

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Microbiología II**



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR  
DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A LA ACTIVIDAD  
BACTERICIDA DEL SUERO EN AISLADOS CLÍNICOS DE  
"NEISSERIA MENINGITIDIS" SEROGRUPO C**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**María José Uría González**

Bajo la dirección de los doctores  
Julio A. Vázquez Moreno  
Christong M. Tang

**Madrid, 2011**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR  
DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A LA ACTIVIDAD  
BACTERICIDA DEL SUERO EN AISLADOS CLÍNICOS  
DE *Neisseria meningitidis* SEROGRUPO C**

Memoria presentada por **María José Uría González**

Para optar al Grado de Doctor en Farmacia

Madrid, abril de 2010



**Julio A. Vázquez Moreno**, Doctor en Ciencias Biológicas, Jefe de Sección del Laboratorio de Referencia de Neisserias y Patógenos Especiales del Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III y,

**Christong M. Tang**, DTM&H FRCP PhD, Professor in Infectious Diseases, Honorary Consultant Physician. Department of Infectious Diseases. Centre for Molecular Microbiology and Infection. Imperial College London

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Identificación y caracterización molecular del mecanismo de resistencia a la actividad bactericida del suero en aislados clínicos de *Neisseria meningitidis* serogrupo C**”, que para optar al Grado de Doctor en Farmacia presenta María José Uría González, ha sido elaborada bajo nuestra dirección y cumple con los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa frente al Tribunal correspondiente.

Madrid, abril de 2010

Dr. J.A. Vázquez Moreno

Prof. Christoph Tang



La realización de este trabajo fue posible gracias a:

- La concesión de una Beca BEFI del Fondo de Investigación Sanitaria
- La concesión de una Beca SEIMC de Estancia en el Extranjero
- La concesión de un Contrato de Investigación financiado por Meningitis UK



**A mis padres**



**A mis hermanos, Conchi y Gabriel**

**A Güeli**



**A Jose**



## **ÍNDICE**

	<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>1</b>	<b><i>Neisseria meningitidis</i></b>	
1.1	Agente etiológico de la enfermedad meningocócica. Aspectos históricos .....	11
1.2	Posición taxonómica. Características microbiológicas .....	13
1.3	Determinantes antigénicos de virulencia .....	15
1.3.1	Cápsula .....	15
1.3.1.1	Composición química de los principales polisacáridos capsulares .....	15
1.3.1.2	Organización genética de la biosíntesis y del transporte del polisacárido capsular .....	16
1.3.1.3	Bases genéticas de la O-acetilación del polisacárido capsular .....	21
1.3.1.4	La cápsula como factor de virulencia. Mecanismos de regulación de la expresión de la cápsula .....	23
1.3.2	Lipopolisacárido .....	25
1.3.3	Pili .....	28
1.3.4	Proteínas de membrana externa .....	29
1.4	Clasificación y caracterización de <i>N. meningitidis</i> .....	33
1.4.1	Métodos serológicos de tipificación .....	33
1.4.2	Métodos moleculares de tipificación .....	34
<b>2</b>	<b>La infección meningocócica</b>	
2.1	Epidemiología .....	37
2.2	Patogénesis .....	41
2.2.1	Virulencia .....	41
2.2.2	Estado de portador .....	42
2.2.3	Mecanismos de transmisión e invasión .....	44
2.2.4	Susceptibilidad del huésped a la enfermedad meningocócica .....	46
2.3	Aspectos clínicos de la enfermedad meningocócica .....	47
2.4	Diagnóstico microbiológico .....	49
2.5	Tratamiento de la enfermedad meningocócica. Mecanismos de resistencia antibiótica .....	51

<b>3</b>	<b>Interacción entre <i>N. meningitidis</i> y el sistema del complemento</b>	
3.1	Aspectos generales del sistema del complemento .....	53
3.1.1	Vía clásica .....	54
3.1.2	Vía de las lectinas .....	55
3.1.3	Vía alternativa .....	55
3.1.4	Activación del componente C3b y formación del complejo de ataque a la membrana .....	56
3.1.5	Reguladores del sistema del complemento .....	57
3.2	Deficiencias en factores del complemento asociadas con la infección meningocócica .....	60
3.3	Mecanismos moleculares de resistencia al suero en <i>N. meningitidis</i> ....	61
<b>4</b>	<b>Profilaxis de la infección meningocócica</b>	
4.1	Quimioprofilaxis .....	66
4.2	Inmunoprofilaxis: vacunas frente a <i>N. meningitidis</i> .....	67
4.2.1	Parámetros subrogados de protección .....	68
4.2.2	Respuesta inmunológica frente a los antígenos meningocócicos .....	69
4.2.3	Vacunas frente a los serogrupos A, C, W135 e Y .....	71
4.2.3.1	Vacunas de polisacárido capsular .....	71
4.2.3.2	Vacunas conjugadas de polisacárido capsular .....	73
4.2.4	Vacunas frente a serogrupo B .....	75
4.2.4.1	Vacunas de polisacárido capsular .....	75
4.2.4.2	Vacunas constituidas por vesículas de membrana externa .....	75
4.2.4.3	Vacunas basadas en proteínas minoritarias de membrana y en otras especies de <i>Neisseria</i> .....	77
4.2.4.4	Vacunología inversa .....	78
	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>81</b>
	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>87</b>
<b>1</b>	<b>Material de estudio</b>	
1.1	Cepas .....	89
1.1.1	Origen y características de las cepas de <i>N. meningitidis</i> seleccionadas para la identificación de aislados resistentes a la actividad bactericida del suero .....	89
1.1.2	Origen y características de las cepas de meningococo asociadas a fallos vacunales .....	89
1.1.3	Condiciones de cultivo y conservación .....	93
1.2	Sueros .....	93

