

Análisis por *immunoblot* de anticuerpos contra proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* grupo B durante el proceso de fraccionamiento de plasma hiperinmune obtenido por inmunización con VA-MENGOC-BC®

Tatiana Acosta Sánchez, Julio A. Balboa González, Armando F. Cádiz Lahens, Ileana Martínez Cabrera, Iovagna Bravo Verde, Juan C. Martínez Rodríguez, Eric A. Estrada González

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

Se evaluó la actividad específica contra las proteínas de membrana externa del meningococo B por los métodos de ELISA y Western Blot, en tres lotes de plasma de individuos inmunizados con VA-MENGOC-BC®, durante el proceso de fraccionamiento con etanol en frío para la producción de la Inmunoglobulina Humana Antimeningocócica. En la mezcla de plasma inicial se encontró respuesta contra las proteínas de 140 kDa, 105 kDa, 80 kDa y 70 kDa, contra las proteínas de membrana externa de clase 1, 3, 4 y 5, contra una proteína con masa molecular menor que 25 kDa y contra otra entre 42 y 70 kDa, así como un incremento de la actividad específica total contra las proteínas de membrana externa sin pérdida de especificidad por ninguna de las proteínas citadas durante el proceso.

Palabras claves: Anticuerpos, immunoblot, *Neisseria meningitidis*, vacunas, fraccionamiento etanólico.

Introducción

Por el hecho de que los voluntarios inmunizados con la vacuna cubana de proteínas de membrana externa del meningococo y polisacárido C, VA-MENGOC-BC® desarrollaran altos títulos de anticuerpos bactericidas antimeningocócicos, surgió la idea de producir una inmunoglobulina hiperinmune a partir de los plasmas de estos individuos. Posteriormente, con la demostración de la efectividad de este preparado vacunal (1), y la inmunización de grupos poblacionales grandes en todo el país, fue posible desarrollar el proyecto de obtención de inmunoglobulina hiperinmune contra el meningococo B a una mayor escala. Esta inmunoglobulina hiperinmune tiene título antimeningocócico igual o mayor que seis veces el título medio de la mezcla de donaciones que le dio origen, se administra por vía intravenosa diluida en solución salina fisiológica, y se indica para el tratamiento de pacientes con enfermedad meningocócica de los serogrupos B en todas sus formas clínicas, pues ha sido demostrada la efectividad del producto al incrementar la sobrevida de niños con meningitis y/o meningococemia aún con un alto número de factores de pronóstico desfavorables (2,3). Actualmente se trabaja en una nueva formulación del producto, según la tecnología desarrollada en nuestro país, para la producción de inmunoglobulina intravenosa estándar (4), que permite una mayor estabilidad de la IgG y ofrece una mayor seguridad debido al pH ácido. El presente trabajo se inserta en dicho proyecto y tiene como objetivo caracterizar la especificidad de los anticuerpos anti-proteínas de membrana externa del meningococo B a lo largo del proceso productivo, haciendo uso, por una parte de la posibilidad que brinda el análisis inmunoenzimático conocido por ELISA para la cuantificación de inmuno-

globulinas específicas, y por otra de las ventajas del *immunoblot* al combinar la alta resolución de una electroforesis en geles de poliacrilamida empleando SDS (PAGE-SDS) con la especificidad de la detección inmunoquímica.

Materiales y Métodos

1. Muestras

Se estudiaron tres procesos de fraccionamiento alcohólico (4), realizados a partir de plasma de donantes sanos inmunizados con VA-MENGOC-BC®, y agrupados de acuerdo con la actividad específica determinada mediante un método inmunoenzimático (UMELISA-Meningo, SUMA). El plasma fue clasificado como lote de mediana actividad o lote I, lote de alta actividad o lote II, y lote de plasma no titulado y con menor actividad o lote III. Se tomaron como muestras de cada proceso: mezcla de plasma inicial, fracción II e inmunoglobulinas purificadas liofilizadas a granel.

