

SDS-PAGE y análisis densitométrico para determinar la concentración de lipopolisacáridos de *Neisseria meningitidis* serogrupos A, W₁₃₅ y X

Maribel Cuello,^{1*} Osmir Cabrera,¹ Yaimara Rodríguez,¹ Gro Thurheim,² Gunnstein Norheim,² Rubén Adonis Cabrera,¹ Maydelis Álvarez,¹ Maylín Álvarez,¹ Kirenia Blain,¹ Lisbeth Naess,² Einar Rosenqvist,² Luis García¹

¹ Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave 27, No 19805, La Lisa, AP 16017 cod 11600. La Habana, Cuba.

² Instituto Noruego para la Salud Pública.

email: mcuello@finlay.edu.cu

Desde hace varios años el Instituto Finlay, en colaboración con el Instituto Noruego para la Salud Pública, trabajan en un proyecto para la obtención de candidatos vacunales a partir de vesículas de membrana externa (VME) de *Neisseria meningitidis* serogrupos A, W₁₃₅ y X. Por ello es necesario establecer las especificaciones de calidad para el lipopolisacárido (LPS), principal causante de la pirogenicidad de estas vacunas. El objetivo de este reporte fue establecer las condiciones del SDS-PAGE como método de control de la calidad de las VME como ingrediente farmacéutico activo (IFA), provenientes de *N. meningitidis* serogrupos A, W₁₃₅ y X. Se determinaron los inmunotipos y las concentraciones de LPS contaminantes, para lo cual se utilizaron geles de SDS-PAGE al 15% y muestras de LPS de los diferentes serogrupos de *N. meningitidis*. Se realizó el revelado de los geles con tinción con plata específica para LPS y los resultados se analizaron en un densitómetro GS-800 (Bio-Rad), controlado por el programa "Quantity One". Se obtuvieron curvas patrones para cada LPS que determinaron la concentración de LPS en estas muestras y se comprobó la utilidad del método al cuantificar la concentración de LPS en muestras de IFAs de VME de los diferentes serogrupos de *N. meningitidis*. Así se estableció la metodología para determinar la concentración de LPS de *N. meningitidis* serogrupos A, X y W₁₃₅ en muestras de IFA de VME con el SDS-PAGE y se confirmaron las especificaciones de calidad establecidas para este parámetro.

Palabras clave: LPS, *Neisseria meningitidis*, SDS-PAGE, VME, vacunas.

Introducción

Los brotes de enfermedad meningocócica constituyen un serio problema de salud en el mundo, por afectar fundamentalmente a niños y adolescentes, provocando la muerte a uno de cada siete afectados (1). *N. meningitidis* es una bacteria gramnegativa, clasificada en 13 serogrupos, según la estructura química del polisacárido capsular (PsC) y en serotipos y subtipos, según la presencia de proteínas en su membrana externa, principal factor de virulencia. Se acepta que los anticuerpos dirigidos contra el PsC y las proteínas de membrana externa pueden producir protección contra la enfermedad meningocócica (2).

Se estima que cada año, excluyendo epidemias, ocurren en todo el mundo aproximadamente 1,2 millones de casos de enfermedad meningocócica invasiva, con alrededor de 135.000 muertes. En la mayoría de los países la tasa anual varía entre 1 a 5 por cada 100.000 habitantes (3), pero esto puede incrementarse a más de 1.000 casos durante las epidemias causadas por el serogrupo A en África (4).

La obtención y aplicación en Cuba a partir de 1989 de la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC® disminuyó la incidencia de la enfermedad meningocócica. Esta vacuna ha sido licenciada en varios países y se encuentra disponible

comercialmente (5). Además de esta vacuna, compuesta por vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* del serogrupo B y polisacárido del serogrupo C, existen otras compuestas por PsC contra otros serogrupos A, C, Y y W₁₃₅ o polisacáridos conjugados a proteínas (6).

No obstante, se reporta que los serogrupos A, B y C son responsables del 80-90% de los casos de enfermedad y los serogrupos Y, W₁₃₅ y X del resto de los casos, con una tendencia al aumento del serogrupo X en el cinturón africano (7).

El desarrollo acelerado de la ciencia y la técnica han conducido al incremento del nivel científico en la aplicación de los métodos de evaluación de las vacunas, así como los requerimientos regulatorios para su utilización.

La metodología analítica para el control de la calidad de los productos cuenta con: métodos colorimétricos tradicionales para la evaluación del contenido de los componentes, del preservio y de la pureza; con la electroforesis en gel de poliácridamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para la evaluación de la identidad; métodos microbiológicos para la esterilidad; con biológicos para la pirogenicidad y de ELISA y actividad bactericida para la potencia.

