

Polisacárido del meningococo grupo C conjugado con diferentes cantidades de vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B

Maribel Cuello, ✉ Osmir Cabrera, Judith del Campo, Oliver Pérez

Departamento de Inmunología, Instituto "Finlay"
Ave. 27 No. 19805, AP 16017, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: ocabrera@finlay.edu.cu

RESUMEN

Se evaluó la inmunogenicidad a varios conjugados polisacáridos-proteínas en ratones. En el proceso de obtención de los conjugados del polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (PsC) se utilizaron diferentes cantidades de vesículas de membrana externa (VME) de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (3, 6 y 9 mg) mediante la reacción con carbodiimida. Se inocularon tres dosis de 10 µg de PsC en ratones Balb/c, por vía intraperitoneal. Los animales fueron sangrados antes de cada inoculación y 7 y 14 días después de la última dosis. Por medio de un ELISA indirecto se evaluaron los niveles de IgM, IgG y las subclases IgG1 e IgG2a anti-PsC, en los sueros de estos animales. Los resultados mostraron títulos elevados de IgG anti-PsC con predominio de la subclase IgG1, y no se observaron diferencias significativas entre los conjugados. La utilización de las VME en los conjugados favoreció la presencia de IgG2a anti-PsC en los sueros de los animales inmunizados. Se concluye que 3 mg de VME son suficientes para obtener conjugados de PsC inmunogénicos.

Palabras claves: *Neisseria meningitidis*, inmunogenicidad, vacunas conjugadas

Biotecnología Aplicada 2005;22:117-121

INVESTIGACIÓN

ABSTRACT

Polysaccharide of meningococcal group C conjugated to different quantities of outer membrane vesicle from *Neisseria meningitidis* serogroup B. In this study the immunogenicity to several meningococcal polysaccharide-protein conjugates was evaluated in mice. The purified polysaccharide from *N. meningitidis* serogroup C (PsC) was linked to different quantities of outer membrane vesicle from *N. meningitidis* serogroup B (OMV) (3, 6 and 9 mg) as carrier protein, via carbodiimide-mediated reaction. The conjugates were inoculated in Balb/c mice in three doses of 10 µg of PsC by intraperitoneal route and the sera of animals were taken, before each dose and 7 and 14 days after last immunization. The IgM, IgG and IgG subclass antibodies (IgG1 and IgG2a) anti-PsC was evaluated in sera of mice by an indirect ELISA. As result we obtained that in all mice that were inoculated with conjugates was induced high titers of IgG anti-PsC with IgG1 as isotype predominant. No significant differences between conjugates obtaining with different quantity of OMV were observed. The use OMV as a carrier induced also IgG2a anti-PsC antibodies. We conclude that 3 mg of OMV are sufficient to obtain immunogenic conjugates of PsC.

Key words: *Neisseria meningitidis*, immunogenicity, conjugates vaccines

Introducción

Los polisacáridos (Ps) constituyen el principal factor de virulencia de muchas bacterias patógenas como la *Neisseria meningitidis*, que causan enfermedades invasivas. Los anticuerpos generados contra el polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (PsC) son bactericidas y protectivos [1, 2]. La forma endémica de la meningitis meningocócica es causada por los serogrupos A, B, C, Y y W135; mientras la forma epidémica se debe a los serogrupos A, B y C [3]. Para prevenir esta enfermedad se han desarrollado vacunas antimeningocócicas monovalentes, bivalentes o tetravalentes contra los serogrupos A, C, Y y W135. Estas son inmunogénicas y seguras en adultos y en niños mayores de 2 años, lo que no ocurre en niños por debajo de esa edad en los que estas vacunas suelen ser pobremente inmunogénicas. Esto se debe a la timoindpendencia (TI) de los Ps [4, 5].