2. Preparación de las muestras

Las muestras de mezcla de plasmas de cada lote fueron clarificadas y esterilizadas por filtración con filtros de membrana de porosidad 0,45 μm y 0,2 μm . De cada lote de fracción II se tomaron 5 g y se disolvieron en solución de dextrosa 5% pH 4 (p/2v), se realizó ultrafiltración en AMICON con membranas YM 100 pasando cinco volúmenes de dextrosa 5% (p/v) pH4 para eliminar el etanol. Se determinó el porcentaje de alcohol teórico, y se comprobó que estaba en el rango correcto para que no interfiera en las posteriores pruebas, se ajustó a pH4 con HCl 1M, se determinó la concentración de proteína por el método de Biuret (5) y se ajustó al 5% para finalmente

clarificar y filtrar en condiciones estériles de la misma manera que las mezclas de plasmas. Se pesaron 2,8 g de cada muestra de inmunoglobulina purificada liofilizada a granel y 2,5 g de dextrosa para ser disueltos en 50 mL de agua destilada de manera que la solución final quedara al 5% (p/v) de inmunoglobulina purificada y al 5% (p/v) de dextrosa, teniendo en cuenta el grado de humedad de la inmunoglobulina liofilizada; se ajustó el pH a 4 empleando HCl 1M, se determinó la concentración de proteínas por el método de Biuret (5) y se efectuó la clarificación y filtración estéril de las muestras por filtración.

3. Determinación de actividad específica anti-meningococo B

Las determinaciones se realizaron por un método inmunoenzimático del tipo ELISA, según la técnica descrita para la cuantificación de IgG humana contra las proteínas de VA-MENGOC-BC® (6). Se calculó la concentración de anticuerpos empleando un programa elaborado por el CDC de Atlanta, EE UU, y se determinó la actividad específica dividiendo la concentración de anticuerpos expresada en U/mL entre la concentración de proteínas expresada en mg/mL.

4. Evaluación electroforética del Extracto de Antígenos (STA) y la proteína vacunal

Las muestras de STA, proteína vacunal (PV), brindadas por la planta III del Instituto Finlay fueron evaluadas por electroforesis en gel de poli(acrilamida) con SDS, empleando un sistema discontinuo (6). En el gel se colocó un patrón de peso molecular (Pharmacia 17-0446-01 low molecular weight markers) con las siguientes proteínas (pesos moleculares): Fosforilasa

carbónica (94000 Da), Albúmina (67000 Da), Ovalbúmina (43000 Da), Anhidrasa carbónica (30000 Da), Inhibidor de tripsina (20100 Da) y Lactalbúmina (14400 Da). Por densitometría se calcularon los pesos moleculares aproximados de las bandas teñidas con Azul Coomassie, mediante el programa computacional Gel, (versión 2/18/1989 JTR) .

5. Determinación de la especificidad de los anticuerpos contra las proteínas de membrana externa del meningococo B

La determinación se realizó mediante Western Blot (W.B) (6). Se utilizaron como antígenos STA y proteína vacunal corridos en geles de poli(acrilamida) (12,5%), que fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa con poros de 0,45 μ m en un sistema de transferencia húmedo LKB, las muestras y controles diluidos 1/200 en solución de leche descremada al 1,5% p/v en SSTF 0,015 M pH 2 Tween 20 0,1% se incubaron durante toda la noche a temperatura de 4 °C, con agitación suave. El conjugado anti IgG humana-peroxidasa fue diluido 1/1000 en el mismo diluyente de las muestras y se incubó a 37 °C durante 1 hora, después de realizar los lavados necesarios, se añadió el sustrato peróxido de hidrógeno - diamino benzidina (DAB), preparado justo antes de su empleo. Al cabo de 15 a 20 minutos se detuvo la reacción eliminando la solución y lavando con abundante agua destilada .

Resultados

Las actividades específicas contra las proteínas de membrana externa del meningococo B determinadas por el método de ELISA para cada muestra analizada se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividad específica anti-OMP (Ud/mg proteínas) de mezcla de plasmas, fracción II e inmunoglobulina purificada de donantes inmunizados con VA-MENGOC-BC®

Muestras	Lote I	Lote II	Lote III
Mezcla de Plasma	105,06	165,55	*
Fracción II	362,56	929,64	448,93
Inmunoglobulina purificada liofilizada	655,74	753,35	614,32

* Muestra no disponible.

En la evaluación electroforética realizada al STA (Figura 1), se apreciaron bandas cuyo peso molecular calculado, con el empleo de la densitometría y el programa computacional, fueron 82,05 Kda; 71,60 Kda; 42,26 Kda; 38,12 Kda; 34,76 Kda; 29,56 KDa y 25,45 Kda.

Estas bandas son vistas también en la electroforesis realizada a la proteína vacunal (Figura 2). En las corridas se vieron bandas correspondientes a proteínas de alto peso molecular (APM), pero no se calculó su peso debido a que el rango del patrón empleado (14,4 kDa a 94 kDa) no lo permitió.

