characterization of Neisseria meningitidis by polymerase chain reaction and restriction endonuclease digestion of the *porA* gene. *J Clin.Microbiol.* **31**:2594-2598.
133. Kilian, M., J. Mestecky, and M. W. Russell. 1988. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol.Rev.* **52**:296-303.
134. Kim, J. J., R. E. Mandrell, and J. M. Griffiss. 1989. Neisseria lactamica and Neisseria meningitidis share lipooligosaccharide epitopes but lack common capsular and class 1, 2, and 3 protein epitopes. *Infect.Immun.* **57**:602-608.
135. Kim, J. J., R. E. Mandrell, Z. Hu, M. A. Westerink, J. T. Poolman, and J. M. Griffiss. 1988. Electromorphic characterization and description of conserved epitopes of the lipooligosaccharides of group A Neisseria meningitidis. *Infect.Immun.* **56**:2631-2638.
136. Kim, K. S., H. Itabashi, P. Gemski, J. Sadoff, R. L. Warren, and A. S. Cross. 1992. The K1 capsule is the critical determinant in the development of Escherichia coli meningitis in the rat. *J Clin.Invest.* **90**:897-905.
137. Kim, K. S., J. H. Kang, A. S. Cross, B. Kaufman, W. D. Zollinger, and J. Sadoff. 1988. Functional activities of monoclonal antibodies to the O side chain of Escherichia coli lipopolysaccharides in vitro and in vivo. *J Infect.Dis.* **157**:47-53.

138. Kornfeld, S. J. and A. G. Plaut. 1981. Secretory immunity and the bacterial IgA proteases. *Rev.Infect.Dis.* **3**:521-534.
139. Krambovitis, E., M. B. McIlmurray, P. A. Lock, H. Holzel, M. R. Lively, and C. Moreno. 1987. Murine monoclonal antibodies for detection of antigens and culture identification of *Neisseria meningitidis* group B and *Escherichia coli* K-1. *J Clin.Microbiol.* **25**:1641-1644.
140. Kroncke, K. D., J. R. Golecki, and K. Jann. 1990. Further electron microscopic studies on the expression of *Escherichia coli* group II capsules. *J Bacteriol.* **172**:3469-3472.
141. Krouboulos, G., A. Tosca, M. M. Konstadoulakis, and A. Varelzidis. 1992. Poly-L-lysine causes false positive results in ELISA methods detecting anti-dsDNA antibodies. *J Immunol.Methods* **148**:261-263.
142. Kuen, L. S., C. H. Ming, and Y. S. Fan. 1993. Background noise in ELISA procedures. Influence of the pH of the coating buffer and correlations with serum IgM concentration. *J Immunol.Methods* **163**:277-278.
143. Kuhn, H. M., L. Brade, and H. Brade. 1992. A complement-dependent enzyme immunoassay (C-EIA) with increased sensitivity for IgM-rich rabbit sera. *J Immunol.Methods* **155**:201-206.
144. Kuhn, L. C. and J. P. Kraehenbuhl. 1983. Monoclonal antibodies recognizing the secreted and membrane domains of the IgA dimer receptor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **409**:751-759.
145. Kulshin, V. A., U. Zähringer, B. Lindner, C. E. Frasch, C. M. Tsai, B. A. Dmitriev, and E. T. Rietschel. 1992. Structural characterization of the Lipid A component of pathogenic *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* **174**:1793-1800.
146. Lackie, P. M., C. Zuber, and J. Roth. 1993. Expression patterns of polysialic acid during vertebrate organogenesis, p.263-278. In J. Roth, U. Rutishauser, and F.A. Troy (ed.), *Polysialic acid. From microbes to man*, Birkhäuser Verlag, Basel.
147. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. **227**:680-685.
148. Lagergard, T., J. Shiloach, J. B. Robbins, and R. Schneerson. 1990. Synthesis and immunological properties of conjugates composed of group B streptococcus type III capsular polysaccharide covalently bound to tetanus toxoid. *Infect.Immun.* **58**:687-694.
149. Lee, B. C. and P. Hill. 1992. Identification of an outer-membrane haemoglobin-binding protein in *Neisseria meningitidis*. *J Gen.Microbiol.* **138**:2647-2656.
150. Lee, S. M. and F. Taguchi. 1989. Rapid identification and typing of herpes

simplex virus by a new enzyme immunoassay with peroxidase-labeled complement C1q. Arch.Virol. **108**:247-257.

151. Leinonen, M., J. Finne, and P. H. Makëla. 1983. Cross-reaction between a brain polysialosyl glycopeptide and capsular polysaccharides of Neisseria meningitidis group B and Escherichia coli K1. Med.Trop. **43**:181-183.

152. Leinonen, M. and C. E. Frasch. 1982. Class-specific antibody response to group B Neisseria meningitidis capsular polysaccharide: use of polylysine precoating in an enzyme-linked immunosorbent assay. Infect.Immun. **38**:1203-1207.

153. Lew, A. M. 1984. The effect of epitope density and antibody affinity on the ELISA as analysed by monoclonal antibodies. J Immunol.Methods **72**:171-176.

154. Lifely, M. R. and J. Esdaile. 1991. Specificity of the immune response to the group B polysaccharide of Neisseria meningitidis. Immunology **74**:490-496.

155. Lifely, M. R., J. Esdaile, and C. Moreno. 1989. Passive transfer of meningococcal group B polysaccharide antibodies to the offspring of pregnant rabbits and their protective role against infection with Escherichia coli K1. Vaccine **7**:17-21.