* Lic. en Química, Doctora en Ciencias Químicas e Investigadora Auxiliar.

Mediante un proyecto de colaboración entre el Instituto Noruego para la Salud Pública (NIPH) y el Instituto Finlay, Norheim y cols. (8) obtuvieron VME de los serogrupos A y W₁₃₅, lo que ha convertido en un candidato vacunal que se evaluará próximamente en un ensayo clínico Fase I. Por otra parte, se obtuvieron VME del serogrupo X (9), las cuales se evaluaron en animales. La obtención de estas nuevas VME permitió establecer las especificaciones de calidad del principio activo en todas las etapas y del producto final.

El LPS es uno de los contaminantes más importantes a tener en cuenta en las vacunas obtenidas a partir de antígenos bacterianos, ya que es el causante principal de la pirogenicidad de estas vacunas. Uno de los métodos más utilizados para cuantificar el LPS es el método descrito por Osborn (10) que cuantifica el ácido 3-keto-3-dioxiocetanoico (KDO) proveniente de la estructura de los LPS por medio de la formación de complejos coloreados. El KDO se encuentra en la región central del LPS y además de ser el componente más utilizado para la determinación de los LPS, es quien une a la región central y el antígeno O con el Lípido A.

En el caso específico del LPS de *N. meningitidis* serogrupo B es posible hacer su determinación por la medición de KDO, ya que el mismo representa el 5% de la molécula de este LPS, por lo que se estableció un factor 20 que se utiliza para calcular la concentración del LPS después de determinada la concentración de KDO. Sin embargo, para los LPS de los otros serogrupos de *N. meningitidis* no está descrita la relación entre las moléculas de KDO y la estructura del LPS, por lo que su cuantificación no es posible. Esto ha hecho necesario explorar otros métodos.

Existen otras técnicas dirigidas a la caracterización de moléculas y cuantificación de las mismas como son las técnicas de RMN y la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (11) que son capaces de dilucidar la estructura de cualquier molécula orgánica.

Debido al costo de estas técnicas y el complejo equipamiento que se necesita para moléculas tan complejas como proteínas y LPS, no son técnicas que se utilicen en el control rutinario de procesos, sino que por lo general se utilizan en la caracterización de productos ya terminados. No obstante, no hemos encontrado reportes en la literatura del uso del RMN para la cuantificación del LPS.

Otras técnicas que pudieran ser utilizadas en la cuantificación del LPS son las de determinación de azúcares totales que serían muy útiles para la determinación de polisacáridos bacterianos, ya que sus moléculas están conformadas por unidades repetitivas de determinados mono o disacáridos. En el caso del LPS, estas técnicas suelen ser muy inespecíficas debido a que presentan una estructura compleja y diversa en lo relacionado con las moléculas de monosacáridos presentes en la misma.

Por otra parte, el SDS-PAGE es una técnica muy utilizada en la determinación de la composición proteica de muestras biológicas, además de ser utilizada desde hace algunos años para determinar la presencia del LPS. Es una técnica que demostró ser altamente sensible; es más sencilla que las de RMN y cromatografía gaseosa acoplada a masas, no requiere de complejos equipamientos y por lo general en los laboratorios de control de proceso de vacunas se cuenta con el equipamiento y los reactivos necesarios para su utilización. El objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones necesarias para la determinación de la concentración del LPS de *N. meningitidis* serogrupos A, W₁₃₅ y X por el método de SDS-PAGE, usando tinción de plata específica para LPS.

Materiales y Métodos

Lipopolisacáridos: Se utilizaron LPS de *N. meningitidis* serogrupos A, B y X, cepas: MK499/03, CU385/83 y BuFa 2/97, respectivamente; purificados en el Instituto Finlay por el método descrito por Balboa y cols. (12). Los materiales de partida para la obtención de los LPS fueron los sobrenadantes de ultracentrifugación de los procesos de purificación de proteínas de estas cepas. En el momento de utilizar los LPS se encontraban secos y almacenados a 4 °C.

Muestras: Se analizaron muestras de IFA de VME de vacunas contra *N. meningitidis* serogrupos A y W₁₃₅ que se obtuvieron en la planta de producción y de IFA de VME de vacunas contra *N. meningitidis* serogrupo X.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry: Se realizó según lo reportado por Lowry y cols. (13) para la determinación de proteínas. Se evaluaron las muestras de las VME en estudio.