La conjugación resuelve la timoindpendencia de los Ps, al convertir en antígenos timodependientes (TD) [6, 7]. Este cambio de comportamiento inmunológico se debe a que la proteína presenta epitopos que son reconocidos por las células T, lo cual permite la coo-

peración con las células B, que reconocen la porción polisacáridica, para que haya cambio de isotipos de inmunoglobulinas, principalmente de IgM a IgG o IgA.

Como los Ps conjugados se comportan como antígenos TD, la inducción de la respuesta inmune se favorece en niños pequeños, que son la población de mayor riesgo de contraer estas enfermedades [8, 9]. Algunos estudios inmunológicos en seres humanos con vacunas conjugadas muestran lo planteado; entre ellos, con las vacunas de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), que se están comercializando actualmente, compuestas por la unión covalente del Ps de este microorganismo con diferentes proteínas de origen bacteriano, así como en estudios más recientes de vacunas conjugadas contra la *Neisseria meningitidis* serogrupo C [10-12].

Para la obtención de una vacuna conjugada deben tenerse en cuenta los factores siguientes: el peso molecular del Ps, la longitud de las moléculas del sacárido, la proteína portadora, la unión entre estas dos moléculas y el grado de sustitución de las proteínas con el sacárido. La relación de la potencia del conjugado con la arquitectura molecular de este se hace difícil, debido

1. Gotschlich EC, Lui TY, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 1969;129:1307-26.

2. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. III. Preparations and immunochemical properties of group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. *J Exp Med* 1969;129:1327-48.

3. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal Disease. *N Engl J Med* 2001;344(18):1378-85.

4. Ruggenberg JU, Pollard AJ. Meningococcal vaccines (Review). *Paediatric Drugs* 2004;6(4):251-66.

5. Poolman JT. Development of a meningococcal vaccine. *Infect Agents Dis* 1995;4:13-28.

a las diferencias entre estos factores durante los procesos de obtención de los conjugados [13].

La conjugación de los Ps con las proteínas se ha trabajado con distintos métodos de obtención, diferentes proteínas y con la utilización de brazos espaciadores o no. No obstante, se ha investigado poco las cantidades de proteínas que se deben utilizar en el proceso de su obtención. Por ello, en este trabajo se estudia cómo varía la respuesta inmune generada contra el polisacárido C en ratones Balb/c cuando se utilizan diferentes cantidades de proteínas en la obtención de conjugados, a partir de la unión covalente del Ps de *N. meningitidis* serogrupo C a vesículas de membrana externa (VME) del *N. meningitidis* serogrupo B.

Materiales y métodos

Reactivos

Carbodiimida del 1-ethyl-3 (3-dimetilaminopropilo) (EDAC) (Sigma) (Sigma); membranas de ultrafiltración (YM10) (Amicon Inc.); IgG anti-ratón obtenida en carnero y marcada con fosfatasa alcalina y poli-L-lisina (Sigma); conjugado biotina-avidina anti-IgG1 o anti-IgG2a (Pharmigen); Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences); suero de conejo anti-PsC (Murex Biotech Ltd.) y PsC (lot. 2012C con Kav=0.2) y VME (lot. 2006B) (Instituto "Finlay", Cuba).

Métodos analíticos

Las determinaciones de proteínas y ácido siálico se realizaron según los estudios de Lowry y cols. y los de Svennerholm, respectivamente [14, 15]. La concentración de los grupos amino se determinó por el método del dialdehído o-ftálico (OPA), con glicina como patrón [16]. La inmunodifusión doble se realizó en agarosa al 0.8%-NaCl 0.15 mol/L-azida sódica 0.01% con el empleo de un suero de conejo anti-PsC [17].

Síntesis de los conjugados de polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C a vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B

Activación del PsC

Por medio de una hidrólisis básica, se activó el PsC para la generación de grupos amino a partir de los grupos acetamido presentes en el carbono 5. El PsC (5 mg/mL) en NaOH 0.5 M se colocó en un horno a 90 °C durante 3.5 h. Posteriormente, la solución se enfrió a temperatura ambiente (TA) y se ajustó el pH a 7.0 con la adición de HCl 0.1 mol/L. La solución resultante se aplicó a una columna de cromatografía de 1.6 x 90 cm con Sepharose CL-4B como matriz de exclusión molecular y NaCl 0.15 mol/L como disolución amortiguadora de elución. Las fracciones correspondientes a 0.4 de Kav se pasaron por filtros de 0.2 µm y se tomaron muestras para los controles del contenido de PsC y la antigenicidad por inmunodifusión doble [17].