156. Lifely, M. R., C. Moreno, and J. C. Lindon. 1987. An integrated molecular and immunological approach towards a meningococcal group B vaccine. Vaccine **5**:11-25.

157. Lifely, M. R., U. T. Nowicka, and C. Moreno. 1986. Analysis of the chain length of oligomers and polymers of sialic acid isolated from Neisseria meningitidis group B and C and Escherichia coli K1 and K92. Carbohydr.Res. **156**:123-135.

158. Lifely, M. R., S. C. Roberts, W. M. Shepherd, J. Esdaile, Z. Wang, A. Cleverly, A. A. Aulaqi, and C. Moreno. 1991. Immunogenicity in adult males of a Neisseria meningitidis group B vaccine composed of polysaccharide complexed with outer membrane proteins. Vaccine **9**:60-66.

159. Lifely, M. R. and Z. Wang. 1988. Immune responses in mice to different noncovalent complexes of meningococcal B polysaccharide and outer membrane proteins. Infect.Immun. **56**:3221-3227.

160. Liu, M. A., A. Friedman, A. I. Oliff, J. Tai, D. Martinez, R. R. Deck, J. T. Shieh, T. D. Jenkins, J. J. Donnelly, and L. A. Hawe. 1992. A vaccine carrier derived from Neisseria meningitidis with mitogenic activity for lymphocytes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **89**:4633-4637.

161. Liu, T. Y., E. C. Gotschlich, W. Egan, and J. B. Robbins. 1977. Sialic acid-containing polysaccharides of Neisseria meningitidis and Escherichia coli strain Bos-12: structure and immunology. J Infect.Dis. **136**(Suppl.):S71-S77.

162. Lomholt, H., K. Poulsen, D. A. Caugant, and M. Kilian. 1992. Molecular

polymorphism and epidemiology of Neisseria meningitidis immunoglobulin A1 proteases. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **89**:2120-2124.

163. **Lowell, G. H., L. F. Smith, J. M. Griffiss, and B. L. Brandt.** 1980. IgA-dependent, monocyte-mediated, antibacterial activity. J Exp.Med **152**:452-457.

164. **Mackinnon, F. G., A. R. Gorringer, S. G. P. Funnell, and A. Robinson.** 1992. Intranasal infection of infant mice with Neisseria meningitidis. Microbial.Pathogenesis. **12**:415-420.

165. **Maloney, P. C., H. Schneider, and B. L. Brandt.** 1972. Production and degradation of serogroup B Neisseria meningitidis polysaccharide. Infect.Immun. **6**:657-661.

166. **Mandrell, R. E., J. M. Griffiss, and B. A. Macher.** 1988. Lipooligosaccharides (LOS) of Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. Carbohydrate sequence specificity of the mouse monoclonal antibodies that recognize crossreacting antigens on LOS and human erythrocytes. J Exp.Med **168**:107-126.

167. **Mandrell, R. E. and W. D. Zollinger.** 1982. Measurement of antibodies to meningococcal group B polysaccharide: low avidity binding and equilibrium binding constants. J Immunol. **129**:2172-2178.

168. **Manjula, B. N. and C. P. Glaudemans.** 1978. Affinity of horse anti-phosphorylcholine antibodies for some pneumococcal polysaccharides. Contribution of the polysaccharide backbone. Immunochemistry **15**:269-271.

169. **Marques, M. B., D. L. Kasper, M. K. Pangburn, and M. R. Wessels.** 1992. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. Infect.Immun. **60**:3986-3993.

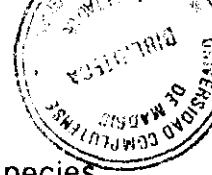
170. **Martin, P. V., A. Laviota, H. Ohayon, and J. Y. Riou.** 1986. Presence of a capsule in Neisseria lactamica, antigenically similar to the capsule of Neisseria meningitidis. Ann.Inst.Pasteur.Microbiol. **137A**:279-285.

171. **Masson, L. and B. E. Holbein.** 1985. Role of lipid intermediate(s) in the synthesis of serogroup B Neisseria meningitidis capsular polysaccharide. J Bacteriol. **161**:861-867.

172. **Masson, L., B. E. Holbein, and F. E. Ashton.** 1982. Virulence linked to polysaccharide production in serogroup B Neisseria meningitidis. FEMS Microbiol.Lett. **13**:187-190.

173. **Mazanec, M. B., C. S. Kaetzel, M. E. Lamm, D. Fletcher, and J. G. Nedrud.** 1992. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies.