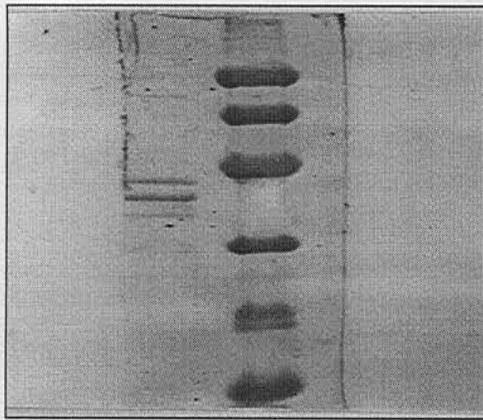


Figura 1. Evaluación electroforética del STA

- Pociillo 1. Patrón de peso molecular (97 kD - 14.4 kD)
- Pociillo 2. STA

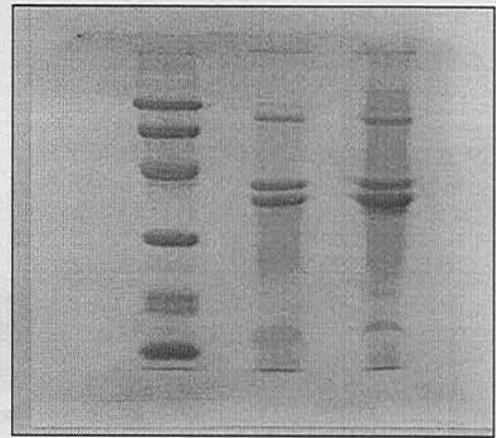


Figura 2. Evaluación electroforética de la proteína vacunal

- Pociillo 1. Patrón de peso molecular. (97 kD - 14.4 kD)
- Pociillo 2 y 3. Proteína vacunal

Se verificó la correcta transferencia con la tinción de un fragmento de gel y de una tira de nitrocelulosa después de realizada la transferencia, al observarse bandas en la nitrocelulosa y no en el gel. Como resultado del Western Blot (Figuras 3 y 4), para ambos antígenos se encontró reconocimiento a 10 bandas en cada muestra evaluada,

con la excepción de la mezcla de plasmas de lote I, donde no se apreciaron algunas bandas. La intensidad de las bandas, a las cuales se encontró respuesta, fue incrementándose de la mezcla de plasma a las inmunoglobulinas purificadas y liofilizadas resuspendidas en solución de dextrosa 5% pH 4.

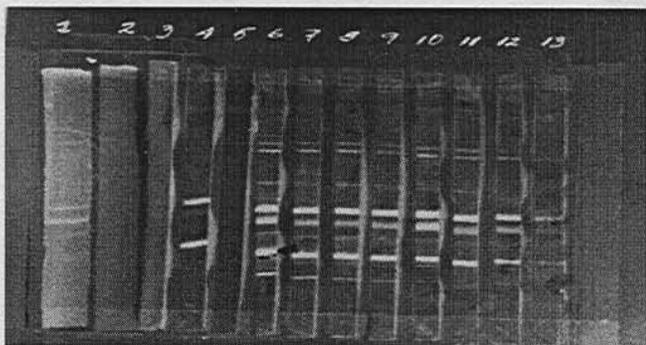


Figura 3. Western Blot empleando STA como mezcla antigénica

1. PAGE-SDS del STA
2. Gel después de la transferencia
3. Membrana de nitrocelulosa después de la transferencia
4. Control positivo
5. Control negativo
6. Inmunoglobulinas liofilizadas. Lote II
7. Inmunoglobulinas liofilizadas. Lote I
8. Inmunoglobulinas liofilizadas. Lote III
9. Fracción II. Lote III
10. Fracción II. Lote II
11. Fracción II. Lote I
12. Mezcla de plasmas. Lote II
13. Mezcla de plasmas. Lote I

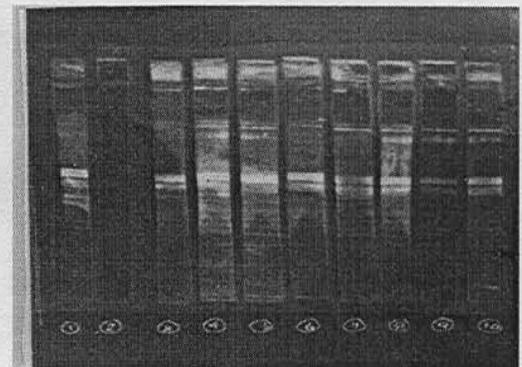


Figura 4. Western Blot empleando proteína vacunal como mezcla antigénica

1. Control positivo
2. Control negativo
3. Inmunoglobulinas liofilizadas. Lote I
4. Inmunoglobulinas liofilizadas. Lote II
5. Inmunoglobulinas liofilizadas. Lote III
6. Fracción II. Lote I
7. Fracción II. Lote III
8. Fracción II. Lote II
9. Mezcla de plasmas. Lote I
10. Mezcla de plasmas. Lote II