Preparación de los conjugados de polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C a vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B

Los conjugados se prepararon uniendo los grupos amino generados en el PsC y los grupos carboxilo presentes en la VME. Para la activación de los grupos

carboxilo se utilizó la EDAC. La VME (3, 6 y 9 mg) fue tratada con EDAC 0.1 mol/L y después se adicionaron 4 mg de PsC previamente activado. La reacción se mantuvo a 4 °C con un pH de 5 a 5.6 durante 4 h. La mezcla de la reacción fue ultrafiltrada contra disolución amortiguadora de fosfato salino (PBS) con pH de 7.2. Se tomaron muestras para las determinaciones de PsC, proteína, antigenicidad por inmunodifusión doble e inmunogenicidad.

Inmunización

Se utilizaron grupos de 8 ratones (hembras) Balb/c, cuyo peso al inicio de los experimentos era entre 18 y 22 g, a los cuales se les administraron tres dosis de los diferentes conjugados preparados de VME y PsC, por vía intraperitoneal, a los 0, 14 y 28 días (10 µg de PsC/dosis) [18]. También se trabajó con tres grupos control: PsC nativo, VME y PBS como placebo. Los sueros se obtuvieron antes de cada inoculación y a los 35 y 42 días después de la primera dosis, se colectaron por separado y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Determinación de anticuerpos IgG e IgM

Se determinó la inmunogenicidad de los conjugados mediante la técnica ELISA, para lo cual se utilizaron placas de poliestireno (Costar). Como antígeno de recubrimiento se empleó el PsC de partida, el cual se fijó después de un tratamiento previo con poli-L-lisina (3 µg/mL) (Sigma). Las muestras se diluyeron 1:400 para la determinación de anticuerpos IgG, ó 1:200 para la determinación de los anticuerpos IgM en PBS-Tween 20. Se usó un conjugado anti-IgG de ratón fosfatasa (Sigma) y anti-IgM de ratón peroxidasa (Sigma). Como sustratos se utilizaron *o*-fenilendiamina (Merck) ó *p*-nitrofenilfosfato, respectivamente, y las absorbancias de las muestras se midieron en un equipo Titertek Multiskan a una densidad óptica (DO) de 405 nm para fosfatasa y 492 nm para peroxidasa.

Determinación de subclases de IgG anti-PsC de *Neisseria meningitidis*

La determinación de las subclases de IgG se realizaron mediante un ELISA [19] de amplificación biotinestreptavidina en placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc). Luego de un tratamiento con 100 µL/pocillo de poli-L-lisina (3 µg/mL) durante 30 min a TA en cámara húmeda, y el primer lavado con PBS-Tween 20 (solución de lavado), se recubrió con una solución de PsC (5 µg/mL) y se mantuvo en incubación durante toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C. Posteriormente, se lavó la placa y se bloqueó con PBS-BSA-Tween 20. Las muestras se aplicaron en una dilución 1:100 en PBS-BSA-Tween 20 y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavó la placa con la solución de lavado y se añadieron los conjugados anti-IgG1 o anti-IgG2a biotinilado (Sigma). Luego de un paso de lavado similar a los anteriores, se añadió streptavidina (Sigma). Como sustrato se utilizó la *o*-fenilendiamina (Sigma) y se detuvo la reacción con H₂SO₄ 2.5 mol/L. La absorbancia se midió a 492 nm en el lector de ELISA.