174. Mazanec, M. B., J. G. Nedrud, C. S. Kaetzel, and M. E. Lamm. 1993. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol.Today* 14:430-435.
175. Mäkelä, O., F. Peterfy, I. M. Outschoorn, A. W. Richter, and I. Seppala. 1984. Immunogenic properties of  $\alpha(1-6)$  dextran, its' protein conjugates, and conjugates of its' breakdown products in mice. *Scand.J Immunol.* 19:541-550.
176. McSweegan, E. F. and T. G. Pistole. 1982. Interaction of the lectin limulin with capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli*. *Biochim.Biophys.Res.Comun.* 106:1390-1397.
177. Meikle, P. J., N. M. Young, and D. R. Bundle. 1990. O-antigen biotin conjugates. Preparation and use in direct competitive enzyme immunoassays. *J Immunol.Methods* 132:255-261.
178. Melancon, J., R. A. Murgita, and I. W. Devoe. 1983. Activation of murine B lymphocytes by *Neisseria meningitidis* and isolated meningococcal surface antigens. *Infect.Immun.* 42:471-479.
179. Meno, Y. and K. Amako. 1990. Morphological evidence for penetration of anti-O antibody through the capsule of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect.Immun.* 58:1421-1428.
180. Messina, J. P., P. G. Hickox, M. L. Lepow, B. Pollara, and R. A. Venezia. 1985. Modification of a direct enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin G and M antibodies to pneumococcal polysaccharide. *J Clin.Microbiol.* 21:390.
181. Mold, C., S. Nakayama, T. J. Holzer, H. Gewurz, and T. W. Du Clos. 1981. C-reactive protein is protective against streptococcus pneumoniae infection in mice. *J Exp.Med* 154:1703-1708.
182. Monroe, J. G. and V. L. Seyfert. 1988. Studies of surface immunoglobulin-dependent B cell activation. *Immunol.Res.* 7:136-151.
183. Moreno, C., J. Hewitt, K. Hastings, and D. Brown. 1983. Immunological properties of monoclonal antibodies specific for meningococcal polysaccharides: the protective capacity of IgM antibodies specific for polysaccharide group B. *J Gen.Microbiol.* 129:2451-2456.
184. Moreno, C., M. R. Lively, and J. Esdaile. 1985. Immunity and protection of mice against *Neisseria meningitidis* group B by vaccination, using polysaccharide complexed with outer membrane proteins: a comparison with purified B polysaccharide. *Infect.Immun.* 47:527-533.
185. Morse, S. A., C. Y. Chen, A. LeFaou, and T. A. Mietzner. 1988. A potential



role for the major iron-regulated protein expressed by pathogenic *Neisseria* species. *Rev.Infect.Dis.* **10 Suppl 2**:S306-S310.

186. Mostov, K. E. and G. Blobel. 1983. Transcellular transport of polymeric immunoglobulin by secretory component: a model for studying intracellular protein sorting. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **409**:441-451.

187. Mulks, M. H., A. G. Plaut, H. A. Feldman, and B. Frangione. 1980. IgA proteases of two distinct specificities are released by *Neisseria meningitidis*. *J Exp.Med* **152**:1442-1447.

188. Munkley, A., C. R. Tinsley, M. Virji, and J. E. Heckels. 1991. Blocking of bactericidal killing of *Neisseria meningitidis* by antibodies directed against class 4 outer membrane protein. *Microb.Pathog.* **11**:447-452.

189. Nato, F., J. C. Mazie, J. M. Fournier, B. Slizewicz, N. Sagot, M. Guibourdenche, D. Postic, and J. Y. Riou. 1991. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against group A, B, and C capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* and preparation of latex reagents. *J Clin.Microbiol.* **29**:1447-1452.

190. Neal, M. W. and J. R. Florini. 1973. A rapid method for desalting small volumes of solution. *Anal.Biochem.* **55**:328-330.

191. Nguyen, N. Y., A. Suzuki, S. M. Cheng, G. Zon, and T. Y. Liu. 1986. Isolation and characterization of *Limulus* C-reactive protein genes. *J Biol.Chem.* **261**:10450-10455.

192. Nielsen, H. E., C. Koch, P. Magnussen, and I. Lind. 1989. Complement deficiencies in selected groups of patients with meningococcal disease. *Scand.J Infect.Dis.* **21**:389-396.

193. Nilsson, O. 1992. Carbohydrate antigens in human lung carcinomas. *APMIS* **100S27**:149-161.

194. Nilsson, U. R., O. Larm, B. Nilsson, K. E. Storm, and H. Elwing. 1993. Modification of the complement binding properties of polystyrene: effects of end-point heparin attachment. *Scand.J Immunol.* **37**:349-354.

195. Orren, A., R. E. Warren, P. C. Potter, A. M. Jones, P. J. Lachmann, and J. T. Poolman. 1992. Antibodies to meningococcal class 1 outer membrane proteins in South African complement-deficient and complement-sufficient subjects. *Infect.Immun.* **60**:4510-4516.

196. Orskov, F. and I. Orskov. 1991. Complex formation between *Escherichia coli* lipopolysaccharide O antigen and capsular K antigen as detected by immunoelectrophoresis. *APMIS* **99**:615-619.