Determinación de la concentración de lipopolisacáridos: La concentración de LPS de *N. meningitidis* serogrupo B se determinó por el método del TBA modificado, según el PNO 12-056 (Instituto Finlay) para la cuantificación del KDO, descrito por Osborn (8).

Inmunotransferencia para determinar el inmunotipo de los LPS: Se siguió el protocolo descrito por Wedege (14). Para esta determinación se aplicaron 15 µL de muestra en los pocillos del SDS-PAGE al 15%, un gel separador y 5% del concentrador. Luego de la corrida electroforética (200 V y 400 mA), se efectuó la transferencia a un papel de nitrocelulosa Hybond -C extra (Bio-Rad, EE.UU), con porosidad de 0,45 µm durante 2 h a 25 °C, con una intensidad de corriente de 20 mA. Para ello se empleó una cámara húmeda "Mini-Trans-Blot" (Bio-Rad, EE.UU). Cada perfil electroforético transferido se visualizó mediante el empleo de rojo ponceau. Luego, se procedió a bloquear los sitios libres de la membrana con leche descremada al 5% en solución salina tamponada con fosfato (SSTF), 0,15 mol/L pH 7,2 durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió el anticuerpo monoclonal específico contra los

inmunotipos L11 y L3,7,9 (NIBSC, UK) diluidos 1:500 en SSTF con leche descremada al 1% y Tween 20 al 0,01% (v/v) (SIGMA) y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Se adicionó un anticuerpo específico contra la IgG de ratón conjugado a peroxidasa, diluido 1:1000 en SSTF y Tween 20 al 0,01% (v/v) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se realizó el revelado de las bandas mediante la adición de la solución de sustrato que contenía peróxido de hidrógeno (0,015%, v/v), diaminobencidina (0,5 mg/mL), dimetilsulfóxido 1%, (v/v) en tampón citrato (ácido cítrico 0,1 mol/L y Na₂HPO₄ 0,2 mol/L, pH 5). Entre cada paso de incubación se realizaron cinco lavados de 5 min cada uno, con SSTF y Tween 20 al 0,01% (v/v).

Determinación de la concentración de LPS por SDS-PAGE: Se realizó un SDS-PAGE según la metodología descrita por Laemmli (15), con un gel separador al 15% de poliacrilamida, gel concentrador al 5% de poliacrilamida, las condiciones de la corrida electroforética fueron (200 V y 400 mA) y la tinción con plata específica para LPS. La corrida se detuvo cuando el frente de la misma, definido por la coloración azul del bromo fenol, llegó al final del gel separador. Se utilizaron curvas de calibración específicas para la determinación de la concentración de cada LPS; en el caso del serogrupo B se utilizó un LPS de concentración conocida, determinada previamente por el método del TBA modificado (8). Las curvas utilizadas para los LPS de *N. meningitidis* serogrupos A y X se prepararon a partir de una solución de 1 mg/mL preparada a partir de la pesada de los respectivos LPS en balanza analítica. Todas las curvas preparadas contaron con cuatro puntos de concentraciones: 1, 2, 6 y 10 ng/μL. Las muestras de VME se aplicaron a 670 ng.

Tinción con plata específica para LPS: Se dejó toda la noche en solución de fijación (etanol 40% y ácido acético 5%, en H₂O destilada). Al día siguiente se colocó en una solución de oxidación (periyodato de sodio 14 mM, ácido acético 5%, etanol absoluto 40%) durante 5 min; después se realizaron tres lavados con agua destilada cada 15 min con agitación; seguidamente se le añadió la solución de tinción (28 mL de NaOH 0,1N, 2 mL de amoníaco, 1 g de AgNO₃ para un volumen final de 150 mL con H₂O destilada); se dejó en esa solución por 10 min, posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada cada 10 min y se colocó el gel en la solución de revelado (0,010 g de ácido cítrico, 100 μL de formaldehído al 37% , para un volumen final de 200 mL con H₂O destilada) hasta que las bandas alcanzaron la intensidad deseada. Se detuvo la reacción (etanol 40% y ácido acético al 5% en H₂O destilada). Se dejó en agua destilada hasta la captura de las bandas en un densitómetro.

Densitometría: Una vez concluida la corrida electroforética se realizó el análisis utilizando el densitómetro GS-800 (Bio-Rad controlado por el programa "Quantity One". Con este programa se determinó el factor de retardo (Fr) de los LPS en estudio y el peso molecular (PM). Para la determinación del PM de los LPS se utilizó, en el SDS-PAGE, un patrón de peso

molecular de bajo rango (Bio-Rad, USA , compuesto por: fosforilasa B de 97,4 KDa, albúmina sérica de 66,2 KDa, ovoalbúmina de 45 KDa, anhidrasa carbónica de 31 KDa, inhibidor de tripsina de 21,5 KDa y lisozima de 14,4 KDa. Además, usando curvas patrones de los diferentes LPS se determinó la concentración de las muestras.