Análisis estadístico

La estadística de los resultados se realizó a partir de un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de

6. Richmond P, Borrow R, Miller E, Clark S, Sadler F, Fox AJ, Begg NT *et al.* Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and primes for memory. *J Infect Dis* 1999;179:569-72.

7. Jodar L, Griffiths E, Feavers I. Scientific challenges for the quality control and production of group C meningococcal conjugates vaccines. *Vaccine* 2004; 22:1047-53.

8. Trotter CL, Ramsay ME, Kaczmarski EB. Meningococcal serogroup C vaccination in England and Wales: coverage and initial impact of the campaign. *Commun Dis Public Health* 2002;5:220-5.

9. Bröker M. Development of new vaccines against meningococcal disease. *Azneim. Forsch. Drug Res* 2003;53(12): 805-13.

10. Madore DV, Johnson-Kraines CL, Rothstein EP, Smith DH. Kinetics of antibody response to *Haemophilus influenzae* type b vaccines. *Pennridge Pediatric Associates. Curr Med Res Opin* 1999;15(2):105-12.

11. Bramley JC, Hall T, Finn A, Buttery RB, Elliman D, Lockhart S *et al.* Safety and immunogenicity of three lots of meningococcal serogroup C vaccine administered at 2, 3 and 4 months of age. *Vaccine* 2001;19:2924-31.

12. Finn A. Bacterial polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Br Med Bull* 2004;70:1-14.

13. Cuello M, Cabrera O, Pérez O, Del Campo J, Balboa J, Soto CR *et al.* Influencia del tamaño del espaciador utilizado en la unión covalente de un polisacárido a una proteína sobre la respuesta inmune. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* 2002; 33(2):71-5.

14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol Chem* 1951; 193:265-75.

15. Svennerholm L. Quantitative estimation of Sialic II. A colorimetric resorcinol hydrochloric acid method. *Biochem Biophys Acta* 1957;24:609.

16. Church FC, Porter DH, Calignani GL, and Swaisgood HE. An *o*-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Anal Biochem* 1986;146(2):343-8.

17. Ouchterlony, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* 1958;5:1.

18. Fukasawa LO, Gorla MCO, Schenkman RPF, Garcia LR, Carneiro SM, Raw I, *et al.* *Neisseria meningitidis* serogroup C polysaccharide and serogroup B outer membrane vesicle conjugate as a bivalent meningococcus vaccine candidate. *Vaccine* 1999;17:2951-8.

19. Ruthus S, Driedijk PC, Weening RS, Out TA. ELISA procedures for the measurement of IgG subclass antibodies to bacterial antigens. *J Immunol Methods* 1991;140(1):67.

significación del 5% para comparar las medias entre los grupos. Cuando se encontraron diferencias, se usaron las pruebas de comparaciones múltiples de menor diferencia significativa (LSD). Se empleó el paquete estadístico (versión 2.1) y el programa Microsoft Excel para la determinación de las medias y de la desviación estándar de los valores obtenidos en el ELISA.

Resultados

Composición de los conjugados

El PsC activado tuvo un promedio de 1.55 μmol de grupos amino por miligramo de ácido siálico y el rendimiento de los conjugados en todos los experimentos ($n=5$) fue similar para cada grupo. Su contenido de PsC libre promedio fue de 26% (Tabla 1). Los tres conjugados y el polisacárido no conjugado fueron reconocidos por los anticuerpos anti-PsC presentes en el suero de conejo anti-PsC comercial, lo cual formó un halo de precipitación en la inmunodifusión doble (Figura 1). Sin embargo, el polisacárido activado no fue reconocido por estos anticuerpos, debido a la ausencia de los grupos O-acetilo como consecuencia del proceso de activación de este.

Determinación de anticuerpos IgM anti-PsC

En la figura 2 se aprecia cómo el polisacárido no conjugado indujo un aumento de los títulos de IgM después de la tercera dosis (día 42). No obstante, los conjugados obtenidos con las diferentes cantidades de la proteína portadora alcanzaron valores superiores en la determinación de este anticuerpo. El análisis estadístico de los resultados mostró que no existen diferencias significativas entre los títulos obtenidos para los sueros de los animales inoculados con los conjugados de 3 y 9 mg de VME. Sin embargo, se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) cuando se compararon los valores del conjugado de 3 mg con el de 6 mg de VME y el de 6 mg con el de 9 mg de VME.