197. Orskov, F., I. Orskov, A. Sutton, R. Schneerson, W. Lin, W. Egan, G. E. Hoff, and J. B. Robbins. 1979. Form variation in Escherichia coli K1: determined by O-acetylation of the capsular polysaccharide. *J Exp.Med* **149**:669-685.
198. Osmand, A. P., R. F. Mortensen, J. Siegel, and H. Gewurz. 1975. Interaction of C-reactive protein with the complement system. III. Complement-dependent passive hemolysis initiated by CRP. *J Exp.Med* **142**:1065-1077.
199. Outschoorn, I. M., G. Ashwell, F. Gruezo, and E. A. Kabat. 1974. Immunochemical studies on dextrans. VIII. Specific and cross-reactivity with dextran of the antibodies formed in rabbits to isomaltohexaonic acid coupled to bovine serum albumine. *J Immunol.* **113**:896-903.
200. Overbeek, B. P. and E. M. Veringa. 1991. Role of antibodies and antibiotics in aerobic gram-negative septicemia: possible synergism between antimicrobial treatment and immunotherapy. *Rev.Infect.Dis.* **13**:751-760.
201. Padeh, S., C. L. Jaffe, and J. H. Passwell. 1991. Activation of human monocytes via their sIgA receptors. *Immunology* **72**:188-193.
202. Pannekoek, Y., I. G. A. Schurman, J. Dankert, and J. P. M. van Putten. 1993. Immunogenicity of the meningococcal stress protein MSP63 during natural infection. *Clin.Exp.Immunol.* **93**:377-381.
203. Paoletti, L. C., M. R. Wessels, F. Michon, J. DiFabio, H. J. Jennings, and D. L. Kasper. 1992. Group B Streptococcus type II polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Infect.Immun.* **60**:4009-4014.
204. Pavliak, V., J. R. Brisson, F. Michon, D. Uhrin, and H. J. Jennings. 1993. Structure of the sialylated L3 lipopolysaccharide of Neisseria meningitidis. *J Biol.Chem.* **268**:14146-14152.
205. Peeters, C. C., A. M. Tenbergen Meekes, J. T. Poolman, B. J. Zegers, and G. T. Rijkers. 1992. Immunogenicity of a Streptococcus pneumoniae type 4 polysaccharide-protein conjugate vaccine is decreased by admixture of high doses of free saccharide. *Vaccine* **10**:833-840.
206. Pelkonen, S., J. Hayrinen, and J. Finne. 1988. Polyacrylamide gel electrophoresis of the capsular polysaccharides of Escherichia coli K1 and other bacteria. *J Bacteriol.* **170**:2646-2653.
207. Peterfy, F., P. Kuusela, and O. Mäkelä. 1983. Affinity requirements for antibody assays mapped by monoclonal antibodies. *J Immunol.* **130**:1809-1813.
208. Petrov, A. B., B. F. Semenov, Y. P. Vartanyan, M. M. Zakirov, V. P. Torchilin, V. S. Trubetsky, N. V. Koshkina, V. L. L'Vov, I. K. Verner, I. V. Lopyrev, and et al. 1992. Toxicity and immunogenicity of Neisseria meningitidis lipopolysaccharide incorporated into liposomes. *Infect.Immun.* **60**:3897-3903.

209. **Pettersson, A., B. Kuipers, M. Peizer, E. Verhagen, R. H. Tiesjema, J. Tommassen, and J. T. Poolman.** 1990. Monoclonal antibodies against the 70-kilodalton iron-regulated protein of Neisseria meningitidis are bactericidal and strain specific. *Infect.Immun.* **58**:3036-3041.
210. **Porro, M.** 1987. Artificial glycoproteins of predetermined multivalent antigenicity as a new generation of candidate vaccines to prevent infections from encapsulated bacteria: analysis of antigenicity versus immunogenicity, p.279-306. In R. Bell and G. Torrigiani (ed.), *Towards better carbohydrate vaccines*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
211. **Porro, M., P. Constantino, and M. Saletti.** 1983. Immunochemistry of meningococcal group B oligosaccharide-protein conjugates. *Med.Trop.* **43**:129-132.
212. **Porro, M., S. Fabbiani, I. Marsili, S. Viti, and M. Saletti.** 1983. Immuno-electrophoretic characterization of the molecular weight polydispersion of polysaccharides in multivalent bacterial capsular polysaccharide vaccines. *J Biol.Stand.* **11**:65-74.
213. **Porstmann, B., T. Porstmann, E. Nugel, and U. Evers.** 1985. Which of the commonly used marker enzymes gives the best results in colorimetric and fluorimetric enzyme immunoassays: horseradish peroxidase, alkaline phosphatase or B-galactosidase? *J Immunol.Methods* **79**:27-37.
214. **Powell, D. A.** 1979. Structure, solution properties and biological interactions of some microbial extracellular polysaccharides, p.117-160. In R.C. Berkeley, G.W. Gooday, and D.C. Elwood (ed.), *Microbial polysaccharides and polysaccharases*, Academic Press, London.
215. **Pritchard, D. G., B. M. Gray, and M. L. Egan.** 1992. Murine monoclonal antibodies to type Ib polysaccharide of group B streptococci bind to human milk oligosaccharides. *Infect.Immun.* **60**:1598-1602.
216. **Raetz, C. R. H.** 1993. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J Bacteriol.* **175**:5745-5753.
217. **Raff, H. V., C. Bradley, W. Brady, K. Donaldson, L. Lipsich, G. Maloney, W. Shuford, M. Walls, P. Ward, E. Wolff, and et al.** 1991. Comparison of functional activities between IgG1 and IgM class-switched human monoclonal antibodies reactive with group B streptococci or *Escherichia coli* K1. *J Infect.Dis.* **163**:346-354.
218. **Raff, H. V., D. Devereux, W. Shuford, D. Abbott Brown, and G. Maloney.** 1988. Human monoclonal antibody with protective activity for Escherichia coli K1 and Neisseria meningitidis group B infections. *J Infect.Dis.* **157**:118-126.
219. **Raza, M. W., M. M. Ogilvie, C. C. Blackwell, J. Stewart, R. A. Elton, and D.**

**M. Weir.** 1993. Effect of respiratory syncytial virus infection on binding of Neisseria meningitidis and Haemophilus influenzae type b to a human epithelial cell line (HEp-2). *Epidemiol.Infect.* **110**:339-347.

220. **Reinholdt, J. and M. Kilian.** 1991. Lack of cleavage of immunoglobulin A (IgA) from rhesus monkeys by bacterial IgA1 proteases. *Infect.Immun.* **59**:2219-2221.

221. **Robbins, A. and P. Freeman.** 1988. Obstacles to developing vaccines for the third world. *Sci.Am.* **259**:90-95.