Este parámetro se obtuvo del programa "Quantity One", el cual calcula la concentración de las muestras problemas en función de los estándares de concentración conocida, utilizando el método de regresión lineal. Para este cálculo el programa tiene en cuenta la concentración y el volumen ajustado de los estándares utilizados. El volumen ajustado es el resultante de la resta del volumen total (suma de las intensidades de los píxeles dentro del cuadrado seleccionado por el analista, multiplicado por el área en mm² de un pixel individual) y el volumen del fondo, respectivamente. También por medio de este programa se obtuvieron las rectas para cada una de las curvas de calibración con sus respectivas ecuaciones con los valores de pendiente, intercepto y coeficiente de determinación (R²).

Análisis estadístico: En todos los casos los PM, Fr y las curvas de calibración se analizaron mediante el paquete estadístico de Microsoft Excel 2007, tomando los valores de las repeticiones realizadas en cada experimento y se determinó el promedio y la desviación estándar (DE). La significación estadística de la varianza entre los diferentes grupos en estudio se realizó aplicando un análisis Anova de un factor, seguido del estudio de comparaciones múltiples de Tukey, mediante el programa GraphPad Prism 4 (CA, USA). Se consideró que había diferencia significativa para una $p < 0,05$. Los resultados mostrados son representativos de varios experimentos realizados en días diferentes. Los porcentajes de recuperación fueron calculados multiplicando por 100 el valor de concentración de LPS obtenido con las curvas de calibración en los SDS-PAGE y dividiendo entre el valor de concentración de partida determinado por KDO para el LPS de *N. meningitidis* serogrupo B y la masa de LPS por pesada en balanza analítica para el resto de los LPS en estudio.

Resultados y Discusión

Determinación del inmunotipo de los LPS de *N. meningitidis* serogrupos A, B y X: En la Inmunotransferencia realizada (Fig. 1) se observó que el LPS de la cepa MK499/03 de *N. meningitidis* serogrupo A fue reconocido por el anticuerpo monoclonal (AcM) anti L11, mientras que los LPS obtenidos de las cepas CU385/83 y BuFa 2/97 de *N. meningitidis* serogrupos B y X, respectivamente, dieron positivo con el AcM L3,7,9.

Se ha descrito que las diferentes variantes estructurales del LPS permiten la división en 12 inmunotipos, definidos por la reactividad frente a los anticuerpos monoclonales. La mayoría de los aislamientos de meningococo expresan, al mismo tiempo, más de un inmunotipo de LPS (11, 15, 16).

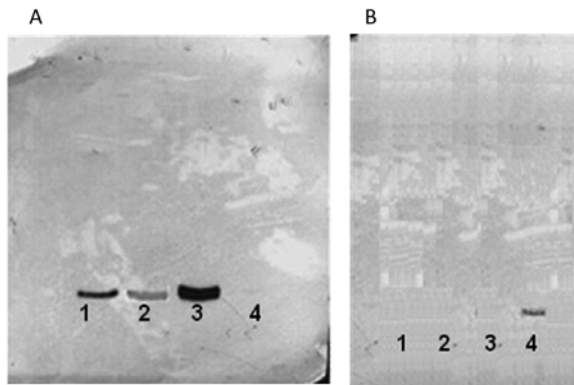


Fig. 1. Inmunotransferencia de los LPS de *N. meningitidis* A, B y X con anticuerpos monoclonales L3,7,9 (A) y L11 (B): 1: LPS de *N. meningitidis* serogrupo B; 2: LPS de *N. meningitidis* serogrupo X; 3: Estándar de LPS de *N. meningitidis* serogrupo B cepa MK88; 4: LPS de *N. meningitidis* serogrupo A.

Los inmunitipos L3, L7 y L9 son los más frecuentemente expresados por las cepas de los serogrupos B y C, seguido por los inmunitipos L2, L1 y L8 (16). Los inmunitipos L10 y L11 están generalmente asociados a cepas pertenecientes al serogrupo A (17), aunque se pueden encontrar cepas de *N. meningitidis* serogrupo A, cuyo LPS es de otros inmunitipos (12).

Estos resultados concuerdan con lo publicado por otros autores (8) que plantean que los LPS de las cepas de *N. meningitidis* de los serogrupos B, W₁₃₅ y X son predominantemente L3,7,9, mientras que el inmunitipo del LPS de cepas de *N. meningitidis* serogrupo A es predominantemente L11 (17).