En la caracterización de la actividad específica contra OMP de las muestras, cuando se utilizó STA, las bandas más intensas fueron las correspondientes a los pesos moleculares de 42,26 Kda; 34,76 Kda; 29,56 KDa y

25,45 KDa, mientras que aparecían bandas muy intensas en la posición correspondiente a las proteínas de 42,26 Kda; 34,76 KDa y 71,60 K Da al emplear como mezcla

antigénica la proteína vacunal. Las intensidades del resto de las bandas no pudieron diferenciarse.

Discusión

El aumento de la actividad específica a lo largo del proceso de fraccionamiento alcohólico en los lotes I y III, está en correspondencia con el objetivo de purificación de inmunoglobulinas que persigue el método; sin embargo, las concentraciones calculadas correspondientes al proceso de fraccionamiento del lote B entran en contradicción con lo anteriormente planteado, esto puede ocurrir como consecuencia de la formación de un número grande de agregados en el paso de la liofilización, hecho que influye negativamente en la actividad específica de dichas moléculas.

La cepa utilizada para la obtención de STA y PV, (385/83 B:4.P1.15) ha sido clasificada con anticuerpos monoclonales (7) y se identificaron proteínas de 80 y 70 KDa, así como las proteínas de clase 1, (P1.15) de clase 3 (serotipo 4) y las de clase 5 incluyendo 5c. La identificación de las proteínas presentes en el PAGE-SDS correspondiente a STA y PV se hizo atendiendo al peso molecular calculado y lo reportado tanto en la literatura (7,10), como por los productores. De esta forma se determinó que las bandas corresponden a: P1 (banda de 42,26 kDa), P3 (banda de 38,12 kDa), P4 (banda de 34,76 kDa), P5 (banda de 29,56 kDa), P5c (banda de 25,45), 70 kDa (banda de 71,60 kDa) y 80 kDa (banda de 82,05 kDa).

El método de obtención de STA es mundialmente utilizado para la preparación de antígeno para W.B. (8,9), y el W.B. es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para la evaluación y caracterización de la inmunogenicidad de diferentes preparados vacunales en animales y humanos (10,11). Recientemente Rosenqvist y colaboradores lo emplearon para evaluar la respuesta de anticuerpos específicos contra las proteínas de membrana externa después de dosis de la vacuna Noruega contra meningococo B (12).

Según nuestra evaluación electroforética, se encontraron anticuerpos en el análisis por W.B. contra proteínas que pudieran identificarse como P1, P3, P4, P5, P5c, 70kDa y 80kDa, y de acuerdo con la caracterización del productor la respuesta observada contra proteínas de alto peso molecular pudiera asignarse a APM I (140 kDa) y APM II (105 KDa), la banda que se observa por encima de P1 y por debajo de 70kDa pudiera corresponder a una proteína de 55 kDa contra la cual informaron encontrar respuesta, Estrada y colaboradores (13), quienes también refieren respuesta contra una proteína de 22 kDa con la que pudiera identificarse otra banda encontrada por

nosotros, o a la proteína de 64 kDa referida por Guillén y colaboradores (14).

En el W.B. la intensidad de las bandas depende tanto de la concentración de antígeno unido a la membrana de nitrocelulosa, como de la concentración de anticuerpos presentes en la solución. Se utilizó una sola concentración de antígeno como resultado de una única transferencia, y la misma dilución para todas las muestras por lo cual las diferencias en cuanto a número de banda del lote I se deben a una menor concentración de anticuerpos específicos en la mezcla de plasma correspondientes a ese lote. La fuerte intensidad apreciada en la banda correspondiente a P1, tanto en el caso que se usó STA como PV, mayor que la que se obtuvo para P3, aún cuando ambas se encuentran en concentraciones aproximadamente iguales en la vacuna antimeningocócica cubana, está de acuerdo con lo reportado por Rosenqvist en 1995 (12) en un estudio similar empleando como antiseros plasma de individuos inmunizados con dosis de la vacuna noruega antimeningocócica. La mayor intensidad encontrada contra las bandas que pertenecen a P5 cuando se empleó STA, se explica porque estas proteínas se encuentran en mayor proporción en esta mezcla antigénica proteica que en PV; no obstante encontramos presencia de IgG contra P5 en las muestra evaluadas a pesar de estar en poca cantidad en la vacuna cubana (15), requiriéndose por tanto poca cantidad de estas proteínas para inducir una fuerte respuesta de anticuerpos contra ellas; esta alta inmunogenicidad encontrada está en concordancia con lo descrito por Tavares y colaboradores en 1995 (16), estudiando el posible uso de proteínas de clase 5 como componente de una vacuna contra el meningococo B y C.