222. **Rosenqvist, E., E. A. Hoiby, G. Bjune, K. Bryn, O. Closs, B. Feiring, A. Klem, H. Nokleby, and L. O. Frohm.** 1991. Human antibody responses after vaccination with the Norwegian group B meningococcal outer membrane vesicle vaccine: results from ELISA studies. *NIPH.Ann.* **14**:169-179.

223. **Rosenqvist, E., E. A. Hoiby, E. Wedege, B. Kusecek, and M. Achtman.** 1993. The 5c protein of Neisseria meningitidis is highly immunogenic in humans and induces bactericidal antibodies. *J Infect.Dis.* **167**:1065-1073.

224. **Ross, S. C., P. J. Rosenthal, H. M. Berberich, and P. Densen.** 1987. Killing of Neisseria meningitidis by human neutrophils: implications for normal and complement-deficient individuals. *J Infect.Dis.* **155**:1266-1275.

225. **Roth, J., C. Zuber, P. Komminoth, E. P. Scheidegger, M. J. Warhol, D. Bitter Suermann, and P. U. Heitz.** 1993. Expression of polysialic acid in tumors and its significance for tumor growth, p.335-348. In J. Roth, U. Rutishauser, and F.A. Troy (ed.), *Polysialic acid. From microbes to man*, Birkhäuser Verlag, Basel.

226. **Rougon, G., S. Olive, and D. Figarella-Branger.** 1993. Is PSA-NCAM a marker for cell plasticity ? p.323-333. In J. Roth, U. Rutishauser, and F.A. Troy (ed.), *Polysialic acid. From microbes to man*, Birkhäuser Verlag, Basel.

227. **Roy, R. and C. A. Laferriere.** 1988. Synthesis of antigenic copolymers of N-acetylneuraminic acid binding to wheat germ agglutinin and antibodies. *Carbohydr.Res.* **177**:C1-C4.

228. **Rutishauser, U., A. Acheson, A. K. Hall, D. M. Mann, and J. Sunshine.** 1988. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* **240**:53-57.

229. **Sacchi, C. T., L. L. Pessoa, S. R. Ramos, L. G. Milagres, M. C. Camargo, N. T. Hidalgo, C. E. Melles, D. A. Caugant, and C. E. Frasch.** 1992. Ongoing group B Neisseria meningitidis epidemic in Sao Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-5 complex. *J Clin.Microbiol.* **30**:1734-1738.

230. **Saffell, J. L., F. S. Walsh, and P. Doherty.** 1992. Direct activation of second messenger pathway mimics cell adhesion molecule-dependent neurite outgrowth. *J Cell Biol.* **118**:663-670.

231. Samuel, D. and L. K. Siew. 1991. A re-evaluation of the use of Sephadex for the concentration of dilute protein solutions. *J Immunol.Methods* **142**:267-269.
232. Sarff, L. D., G. H. McCracken, M. S. Schiffer, M. P. Glode, J. B. Robbins, I. Orskov, and F. Orskov. 1975. Epidemiology of Escherichia coli K1 in healthy and diseased newborns. *Lancet* **i**:1099-1104.
233. Sarvamangala, J. N., J. N. Devi, J. B. Robbins, and R. Schneerson. 1991. Antibodies to poly[(2-8)-a-N-acetylneuraminic acid] and poly[(2-9)-a-N-acetylneuraminic acid] are elicited by immunizing mice with Escherichia coli K92 conjugates: potential vaccines for groups B and C meningococci and Escherichia coli K1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**:7175-7179.
234. Sassi, F., F. Hugo, M. Muhly, A. Khaled, and S. Bhakdi. 1987. A reason for the cytolytic inefficiency of murine serum. *Immunology* **62**:145-147.
235. Saukkonen, K., M. Leinonen, H. Abdillahi, and J. T. Poolman. 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.
236. Sáez Nieto, J. A., A. Llacer, F. Catalá, A. Fenoll, and J. Casal. 1981. La infección meningocócica en España durante 1980. *Laboratorio* **71**:469-481.
237. Schaad, U. B. 1980. Arthritis in disease due to *Neisseria meningitidis*. *Rev.Infect.Dis.* **2**:880-888.
238. Senior, B. W., L. M. Loomes, and M. A. Kerr. 1991. Microbial IgA proteases and virulence. *Rev.Med.Microbiol.* **2**:200-207.
239. Shenep, J. L., F. Gigliotti, D. S. Davis, and W. K. Hildner. 1988. Reactivity of antibodies to core glycolipid with gram-negative bacteria, p.231-235. In B. Urbascheck (ed.), *Perspectives on bacterial pathogenesis and host defense*, University of Chicago Press, Chicago.
240. Sierra, G. V., H. C. Campa, N. M. Varcacel, I. L. Garcia, P. L. Izquierdo, P. F. Sotolongo, G. V. Casanueva, C. O. Rico, C. R. Rodriguez, and M. H. Terry. 1991. Vaccine against group B Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH.Ann.* **14**:195-207.
241. Sjöholm, A. G. 1990. Inherited complement deficiency states: implications for immunity and immunological disease. *APMIS* **98**:861-874.
242. Skevakis, L., C. E. Frasch, J. M. Zahradnik, and R. Dolin. 1984. Class-specific human bactericidal antibodies to capsular and noncapsular surface antigens of Neisseria meningitidis. *J Infect.Dis.* **149**:387-396.
243. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985.

Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* **150**:76-85.