Determinación del peso molecular y el factor de retardo de los LPS de *N. meningitidis* serogrupos A, B y X: En los resultados obtenidos (Tabla 1) se observaron PM muy parecidos alrededor de los 18 KDa para los LPS de los serogrupos B y X, mientras que para el LPS del serogrupo A se observó un PM menor que para el resto de los LPS estudiados. Estos resultados se observaron tanto en las muestras de LPS purificadas en el laboratorio, como en las IFA de VME estudiadas.

Tabla 1. Determinación del PM y Fr de LPS de *N. meningitidis* serogrupos A, B y X.

Muestra*	PM	Fr (± DE)
LPS A	16,982	0,782 (± 0,023)
LPS B	18,825	0,708 (± 0,036)
LPS X	18,697	0,710 (± 0,037)
LPS B Estándar	18,065	0,726 (± 0,045)

* Muestras de LPS de cepas de *N. meningitidis* serogrupos A, B y X; LPS B Estándar (LPS patrón) de *N. meningitidis* serogrupo B cepa MK88; PM: Peso molecular y Fr: Factor de retardo (media de 5 determinaciones de cada uno de los parámetros); DE: Desviación estándar de las mediciones realizadas.

Además, en la misma tabla se reportan los valores de Fr determinados para cada uno de los LPS en estudio, los que concuerdan con los valores de PM obtenidos de LPS, observándose valores similares para los LPS de los serogrupos B y X; mientras que para el LPS de A el Fr fue mayor.

Obtención de curvas de calibración para el SDS-PAGE con LPS de *N. meningitidis* serogrupos A, B y X: Se muestran geles obtenidos de SDS-PAGE (Fig. 2), donde se puede observar la aparición de una sola banda correspondiente a los LPS de *N. meningitidis* serogrupos A, B y X, lo cual era de esperarse debido a la pureza de los LPS empleados y a que el método de tinción fue específico para este.

Con los valores de concentración conocida de los puntos de las curvas y los valores de intensidad de la señal que se determinó por el programa de cómputo empleado, se obtuvo la curva de calibración y la ecuación de la recta correspondiente a cada LPS en estudio.

En la Tabla 2 se observan los valores obtenidos de las ecuaciones de las rectas como: la pendiente, el intercepto y

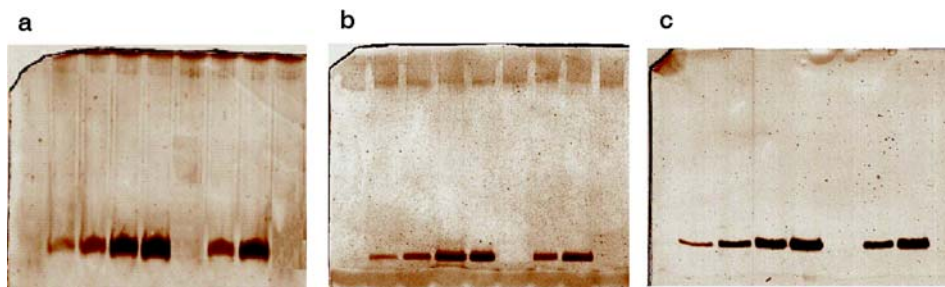


Fig. 2. Geles de electroforesis (SDS-PAGE al 15%) con tinción con plata específica para LPS. En los pocillos: 1, 2, 3 y 4 aparecen bandas correspondientes a la curva de LPS de los diferentes serogrupos de *N. meningitidis* (1, 2, 6 y 10 ng/ L) y en los pocillos 5 y 6 aparecen las bandas correspondientes a muestras de LPS de concentración conocida (2 y 6 ng/ L por pesada en balanza analítica); a: *N. meningitidis* serogrupo A; b: *N. meningitidis* serogrupo B (determinados por KDO); c: *N. meningitidis* serogrupo X.

Tabla 2. Establecimiento de las curvas de calibración para la determinación de las concentraciones de LPS de *N. meningitidis* de los serogrupos A, B y X.