Determinación de anticuerpos IgG anti-PsC

En la figura 3 se exponen los resultados de la determinación de anticuerpos IgG anti-PsC en los sueros de los ratones en estudio. Los sueros de animales inoculados con los conjugados mostraron títulos de anticuerpos IgG anti-PsC elevados y significativos ($p<0.05$), mientras que en los sueros de los inoculados con el PsC sin conjugar no se encontraron títulos de esta clase de anticuerpo. Todos los animales mostraron respuesta secundaria ante la inmunización de una segunda y tercera dosis de los conjugados, y entre los conjugados no se observaron diferencias significativas en los títulos de IgG determinados en los sueros de los ratones.

Determinación de las subclases de IgG generadas en los ratones inmunizados

La figura 4 muestra cómo los tres conjugados indujeron títulos elevados y significativos de ambas subclases de anticuerpos IgG (IgG1, IgG2a) 14 días después de la última dosis (día 42), mientras que los sueros de ratones inoculados con el PsC sin conjugar no indujeron estas subclases. En los sueros de los ratones inoculados con los conjugados no se observaron

Tabla 1. Caracterización de los conjugados de polisacáridos de *N. meningitidis* serogrupo C a VME de *N. meningitidis* serogrupo B.

Conjugado (n=5)	PsC (mg/mL)	VME (mg/mL)	PsC / VME Ratio	PsC libre (%)
PsC-VME (3 mg)	1.76	1.3	1.35	32
PsC-VME (6 mg)	1.82	2.9	0.63	26
PsC-VME (9 mg)	1.85	4.3	0.43	20

PsC: Polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C

VME: vesícula de membrana externa de *N. meningitidis* serogrupo B.

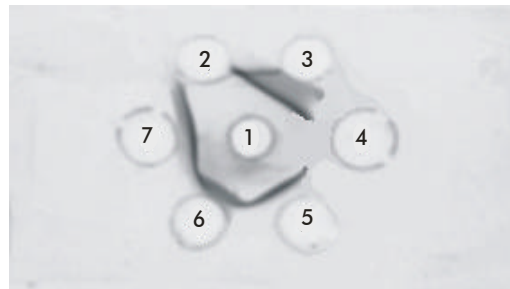


Figura 1. Inmunodifusión doble del polisacárido de *N. meningitidis* C (PsC) para determinar la identidad del polisacárido en los conjugados. 1: suero de conejo anti-PsC (Murex Biotech Ltd.); 2: PBS; 3: PsC sin conjugar; 4: PsC activado por hidrólisis básica; 5: PsC-VME (3 mg); 6: PsC-VME (6 mg) y 7: PsC-VME (9 mg).

diferencias significativas en la determinación de IgG1. Sin embargo, en la determinación de IgG2a se apreciaron diferencias significativas ($p<0.05$) en los sueros de los animales inoculados con los conjugados en los que se utilizaron 3 mg y 9 mg de VME, mientras que no fueron significativas entre 3 y 6 mg de VME ni entre 6 y 9 mg de VME.

Discusión

Muchos reportes describen la contribución de las vacunas conjugadas con diferentes acoplamientos químicos entre polisacáridos y proteínas [20], así como