244. **Sorensen, U. B. and J. Blom.** 1992. Capsular polysaccharide is linked to the outer surface of type 6A pneumococcal cell walls. *APMIS* **100**:891-893.

245. **Spiegel, S. and M. Wilchek.** 1981. Membrane sialoglycolipids emerging as possible signal transducers for lymphocyte stimulation. *J Immunol.* **127**:572-575.

246. **Stearns, D. J., S. Kurosawa, P. J. Sims, N. L. Esmon, and C. T. Esmon.** 1988. The interaction of a Ca<sup>2+</sup>-dependent monoclonal antibody with the protein C activation peptide region. Evidence for obligatory Ca<sup>2+</sup> binding to both antigen and antibody. *J Biol.Chem.* **263**:826-832.

247. **Stephens, D. S., P. A. Spellman, and J. S. Swartley.** 1993. Effect of the (alpha 2-8)-linked polysialic acid capsule on adherence of Neisseria meningitidis to human mucosal cells. *J Infect.Dis.* **167**:475-479.

248. **Stephens, D. S., A. M. Whitney, G. K. Schoolnik, and W. D. Zollinger.** 1988. Common epitopes of pilin of Neisseria meningitidis. *J Infect.Dis.* **158**:332-342.

249. **Steven, N. M. and D. Nathwani.** 1993. Facial palsy, meningococcal meningitis, and reactivation of Herpes simplex virus. *Clin.Infect.Dis.* **16**:181.

250. **Stevens, P., C. L. Chu, and L. S. Young.** 1980. K-1 antigen content and the presence of an additional sialic acid-containing antigen among bacteremic K-1 Escherichia coli: correlation with susceptibility to opsonophagocytosis. *Infect.Immun.* **29**:1055-1061.

251. **Stevenson, P., P. Williams, and E. Griffiths.** 1992. Common antigenic domains in transferrin-binding protein 2 of Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, and Haemophilus influenzae type b. *Infect.Immun.* **60**:2391-2396.

252. **Sutton, A., W. F. Vann, A. B. Karpas, K. E. Stein, and R. Schneerson.** 1985. An avidin-biotin based ELISA for quantitation of antibody to bacterial polysaccharides. *J Immunol.Methods* **82**:215-224.

253. **Svennerholm, L.** 1957. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim.Biophys.Acta* **24**:604-611.

254. **Tarkka, E. and M. Sarvas.** 1987. Cloning of an outer membrane protein of Neisseria meningitidis in Escherichia coli. *Microb.Pathog.* **3**:445-453.

255. **Thompson, R. Q., G. C. Barone, H. B. Halsall, and W. R. Heineman.** 1991. Comparison of methods for following alkaline phosphatase catalysis: spectrophotometric versus amperometric detection. *Anal.Biochem.* **192**:90-95.

256. **Tiesjema, R. H., E. C. Beuvery, and B. J. te Pas.** 1977. Enhanced stability of meningococcal polysaccharides by using lactose as a menstruum for lyophilization.

Bull. World Health Organ. **55**:43-48.

257. Tiesjema, R. H., B. J. te Pas, P. A. De Graaf, E. P. Verhagen, P. Smid, E. C. Beuvery, A. Van Der Kaaden, J. P. Kamerling, J. F. Vliegthart, C. T. Hopman, J. T. Poolman, and H. C. Zanen. 1983. Isolation and partial characterization of meningococcal group H, I and K polysaccharides. *Med. Trop.* **43**:133-137.

258. Tilton, R. C., F. Dias, and R. W. Ryan. 1984. Comparative evaluation of three commercial products and counterimmunoelectrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid. *J Clin. Microbiol.* **20**:231-234.

259. Tinsley, C. R., B. N. Manjula, and E. C. Gotschlich. 1993. Purification and characterization of polyphosphate kinase from Neisseria meningitidis. *Infect. Immun.* **61**:3703-3710.

260. Tinsley, C. R., M. Virji, and J. E. Heckels. 1992. Antibodies recognizing a variety of different structural motifs on meningococcal Lip antigen fail to demonstrate bactericidal activity. *J Gen. Microbiol.* **138**:2321-2328.

261. Tsai, C. M. 1986. The analysis of lipopolysaccharide (endotoxin) in meningococcal polysaccharide vaccines by silver staining following SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol. Stand.* **14**:25-33.

262. Tsai, C. M., R. Boykins, and C. E. Frasch. 1983. Heterogeneity and variation among *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides. *J Bacteriol.* **155**:498-504.

263. Tsai, C. M. and C. I. Civin. 1991. Eight lipooligosaccharides of Neisseria meningitidis react with a monoclonal antibody which binds lacto-N-neotetraose (Gal beta 1-4GlcNAc beta 1-3Gal beta 1-4Glc). *Infect. Immun.* **59**:3604-3609.

264. Tsai, C. M. and C. E. Frasch. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**:115-119.

265. Tsai, C. M., D. A. Zopf, R. K. Yu, R. Wistar, and V. Ginsburg. 1977. A Waldenström macroglobulin that is both a cold agglutinin and a cryoglobulin because it binds N-acetylneuraminosyl residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **10**:4591-4594.

266. Tzanakaki, G., C. C. Blackwell, J. Kremastinou, D. M. Weir, A. Mentis, and R. J. Fallon. 1993. Serogroups, serotypes and subtypes of Neisseria meningitidis isolated from patients and carriers in Greece. *J Med Microbiol.* **38**:19-22.