Muestra	Pendiente (± DE)	Intercepto (± DE)	R ² (± DE)	Conc (ng/μL)	% de Recuperación
CP LPS A	0,992 (± 0,368)	0,976 (± 0,590)	0,993 (± 0,007)		
Curva Patrón					
LPS A Punto 2				2,14 (± 0,05)	107
Punto 6				6,25 (± 0,04)	104
CP LPS B	1,030 (± 0,214)	0,967 (± 0,062)	0,994 (± 0,008)		
Punto 2				2,12 (± 0,021)	106
Punto 6				6,20 (± 0,054)	103
CP LPS X	0,996 (± 0,292)	0,897 (± 0,433)	0,996 (± 0,014)		
Punto 2				2,17 (± 0,046)	108
Punto 6				6,15 (± 0,033)	102

CP: Curva patrón obtenida con muestras de concentración conocida de LPS de *N. meningitidis*; A, B, X, punto 2 y punto 6, muestras de concentración predeterminada (2 y 6 ng/μL respectivamente) de LPS de *N. meningitidis* de los diferentes serogrupos en estudio; DE: Desviación estándar; Conc: Concentraciones de LPS expresadas en ng/μL. La cantidad de réplicas de los experimentos utilizados en el análisis fueron 6 en todos los casos.

el R² para cada una de las curvas, así como los valores de concentraciones para cada muestra de LPS estudiado.

Como puede observarse, en todos los casos se obtuvieron valores cercanos a 1, para la pendiente y para el intercepto, mientras que para R² fueron superiores a 0,99.

Los valores de concentración que se obtuvieron con estas curvas de calibración en las muestras controles (puntos 2 y 6) mostraron valores coincidentes con los valores de concentraciones para esos puntos determinados por la técnica del KDO para el LPS de *N. meningitidis* serogrupo B y por las pesadas en balanza analítica para los otros dos LPS.

No se observó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de concentraciones obtenidos para la curva de calibración del LPS de *N. meningitidis* serogrupo B comparado con los obtenidos en las curvas de calibración de LPS de los serogrupos A y X. Esta coincidencia constituye una evidencia de la factibilidad de utilizar estas curvas para la determinación de las concentraciones de los LPS residuales en las muestras de VME. Otro resultado fue la sensibilidad de la técnica para todas las curvas estudiadas (1 ng/μL).

Utilización de la curva de calibración de LPS de *N. meningitidis* serogrupo B para la cuantificación de los LPS de *N. meningitidis* serogrupos A, W₁₃₅ y X: Para este estudio tuvimos en cuenta que si los cálculos de la concentración de las muestras problemas lo realiza un programa informático, que utiliza valores de concentración conocida y el volumen ajustado de los estándares utilizados, con estos valores se obtiene una curva de regresión con la ecuación de la recta y que con esa ecuación y el volumen ajustado de una muestra de concentración desconocida se puede determinar la concentración de la misma mediante un cálculo matemático. Por lo que puede ser posible determinar la concentración de cualquier LPS partiendo de una curva estándar obtenida con muestras de LPS de concentraciones

conocidas, independientemente de su movilidad electroforética.

El LPS de *N. meningitidis* serogrupo B de la cepa CU385/83 es el más estudiado en el Instituto Finlay. Se establece una metodología para su purificación a pequeña escala (12). Se modifica estructuralmente (18) y se utiliza, conjuntamente con otros antígenos en la obtención de nuevos adyuvantes, caracterizados desde el punto de vista inmunológico (19).

Por otra parte, los LPS de *N. meningitidis* serogrupos A, X y W₁₃₅ se comienzan a obtener y a estudiar, por lo que la posibilidad de utilizar el LPS de *N. meningitidis* serogrupo B para la cuantificación del LPS del resto de los serogrupos resultaría de gran utilidad para la caracterización de esas vacunas.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de concentraciones obtenidos por densitometría de geles de SDS-PAGE, usando al LPS de *N. meningitidis* serogrupo B como curva patrón y muestras de concentraciones conocidas por pesada de los LPS de *N. meningitidis* serogrupos A y X y del serogrupo B que se determinaron por el método del KDO.

Los valores de concentración que se obtuvieron para cada una de las muestras estudiadas (Tabla 3) son coincidentes con las determinaciones previas de concentración que se habían realizado a estas muestras, utilizando las curvas LPS específicas para cada serogrupo (Tabla 2). No se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de concentraciones obtenidos para el LPS de *N. meningitidis* serogrupo B y los obtenidos para las muestras de LPS de los serogrupos A y X.

Estos resultados constituyeron una evidencia de la factibilidad de utilizar el LPS de *N. meningitidis* serogrupo B de la cepa CU385/83 como curva patrón para determinar la concentración de los LPS contaminantes en las vacunas de VME.

Tabla 3. Determinación de las concentraciones de LPS de *N. meningitidis* de los serogrupos A, B y X con una curva patrón de LPS de *N. meningitidis* serogrupo B.