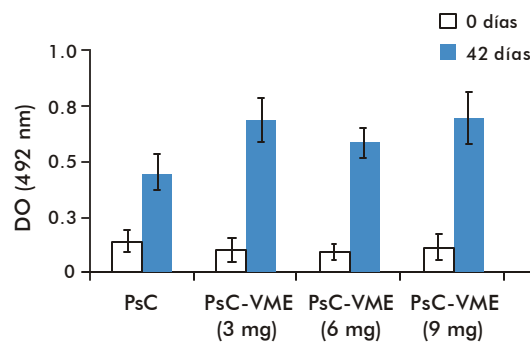


Figura 2. Determinación de anticuerpos IgM anti-PsC en sueros de ratones inoculados con los conjugados en estudio y en el PsC sin conjugar con tres dosis a los 0, 14 y 28 días, por vía intraperitoneal y extracciones en los días 0 y 42. Para ello, los sueros fueron diluidos 1:200. PsC: polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C; PsC-VME (3 mg): conjugado de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C a 3 mg de VME de *N. meningitidis* serogrupo B; PsC-VME (6 mg): conjugado de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C a 6 mg de VME de *N. meningitidis* serogrupo B; PsC-VME (9 mg): conjugado de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C a 9 mg de VME de *N. meningitidis* serogrupo B.

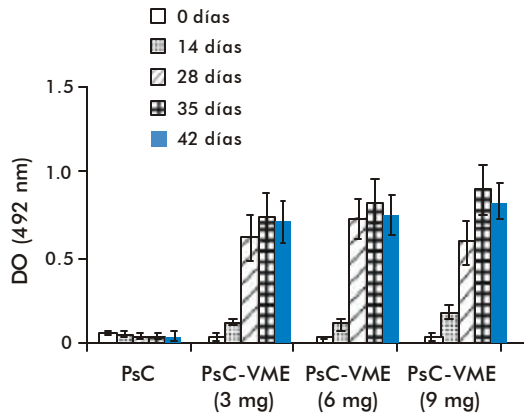


Figura 3. Determinación de anticuerpos IgG anti-PsC en sueros de ratones inoculados (tres dosis a los 0, 14 y 28 días, por vía intraperitoneal y extracciones en los días 0, 14, 28, 35 y 42) con los conjugados en estudio y el PsC sin conjugar. Los sueros se diluyeron 1:400 para la determinación. PsC: polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C; PsC-VME (3 mg): conjugado de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C a 3 mg de VME de *N. meningitidis* serogrupo B; PsC-VME (6 mg): conjugado de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C a 6 mg de VME de *N. meningitidis* serogrupo B; PsC-VME (9 mg): conjugado de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C a 9 mg de VME de *N. meningitidis* serogrupo B.

las diferencias en cuanto a la obtención de estas, las cuales varían desde las proteínas portadoras utilizadas en la conjugación [21], las concentraciones de los antígenos, el uso de brazos espaciadores o no [13], las tallas moleculares [4] y las formas de activar a los sacáridos. Esto último condujo a distintos grados de sustitución [22]. Debido a estas diferencias durante el proceso de obtención de las vacunas, se hace difícil cualquier comparación entre ellas.

Uno de los componentes más variados de las vacunas conjugadas son las proteínas portadoras. Las VME de *N. meningitidis* serogrupo B se han utilizado en este tipo de vacunas [18] y también en vacunas contra *N. meningitidis* serogrupo B, las que han sido más evaluadas en seres humanos. Entre las vacunas de VME disponibles en el mercado están la vacuna cubana VA-MENGOC-BC® (recomendada para la vacunación contra los serogrupos B y C de *N. meningitidis*) [23], la vacuna NIPH *N. meningitidis* B, de Noruega, la VME purificada de la cepa 44/76 [24] y la hexavalente PorA-VME, de Holanda [25].

Las VME se han empleado con éxito como proteínas portadoras en una vacuna contra *H. influenzae* tipo b [26] y en vacunas conjugadas contra *Pneumococcus* [27], ambas comercializadas por Merck & Co. Recientemente, Fukasawa y cols. [18] conjugaron el PsC a VME con carbodiimida acoplada al ácido adípico de la hidrazida (ADH) como brazo espaciador. Ellos estudiaron la respuesta inmune en ratones C3H/Hepas y encontraron que estos conjugados generaban títulos elevados de IgG con un gran incremento (21 veces) a los 42 días de la primera inoculación, con el empleo de tres dosis de conjugados a los 0, 14 y 28 días.