267. Van den Berg, C. W., P. C. Aerts, and H. Van Dijk. 1992. C1-inhibitor prevents PEG fractionation-induced, EDTA-resistant activation of mouse complement. *Mol. Immunol.* **29**:363-369.

268. van der Ley, P., J. E. Heckels, M. Virji, P. Hoogerhout, and J. T. Poolman. 1991. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp.

Infect.Immun. **59**:2963-2971.

269. van der Ley, P. and J. T. Poolman. 1992. Construction of a multivalent meningococcal vaccine strain based on the class 1 outer membrane protein. Infect.Immun. **60**:3156-3161.

270. Vann, W. F., G. A. Zapata, I. Roberts, G. J. Boulnois, and R. P. Silver. 1993. Structure and function of enzymes in sialic metabolism in polysialic producing bacteria, p.125-136. In J. Roth, U. Rutishauser, and F.A. Troy (ed.), Polysialic acid. From microbes to man, Birkhäuser Verlag, Basel.

271. Vella, P. P., J. M. Staub, J. Armstrong, K. T. Dolan, C. M. Rusk, S. Szymanski, W. E. Greer, S. Marburg, P. J. Kniskern, T. L. Schofield, and et al. 1990. Immunogenicity of a new Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine (meningococcal protein conjugate) (PedvaxHIB). Pediatrics **85**:668-675.

272. Verheul, A. F., G. J. Boons, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom, H. J. Jennings, H. Snippe, J. Verhoef, P. Hoogerhout, and J. T. Poolman. 1991. Minimal oligosaccharide structures required for induction of immune responses against meningococcal immunotype L1, L2, and L3, 7,9 lipopolysaccharides determined by using synthetic oligosaccharide-proteinconjugates. Infect.Immun. **59**:3566-3573.

273. Verheul, A. F., A. K. Braat, J. M. Leenhouts, P. Hoogerhout, J. T. Poolman, H. Snippe, and J. Verhoef. 1991. Preparation, characterization, and immunogenicity of meningococcal immunotype L2 and L3,7,9 phosphoethanolamine group-containing oligosaccharide-protein conjugates. Infect.Immun. **59**:843-851.

274. Verheul, A. F., J. T. Poolman, H. Snippe, and J. Verhoef. 1991. The influence of the adjuvant Quil A on the epitope specificity of meningococcal lipopolysaccharide anti-carbohydrate antibodies. Mol.Immunol. **28**:1193-1200.

275. Verheul, A. F., H. Snippe, and J. T. Poolman. 1993. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. Microbiol.Rev. **57**:34-49.

276. Verheul, A. F., J. A. van Gaans van den Brink, E. J. Wiertz, H. Snippe, J. Verhoef, and J. T. Poolman. 1993. Meningococcal lipopolysaccharide (LPS)-derived oligosaccharide-protein conjugates evoke outer membrane protein -but not LPS -specific bactericidal antibodies in mice: influence of adjuvants. Infect.Immun. **61**:187-196.

277. Verheul, A. F., A. A. Versteeg, M. J. De Reuver, M. Jansze, and H. Snippe. 1989. Modulation of the immune response to pneumococcal type 14 capsular polysaccharide-protein conjugates by the adjuvant Quil A depends on the properties of the conjugates. Infect.Immun. **57**:1078-1083.

278. Verheul, A. F., A. A. Versteeg, N. A. Westerdaal, G. J. Van Dam, M. Jansze,

and H. Snippe. 1990. Measurement of the humoral immune response against *Streptococcus pneumoniae* type 14-derived antigens by an ELISA and ELISPOT assay based on biotin-avidin technology. *J Immunol.Methods* **126**:79-87.

279. Vermeulen, C., A. Cross, W. R. Byrne, and W. D. Zollinger. 1988. Quantitative relationship between capsular content and killing of K1-encapsulated *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **56**:2723-2730.

280. Verschoor, J. A., M. J. Meiring, S. van Wyngaardt, and K. Weyer. 1990. Polystyrene, poly-L-lysine and nylon as adsorptive surfaces for the binding of whole cells of *Mycobacterium tuberculosis* H37 RV to ELISA plates. *J Immunoassay* **11**:413-428.

281. Virji, M., C. Alexandrescu, D. J. Ferguson, J. R. Saunders, and E. R. Moxon. 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.

282. Virji, M., H. Käyhty, D. J. Ferguson, C. Alexandrescu, J. E. Heckels, and E. R. Moxon. 1991. The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Mol.Microbiol.* **5**:1831-1841.

283. Virji, M., K. Makepeace, D. J. Ferguson, M. Achtman, J. Sarkari, and E. R. Moxon. 1992. Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Mol.Microbiol.* **6**:2785-2795.

284. Vogt, R. F. J., D. L. Phillips, L. O. Henderson, W. Whitfield, and F. W. Spierto. 1987. Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *J Immunol.Methods* **101**:43-50.

285. Waage, A. and A. O. Aasen. 1992. Different role of cytokine mediators in septic shock related to meningococcal disease and surgery/polytrauma. *Immunol.Rev.* **127**:221-230.

286. Wall, R. A., H. A. Davies, and S. P. Borriello. 1989. Epitopes of serogroup B *Neisseria meningitidis* analysed in vitro and directly from cerebrospinal fluid. *FEMS Microbiol.Lett.* **53**:129-135.

287. Wang, J. F., D. A. Caugant, X. Li, X. Hu, J. T. Poolman, B. A. Crowe, and M. Achtman. 1992. Clonal and antigenic analysis of serogroup A *Neisseria meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in the People's Republic of China. *Infect.Immun.* **60**:5267-5282.