De la misma manera se explica la mayor intensidad observada en las bandas correspondientes a la proteína de 70 kDa cuando se empleó PV como antígeno debido a que esta proteína se encuentra en mayor proporción en la proteína vacunal que en el STA. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Stojiljkovic y colaboradores en 1995 (17). Así corroboramos la importancia del empleo como antígeno de STA cuando buscamos identificar los anticuerpos contra P5 y de PV para la identificación de los anticuerpos contra la proteína de 70 kDa.

En estudios realizados con anticuerpos monoclonales contra las proteínas de clase 1 y 3 se ha podido confirmar la alta actividad bactericida que poseen los anticuerpos contra dichas proteínas (18) y que estos anticuerpos son los máximos responsables de actividad opsonisante de los anticuerpos anti-OMP, siendo también los máximos responsables de la opsonofagocitosis durante el curso de la enfermedad meningocócica (19), y que éstos protegen contra la infección in vivo (20). Se ha reportado que los anticuerpos contra 70 K muestran

actividad bactericida comparable con los niveles encontrados en los anticuerpos anti-P1 (21). Las proteínas de clase 5 son capaces de inducir anticuerpos específicos bactericidas para aquellas cepas que las contengan (22). Por estas razones consideramos importante la presencia de estos anticuerpos en el producto analizado por la implicación que tiene en su efectividad. En un estudio de la inmunogenicidad de los componentes de la vacuna, donde se determinaron anticuerpos específicos contra OMP por W.B y ELISA, empleando como antisueros plasmas de 10 individuos adultos inmunizados con VA-MENGOC-BC® y como antígeno STA, se reportó como generalidad una respuesta en adultos contra las proteínas de 80 kDa, P1, P3, P4, 22 kDa. Esos resultados han sido corroborados en el presente trabajo, pues se midió la respuesta inmune

en muestras de mezclas de plasmas de individuos de edades similares. El alto número de plasmas que integraron los lotes permite una mejor aproximación al conocimiento de la respuesta inducida por VA-MENGOC-BC® en una población de adultos.

El aumento de la intensidad de las bandas a lo largo del proceso y el hecho de que estas no desaparecen, nos indica que el proceso de fraccionamiento alcohólico mediante el cual se obtiene la inmunoglobulina no implica pérdida de actividad específica contra un tipo determinado de OMP, sino que permite obtener un producto que contiene anticuerpos con las actividades específicas contra cada proteínas que fueron inducidas por VA-MENGOC-BC® de manera cada vez más concentrada.