Nuestros resultados corroboran los de Fukasawa y cols. [18] de que las VME son buenas proteínas portadoras para vacunas conjugadas y además evidencian que no se requieren más de 3 mg para obtener conjugados con resultados inmunogénicos elevados.

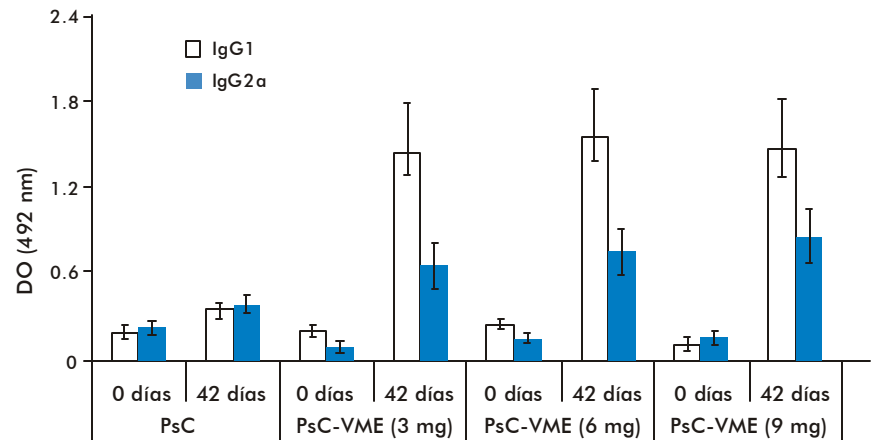


Figura 4. Determinación de subclases de anticuerpos IgG (IgG1 e IgG2a) anti-PsC en sueros de ratones Balb/c inoculados (tres dosis a los 0, 14 y 28 días, por vía intraperitoneal y extracciones en los días 0 y 42) con los conjugados en estudio y el PsC sin conjugar. PsC: polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C; PsC-VME (3 mg): conjugado de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C a 3 mg de VME de *N. meningitidis* serogrupo B; PsC-VME (6 mg): conjugado de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C a 6 mg de VME de *N. meningitidis* serogrupo B; PsC-VME (9 mg): conjugado de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C a 9 mg de VME de *N. meningitidis* serogrupo B.

Otros conjugados de PsC, obtenidos por aminación reductiva [28-30], se han utilizado en estudios previos en ratones Balb/c. En estos análisis se observó que los conjugados, comparados con el PsC no conjugado, mostraron un cambio de isotipos de IgM e IgG3 en el PsC nativo a IgG e IgG1 en los conjugados.

García-Ojeda y cols. [31] utilizaron conjugados PsC-TT que inocularon a ratones Balb/c. De este trabajo concluyeron que el empleo de una forma TD del PsC, la cual se logra al conjugar el PsC, comparado con la forma TI, provoca un cambio de isotipo. Los anticuerpos anti-PsC son, sobre todo, de isotipos IgM e IgG3, mientras que los conjugados PsC-TT indujeron fundamentalmente IgG1.

En este estudio se demuestra que el PsC se conjugó a diferentes cantidades de VME y que se indujeron títulos de anticuerpos IgG superiores a los inducidos por el PsC nativo en los tres casos estudiados. Se expone también que cuando el PsC se unió de manera covalente a las VME hubo un incremento de la respuesta inmune, efecto que no se observó en el PsC no conjugado.

Al igual que en los artículos publicados por otros autores [28-31], los resultados de esta investigación demuestran que ni los anticuerpos IgG ni las subclases evaluadas se producen solo por el PsC y que la IgG y la IgG1 son los isotipos predominantes en los sueros de ratones inoculados con los diferentes conjugados, con títulos elevados en los tres casos. También muestran los niveles significativos de IgG2a generados por todos los conjugados.