288. Wang, J. F., D. A. Caugant, G. Morelli, B. Koumaré, and M. Achtman. 1993. Antigenic and epidemiologic properties of ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Infect.Dis.* **167**:1320-1329.

289. Wang, L. Y. and C. E. Frasch. 1984. Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect.Immun.* **46**:408-414.



290. Ward, K. N., A. Fleer, J. Verhoef, and D. M. Jones. 1987. Opsonisation and phagocytosis of group B meningococci by polymorphonuclear leucocytes: comparison of sulphonamide sensitive and resistant strains. *J Clin.Pathol.* **40**:361-367.
291. Weber, R. J. and L. W. Clem. 1981. The molecular mechanism of cryoprecipitation and cold agglutination of an IgM lambda waldeström macroglobulin with anti-Gd specificity: sedimentation analysis and localization of interacting sites. *J Immunol.* **127**:300-305.
292. Wedege, E., D. A. Caugant, L. O. Froholm, and W. D. Zollinger. 1991. Characterization of serogroup A and B strains of *Neisseria meningitidis* with serotype 4 and 21 monoclonal antibodies and by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin.Microbiol.* **29**:1486-1492.
293. Wedege, E., R. Dalseg, D. A. Caugant, J. T. Poolman, and L. O. Froholm. 1993. Expression of an inaccessible P1.7 subtype epitope on meningococcal class 1 proteins. *J Med Microbiol.* **38**:23-28.
294. Weihe, P., B. Mathiassen, J. M. Rasmussen, T. Petersen, and H. Isager. 1988. An epidemic outbreak of group B meningococcal disease on the Faroe Islands. *Scand.J Infect.Dis.* **20**:291-296.
295. Wessels, M. R. and D. L. Kasper. 1989. Antibody recognition of the type 14 pneumococcal capsule. Evidence for a conformational epitope in a neutral polysaccharide. *J Exp.Med* **169**:2121-2131.
296. WHO Expert Comitte on Biological Standarization., 1976. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. WHO Tech.Rep.Ser. **594**:50-75.
297. Yamasaki, R. and B. Bacon. 1991. Three-dimensional structural analysis of the group B polysaccharide of *Neisseria meningitidis* 6275 by two-dimensional NMR: the polysaccharide is suggested to exist in helical conformations in solution. *Biochemistry* **30**:851-857.
298. Yamasaki, R., J. M. Griffiss, K. P. Quinn, and R. E. Mandrell. 1993. Neuraminic acid is  $\alpha$ 2-3 linked in the lipooligosacharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain 6275. *J Bacteriol.* **175**:4565-4568.
299. Yang, P., X. Yin, and U. Rutishauser. 1992. Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J Cell Biol.* **116**:1487-1496.
300. Zapata, G. A., W. F. Vann, Y. Rubinstein, and C. E. Frasch. 1992. Identification of variable region differences in *Neisseria meningitidis* class 3 protein sequences among five group B serotypes. *Mol.Microbiol.* **6**:3493-3499.
301. Zigterman, G. J., A. F. Verheul, E. B. Ernste, R. F. Rombouts, M. J. De Reuver, M. Jansze, H. Snippe, and J. M. Willers. 1988. Measurement of the humoral immune response against *Streptococcus pneumoniae* type 3 capsular

polysaccharide and oligosaccharide containing antigens by ELISA and ELISPOT techniques. *J Immunol.Methods* **106**:101-107.

302. **Zollinger, W. D., J. Boslego, E. Moran, J. Garcia, C. Cruz, S. Ruiz, B. Brandt, M. Martinez, J. Arthur, P. Underwood, and et al.** 1991. Meningococcal serogroup B vaccine protection trial and follow-up studies in Chile. The Chilean National Committee for Meningococcal Disease. *NIPH. Ann.* **14**:211-212.

303. **Zollinger, W. D., J. E. Boslego, C. E. Frasc, and L. O. Froholm.** 1984. Safety of vaccines containing meningococcal group B polysaccharide. *Lancet* **2**:166.

304. **Zollinger, W. D. and R. E. Mandrell.** 1983. Importance of complement source in bactericidal activity of human antibody and murine monoclonal antibody to meningococcal group B polysaccharide. *Infect.Immun.* **40**:257-264.

305. **Zollinger, W. D., R. E. Mandrell, J. M. Griffiss, P. Altieri, and S. Berman.** 1979. Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. *J Clin.Invest.* **63**:836-848.

306. **Zollinger, W. D. and E. Moran.** 1991. Meningococcal vaccines, past, present and future. *Trans.R.Soc.Trop.Med Hyg.* **85 Suppl 1**:37-43.

307. **Zollinger, W. D., C. L. Pennington, and M. S. Artenstein.** 1974. Human antibody response to three meningococcal outer membrane antigens: comparison by specific hemagglutination assays. *Infect.Immun.* **10**:975-984.

308. **Zorgani, A. A., J. Stewart, C. C. Blackwell, R. A. Elton, and D. M. Weir.** 1992. Secretor status and humoral immune responses to *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol.Infect.* **109**:445-452.

309. **Zuber, C., P. M. Lackie, and J. Roth.** 1993. Polysialic acid in adult brain: its presence on the neural cell adhesion molecule and Na<sup>+</sup> channels, p.299-311. In J. Roth, U. Rutishauser, and F.A. Troy (ed.), *Polysialic acid. From microbes to man*, Birkhäuser Verlag, Basel.