Referencias

1. Sierra VG, Campa C, García L, Sotolongo F, Izquierdo L. Efficacy evaluation of the Cuban vaccine VA-MENGOC-BC® against disease caused by serogroup B *Neisseria meningitidis*. En: de Gruyter W, Co. eds. *Neisseriae* 1990. Berlin; 1991: 129-34.
2. Galguera MA, et al. Uso de gamma globulina hiperinmune específica en el tratamiento de la enfermedad meningocócica B. *Rev. Cub. Hematol. Inmunol. Hemoter.* 1990; 3: 377-85.
3. Galguera MA, Sierra G, Martínez E, et. al. Uso terapéutico de gamma globulina hiperinmune específica en la enfermedad meningocócica del niño. *Rev. Cub. Pediatría.* 1991; 63: 55-62.
4. Cádiz A. Modificaciones tecnológicas al método de Cohn. I [Ponencia premiada]. En: Forum Nacional de Energía, 1984. La Habana; 1984.
5. Comité Estatal de Normalización. Sangre y sus Derivados. Inmunoglobulina Humana Antimeningocócica. Especificaciones de calidad. La Habana, enero 1991.
6. Sotolongo Padrón F. *Neisseria meningitidis*. Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. 4rd ed. Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay; 1995.
7. Griffiths E, Sierra G, Holst J. Quality control of the Cuban and Norwegian serogroup B vaccines used in the Iceland study. En: Evans JS, et. al, eds. *Neisseria* 94. Proceedings of the Ninth International Pathogenic *Neisseria* Conference, Winchester, England, Sep 26-30, 1994. England: SCC; 1994:437.
8. Frasch CE, Gotschlich EC. An outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* group B responsible for serotype specificity. *J. Exp. Med.* 1974; 140: 87-102.
9. Wedege E, Froholm LO. Human antibody response to a group B serotype 2a meningococcal vaccine determined by immunoblotting. *Infect Immun.* 1986; 51: 571-8.
10. Wedege E, Bryn K, Froholm LO. Restoration of antibody binding to blotted meningococcal outer membrane proteins using various detergents. *J. Immunol. Methods.* 1988; 113:51-9.
11. Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. *J. Immunol. Met.* 1989;119:153-87.
12. Rosenqvist E, Hoiby EA, Wedege E, et. al. Human antibodies responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect Immun.* 1995; 63:4642-52.
13. Estrada EA. Optimización del Western Blot y aplicación en el estudio de la inmunogenicidad de las proteína de la vacuna VA-MENGOC-BC® [Trabajo de terminación de Residencia]. La Habana: Instituto Finlay; 1995.
14. Guillén G, González S, Nazabal C, Carmenate T, et. al. Monoclonal antibodies specific to a 64 kDa protein from *Neisseria meningitidis*. Proceedings of the Ninth International Pathogenic *Neisseria* Conference, Winchester, England, Sep 26-30, 1994. England: SCC; 1994:98-99.
15. Sierra G, Campa C, Varcacel M, et al. Vaccine against group B neisseria meningitidis protection trial and mass vaccination in Cuba. *NPIH Ann.* 1991; 14:387-396.
16. Tavares Sacchi C, Outeiro Gorla MC, Silva de Lemos AP, Cunto Branduleone MC. Considerations on the use of *Neisseria meningitidis* class 5 proteins as meningococcal BC vaccine components. *Vaccine.* 1995; 13:112-8.
17. Stojiljkovic I, et. al. The *meningitidis haemoglobin* receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol. Microbiol.* 1995; 15: 531-541.
18. Peeters C, Schuller M, Kersten G, et. al. Humoral immune responses to different forms of a meningococcal class 1 outer membrane protein. Proceedings of the Ninth International Pathogenic *Neisseria* Conference, Winchester, England, Sep 26-30, 1994. England: SCC; 1994: 84.

19. Gøttormsen H, Wetzler L, Solberg C. Serum opsonic induced during the course of meningococcal disease correlate with anti-outer membrane protein antibodies. Proceedings of the Ninth International Pathogenic *Neisseria* Conference, Winchester, England, Sep 26-30, 1994. England: SCC; 1994:54-55.
20. Saukkonen K, Leinonen M, Abdillahi H, Poolman JT. Comparative evaluation of potential components for group B meningococcal vaccine by passive protection in the infant rat and in vitro bactericidal assay. *Vaccine*. 1989; 7:325-8.
21. Pettersson A, et. al. Monoclonal antibodies against the 70-kilodalton iron-regulated protein of *Neisseria meningitidis* are bactericidal and strain specific. *Infect. Immunol.* 1990; 5:3036-4.
22. Poolman JT, Buchanan TM. Monoclonal antibodies against meningococcal outer membrane proteins. *Med. Trop.* 1983; 43: 139-42.

Immunoblot analysis of antibodies against outer membrane proteins of group B *Neisseria meningitidis* during the fractionating process of hyperimmune plasma attained by immunization with VA-MENGOC-BC®

Abstract

Specific activity against group B meningococcal outer membrane proteins (OMP) in three batches of plasma from donors vaccinated with VA-MENGOC-BC® was evaluated by ELISA and Western Blot in the course of cold ethanol fractionation process for manufacturing of Antimeningococcal Human Immunoglobulin. Response was found to 140 kDa, 105 kDa, 80 kDa, 70 kDa, and class 1, 3, 4, and 5 OMPs, to a protein below 25 kDa and to another protein between 42 and 70 kDa on the initial pool of plasma and an increase on the total specific activity against OMPs without loss of activity for any protein in the course of the process.

Key words: Antibodies, immunoblot, *Neisseria meningitidis*, vaccines, ethanol fractionation

Recibido: 21-1/97

Aprobado: 4-4/97