1.2.1	Obtención de sueros de individuos vacunados .....	93
1.2.2	Obtención de sueros de ratón .....	93
<b>2</b>	<b>Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas</b>	
2.1	Determinación del serogrupo .....	95
2.2	Determinación del serotipo y serosubtipo .....	95
2.3	Caracterización genética mediante MLST .....	97
2.4	Identificación de la variante ET-15 dentro del complejo clonal ST-11 CC .....	101
<b>3</b>	<b>Ensayo de actividad de anticuerpos bactericidas del suero</b>	102
<b>4</b>	<b>Ensayo de actividad del suero utilizando fuente de complemento humano</b>	104
<b>5</b>	<b>Western-blot</b>	
5.1	Preparación de los extractos celulares .....	105
5.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) .....	105
5.3	Tinción de los geles de SDS-PAGE .....	106
5.4	Transferencia a membranas .....	107
5.5	Incubación con los anticuerpos .....	107
5.6	Detección de los antígenos analizados .....	108
<b>6</b>	<b>Citometría de flujo: <i>Fluorescence Actived Cell Sorting</i> (FACS)</b>	
6.1	Preparación de las bacterias .....	109
6.2	Incubación con los anticuerpos .....	109
6.3	Detección .....	111
<b>7</b>	<b>Métodos moleculares</b>	
7.1	Aislamiento de ADN cromosómico y plasmídico .....	112
7.2	Reacción en cadena de la polimerasa .....	113
7.2.1	Amplificación del gen <i>oatC</i> .....	114
7.2.2	Amplificación del operón capsular .....	115
7.2.3	Amplificación de la región intergénica entre los genes <i>siaA</i> y <i>ctrA</i> .....	119
7.2.4	Amplificación de la secuencia de inserción IS1301.....	120
7.3	Electroforesis en geles de agarosa y purificación del ADN .....	122
7.4	Secuenciación .....	123

7.5	Aislamiento y purificación de ARN .....	123
7.6	Reacción de transcripción inversa .....	124
7.7	PCR cuantitativa a tiempo real .....	125
7.8	Obtención de las cepas mutantes en los genes <i>oatC</i> , <i>Ist</i> y <i>siaD</i> .....	127
7.8.1	Obtención de los mutantes en <i>oatC</i> .....	127
7.8.1.1	Inactivación del gen <i>oatC</i> . Construcción del vector PMJ1 .....	127
7.8.1.2	Transformación en <i>N. meningitidis</i> .....	130
7.8.2	Obtención de los mutantes en <i>Ist</i> .....	130
7.8.3	Obtención de los mutantes en <i>siaD</i> .....	130
7.9	Transferencia del fenotipo resistente .....	132
7.10	Transferencia de la región intergénica .....	132
7.10.1	Transformación en el aislado R3 .....	133
7.10.2	Transformación en el aislado S3 .....	133
<b>8</b>	<b>Purificación del polisacárido capsular para el análisis mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)</b>	134
<b>9</b>	<b>Microscopía electrónica</b>	135
	<b>RESULTADOS .....</b>	137
<b>1</b>	<b>Identificación de aislados clínicos de <i>N. meningitidis</i> serogrupo C resistentes a la actividad bactericida del suero</b>	
1.1	Identificación de aislados resistentes mediante ensayos de anticuerpos bactericidas del suero .....	139
1.2	Ensayo de actividad del suero utilizando fuente de complemento humano .....	148
1.3	Descripción fenotípica y características clínicas de los aislados resistentes .....	149
<b>2</b>	<b>Análisis del grado de sialización del LPS y su implicación en la resistencia de las cepas a la acción de sueros inmunes</b>	
2.1	Grado de sialización del LPS .....	152
2.2	Inactivación del gen <i>Ist</i> . Ensayo de SBA con los mutantes en <i>Ist</i> .....	153
<b>3</b>	<b>Análisis de la acetilación del polisacárido capsular</b>	
3.1	Determinación de la acetilación capsular .....	155
3.2	Inactivación del gen <i>oatC</i> . Ensayos de SBA con los mutantes en <i>oatC</i>	158