Teniendo en cuenta estos resultados y los de otros autores se concluye que en los tres conjugados se logró un cambio en la timodependencia del PsC que pasa de TI a TD, ya que la relación IgG e IgM aumenta para los antígenos TD, y los valores de anticuerpos IgG1 son la subclase predominante, después de la segunda inmunización.

Conclusiones

Por medio de la conjugación de diferentes cantidades de VME a PsC se obtuvieron conjugados altamente

20. Pawlowski A, Svenson SB. A new simple method for producing antigenic fragments of bacterial polysaccharides for the preparation of conjugate vaccines. *FEMS Microbiol Lett* 1999;174:255-63.

21. Rüggeberg J, Heat P. Safety and efficacy of meningococcal group C conjugate vaccines. *Expert Opin. Drug Saf* 2003;2(1):7-19.

22. Shaffer DE, Toll B, Schuman RF, Nelson BL, Mond JJ, Lees A. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides. *Vaccine* 2000;18(3):1273-81.

23. Sierra GVG, Campa HC, Valcarcel NM, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casa nueva GVC *et al.* Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination. Results in Cuba. *NIPH ANNALS* 1991;14(2):195-207.

24. Frediksen JH, Rosenqvist E, Wedege E, Bryn K, Bjune G, Froholm LO *et al.* Production, characterization and control of MenB-vaccine Folkehelse. An outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. *NIPH Ann* 1991; 14:67-80.

25. Peeters CCAM, Rumke HC, Sundermann LC, Van der Voort EMR, Meulenbelt J, Schuller M *et al.* Phase I trial with a hexavalent PorA containing meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 1996;14(10):1009-15.

26. Peeters CCAM, Tenbergen-Meekes AM, Poolman JT, Beurret M, Zegers BJM, Rijkers GT. A comparative study of the immunogenicity of pneumococcal type 4 polysaccharide and oligosaccharide Tetanus toxoid conjugates in adult mice. *J Immunol* 1991;146:4308-14.

27. Woodrow GL, Kaper JB, Cobon GS, editors. Klein D, Ellis RW. Conjugate vaccine against *Streptococcus pneumoniae*. In: *New generation vaccines*. New York: Marcel Dekker;1998.p.503-25.

inmunogénicos en ratones Balb/c. Los sueros de estos animales mostraron un predominio de IgG y de la subclase IgG1 anti-PsC como isotipo, aunque también indujeron IgG2a. Además, se apreció un cambio en la

timoindependencia del PsC a la timodependencia. De esta forma se demostró que 3 mg de esta proteína es suficiente para obtener conjugados de PsC-VME inmunogénicos.

28. García-Ojeda PA, Hardy S, Kozlowski S, Stein KE, Feavers IM. Surface Plasmon Resonance Analysis of antipolysaccharide antibody specificity: Responses to meningococcal group C conjugate vaccines and bacteria. *Infect Immun* 2004;72(6):3451-60.

29. Rubinstein LJ, García-Ojeda PA, Michon F, Jennings HJ, Stein KE. Murine Immune Responses to *Neisseria meningitidis* group C

Capsular Polysaccharide and a Thymus-Dependent Toxoid Conjugate. *Infect Immun* 1998;66(11):5450-6.

30. Reddin KM, Crowley-Luke A, Clark SO, Vincent PJ, Gorringer AR, Hudson MJ, Robinson A. Bordetella pertussis fimbriae are effective carrier proteins in *Neisseria meningitidis* serogroup C conjugate vaccines. *FEMS Immun and Med Microbiol* 2001;31:153-62.

31. García-Ojeda PA, Monser, ME, Rubinstein LJ, Jennings HJ, Stein KE. Murine Immune Response to *Neisseria meningitidis* Group C Capsular Polysaccharide: Analysis of Monoclonal Antibodies Generated in Response to a Thymus-Independent Antigen and a Thymus-Dependent Toxoid Conjugate Vaccine. *Infection and Immunity* 2000;68:239-46.

Recibido en febrero de 2005. Aprobado en marzo de 2005.