Muestra	Pendiente (± DE)	Intercepto (± DE)	R ² (± DE)	Conc (ng/μL)	% de Recuperación
CP B	1,160 (± 0,104)	0,947 (± 0,031)	0,990 (± 0,010)		
LPS A				6,263 (± 0,100)	104
LPS B				6,270 (± 0,070)	104
LPS X				6,17 (± 0,033)	102

CP: Curva patrón obtenida con muestra de concentración conocida de LPS de *N. meningitidis* serogrupo B; LPS A, B y X, muestras de 6 ng/μL de LPS de *N. meningitidis* de los serogrupos en estudio; DE: Desviación Estándar; Conc: Concentraciones de LPS determinadas con la curva patrón y expresadas en ng/μL. Todos los datos expuestos en la tabla son un promedio de 5 determinaciones.

Tabla 4. Determinación de las concentraciones de LPS contaminante en las VME de *N. meningitidis* de los serogrupos A, W₁₃₅ y X utilizando una curva patrón de LPS de *N. meningitidis* serogrupo B.

	Lotes de IFAs	Conc de LPS(ng/μL) (±DE)	Relación LPS / Proteína (μg/μg)
VME A	31ESVMA 103	3,1 (±0,16)	0,05
	31ESVMA 105	2,3 (±0,37)	0,03
	31ESVMA 106	3,5 (±0,27)	0,05
VME W ₁₃₅	31ESVMW 101	2,14 (±0,28)	0,03
	31ESVMW 102	5,24 (±1,37)	0,08
	31ESVMW 103	4,44 (±1,02)	0,07
VME X	DFVMEX 103	1,56 (±0,15)	0,02
	DFVMEX 104	3,05 (±0,15)	0,04

VME A, W₁₃₅ y X: Muestras de vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* de los serogrupos en estudio; DE: Desviación estándar; Conc de LPS: Concentraciones de LPS determinadas con la curva patrón de *N. meningitidis* serogrupo B y expresadas en ng/μL. Los datos expuestos en la tabla son un promedio de cinco determinaciones.

Determinación de la concentración de LPS presente en muestras de VME de *N. meningitidis* serogrupos A, X y W₁₃₅:

Se muestran los resultados de las concentraciones de LPS en los diferentes lotes estudiados (Tabla 4). En todos se cuantificó la concentración de LPS presente en las IFAs, observándose que todas estas IFAs contenían concentraciones de LPS por debajo del 10% con respecto a la cantidad total de proteínas, lo cual está en concordancia con las especificaciones de calidad establecidas en el Instituto Finlay para que estos productos puedan ser liberados.

A través de metodologías tradicionales para el control de la calidad se determina la pureza de las IFAs de VME del serogrupo B en términos del contenido de polisacárido, de ácidos nucleicos y de LPS, según técnicas colorimétricas establecidas para estos fines y teniendo en cuenta los criterios sugeridos por la OMS. No obstante, para la determinación de la concentración de LPS de *N. meningitidis* de otros serogrupos es necesario buscar métodos alternativos, ya que se desconoce la relación existente entre el KDO y el resto de la molécula del LPS. La metodología descrita en este trabajo es una posible solución para ese problema.

En este estudio se demostró la utilidad del método de SDS-PAGE con tinción de plata específico para LPS, para determinar la concentración del LPS contaminante en muestras de IFA de VME de *N. meningitidis* serogrupos A, X y W₁₃₅, y quedaron establecidas las condiciones necesarias para la cuantificación de los mismos por esta metodología. Sería conveniente realizar estudios posteriores y análisis regulatorios para verificar la posibilidad de utilizar el LPS de *N. meningitidis* serogrupo B como patrón en la determinación del resto de otros LPS por esta técnica.

Agradecimientos

Parte de los resultados del presente trabajo se obtuvieron gracias al financiamiento procedente del Consejo Científico Noruego (NRC) y su programa GLOBVAC (Proyecto No 192477). Igualmente, agradecemos a Reinaldo Acevedo por el suministro de muestras de VME provenientes *N. meningitidis* serogrupos X y a Julio Balboa por el suministro de los LPS provenientes de *N. meningitidis* serogrupo B, ambos trabajadores de la Dirección de Investigaciones del Instituto Finlay.

Referencias

- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal Disease. *N Engl J Med* 2001;344(18):1378-85.
- Cadoz M. Potential and limitations of polysaccharide vaccine in infancy. *Vaccine* 1998; 6:1391-6.
- Martínez AI, Domínguez D, Oviedo M, Minguell S, Jansa JM, Codina G, et al. Changes in the evolution of meningococcal disease, 2001-2008, Catalonia (Spain). *Vaccine* 2009;27:3496-8.
- WHO. Meningococcal disease, African meningitidis belt, epidemic season 2006. *Wkly Epidemiol Rec* 2006;81:119-20.
- Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, Biset G, García LG, Puentes G, et al. Method of producing *Neisseria meningitidis* B vaccine, and vaccine produced by method. US patent 5,597,572. 1997.
- Gill CJ, Baxter R, Anemona A, Ciavarró GL, M Dull P. Persistence of immune responses after a single dose of Novartis meningococcal serogroup A, C, W-135 and Y CRM-197 conjugate vaccine (Menveo®) or Menactra® among healthy adolescents. *Hum Vaccin* 2010; 6(11):881-7.
- Achtman M. Global epidemiology of meningococcal disease. In: Cartwright K, ed. Meningococcal disease. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 1995. p. 159-75.
- Norheim G, Tunheim G, Naess LM, Kristiansen PA, Caugant DA, Rosenqvist E. An outer membrane vesicle vaccine for prevention of serogroup A and W₁₃₅ meningococcal disease in the African meningitis Belt. *Scand. J Immunol* 2012;76:99-107.
- Acevedo R, Zayas C, Fernández S, Cedre B, Valmaseda T, Cuello M, et al. Vaccine potential of outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis* serogroup X. In: Abstract 18th International Pathogenic Neisseria Conference. Würzburg, Germany: University of Würzburg Printed. 2012. p. 245.
- Osborn MJ. Studies on the gram-negative cell in the lipopolysaccharides of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1963;50:499-506.
- Walters M, Milton D, Larsson L. Airborne environmental endotoxin: A cross-validation of sampling and analysis techniques. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:996-1005.
- Balboa JA, Estrada J, Nápoles LD, González H, Hernández D, Aranguren Y, et al. Purificación de lipopolisacárido de *Neisseria meningitidis* a partir de una fracción colateral del proceso de producción de VA-MENGOC-BC®. *VacciMonitor* 2008;17(1):17-26.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- Wedge E. Immunoblot analysis of sera from patients and vaccinees. In: Pollard A, Maiden MCJ, editors. Methods in molecular medicine, Meningococcal vaccines. Methods and Protocols. Totowa, NJ: Human Press; 2001. p. 275-88.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- Jennings MP, Srikhanta YN, Moxon ER, Kramer M, Poolman JT, Kuipers B, et al. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 1999;145:3013-21.
- Scholten RJ, Kuipers B, Valkenburg HA, Dankert J, Zollinger WD, Poolman JT. Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *J Med Microbiol* 1994;41:236-43.
- Cabrera O, Cuello M, Soto CR, Martínez ME, del Campo JM, Pérez O, et al. New method for obtaining conjugated vaccines. *Vaccine* 2006; 24(Supl. 2):76-8.
- Pérez O, Lastre M, Cabrera O, del Campo J, Bracho G, Cuello M, et al. New Vaccines Require Potent Adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scandinavian Journal of Immunology* 2007;66: 271-7.

SDS-PAGE and densitometric analysis to determine concentration of lipopolysaccharide from *Neisseria meningitidis* serogroups A, W₁₃₅ and X

Abstract

For several years, Finlay Institute, in collaboration with the "Norwegian Institute of Public Health", is working in a project to obtain a vaccinal candidate from outer membrane vesicles (OMV) of *N. meningitidis* serogroups A, W₁₃₅ and X. To establish the quality specifications dealing with lipopolysaccharides (LPS), main cause of the pyrogenicity of vaccines, is a necessity in this project. This work aims at establishing the conditions of SDS-PAGE to be used as a method for the quality control of the OMV as active pharmaceutical ingredient obtained from *N. meningitidis* serogroups A, W₁₃₅ and X. The immunotypes of LPS were determined in studies as well as their concentrations as contaminants of OMV. SDS-PAGE gels at 15% and LPS samples from different serogroups were used; these gels were tinted with silver, specific for LPS, and the results were analyzed in a densitometer GS-800 (Bio-Rad) controlled by the program "Quantity One". As a result, LPS profile curves for each serogroup were obtained and the concentration of residual LPS in the OMV of different serogroups of *N. meningitidis* was quantified. As conclusion, the methodology to determine the concentration of LPS from *N. meningitidis* serogroups A, X and W₁₃₅ in samples of OMV with SDS-PAGE was established, in addition the established quality specifications for this parameter were confirmed.

Key words: LPS, *Neisseria meningitidis*, SDS-PAGE, OMV, vaccines.