<b>4</b>	<b>Implicación de la cápsula en la resistencia al suero mediada por el sistema del complemento</b>	
4.1	Inactivación del gen <i>siaD</i> . Ensayos de SBA con los mutantes en <i>siaD</i> ..	160
4.2	Transferencia del fenotipo resistente .....	161
4.2.1	Selección de los transformantes resistentes .....	161
4.2.2	Ensayos de SBA con los transformantes ST1 y ST2 .....	163
4.3	Identificación de la región polimórfica en los aislados resistentes .....	164
4.3.1	Amplificación del operón capsular .....	164
4.3.2	Amplificación de la región intergénica entre los genes <i>siaA</i> y <i>ctrA</i> .....	167
<b>5</b>	<b>Identificación de la secuencia de inserción IS1301 en el operón capsular</b>	
5.1	Secuenciación de la región intergénica entre los genes <i>siaA</i> y <i>ctrA</i> .....	169
5.2	Identificación de la secuencia de inserción IS1301 en cepas sensibles .	172
<b>6</b>	<b>Transferencia de la región intergénica</b>	
6.1	Transformación en el aislado R3. Ensayo de SBA con los transformantes .....	174
6.2	Transformación en el aislado S3. Ensayo de SBA con los transformantes .....	175
<b>7</b>	<b>Análisis de la estructura antigénica de la cápsula</b>	
7.1	Ensayos de SBA en sueros obtenidos tras inmunización en ratones ....	176
7.2	Análisis de la estructura del polisacárido capsular mediante espectroscopía de RMN .....	177
<b>8</b>	<b>Estudio de cambios cuantitativos en la cápsula</b>	
8.1	Análisis del nivel de expresión de los genes <i>siaA</i> y <i>ctrA</i> .....	179
8.2	Cuantificación del polisacárido capsular .....	183
8.2.1	Cuantificación del polisacárido capsular mediante FACS .....	183
8.2.2	Detección del polisacárido capsular mediante criomicroscopía electrónica de transmisión .....	185
<b>9</b>	<b>Interacción con el sistema del complemento</b>	
9.1	Depósito del componente C3b .....	188
9.2	Fijación del complejo de ataque a la membrana .....	189
9.3	Activación del sistema del complemento regulado por la vía alternativa	190
9.3.1	Depósito del componente C3b .....	190

9.3.2	Fijación del complejo de ataque a la membrana .....	190
<b>10</b>	<b>Análisis de la proteína de superficie PorA en relación a la resistencia de las cepas</b>	
10.1	Ensayo de SBA con anticuerpo anti-PorA .....	192
10.2	Análisis de la expresión de PorA .....	193
<b>11</b>	<b>Detección de la secuencia de inserción IS1301 en cepas aisladas de individuos vacunados</b>	195
	<b>DISCUSIÓN .....</b>	197
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	217
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	221
	<b>PUBLICACIÓN .....</b>	257

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac 1<sup>ario</sup>: anticuerpo primario  
Ac 2<sup>ario</sup>: anticuerpo secundario  
Acm: anticuerpo monoclonal  
AcP: anticuerpo policlonal  
C1INH: inhibidor de C1  
C4BP: proteína de unión a C4  
CID: coagulación intravascular diseminada  
CMI: concentración mínima inhibitoria  
CMP-NANA: citidina monofosfato-ácido siálico  
D.O.: densidad óptica  
ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*  
EM: enfermedad meningocócica  
ET: tipo electroforético  
fH : factor H  
fHBP: proteína de unión a factor H  
fI: factor I  
GGT: gamma-glutamil transpeptidasa  
GNA: antígenos derivados del genoma de *Neisseria*.  
LCR: líquido cefalorraquídeo  
LNnT: lacto-N-neotetraosa  
LOS: lipooligosacárido  
LPS: lipopolisacárido  
MAC: complejo de ataque a la membrana  
MBL: lectinas de unión a manosa  
MLEE: *Multilocus Enzyme Electrophoresis*  
MLST: *Multilocus Sequence Typing*  
NANA: ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico  
NG: no grupable  
NST: no subtipable  
NT: no tipable  
OMPs: proteínas de membrana externa  
OMVs: vesículas de membrana externa

ORF: *open reading frame*

PBP2: proteína fijadora de penicilina 2

PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

qrRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real con transcripción inversa

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RIG: región intergénica

RIG *siaA-ctrA*: región intergénica comprendida entre los genes *siaA* y *ctrA*

SBA: anticuerpos bactericidas del suero

TD: timo dependiente

TI: timo independiente

UFC: unidades formadoras de colonias

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

## **INTRODUCCIÓN**



# 1 *Neisseria meningitidis*

## 1.1 Agente etiológico de la enfermedad meningocócica.

### Aspectos históricos

*Neisseria meningitidis*, también conocido como meningococo, es un patógeno exclusivamente humano que además de colonizar el tracto respiratorio superior (la nasofaringe) es el agente causal de la enfermedad meningocócica (EM), denominación más amplia que el término meningitis meningocócica al comprender además aquellos cuadros que no presentan manifestaciones meníngeas.

El físico inglés Tomas Willis fue probablemente el primero en señalar un brote de EM (Willis, 1684), aunque de forma histórica este hecho se atribuye al físico suizo Vieusseux cuando describió de forma clara un brote ocurrido en Ginebra en 1805 (Vieusseux, 1806). En 1884 Marchiafava y Celli identificaron, sin llegar a cultivarlo, un micrococo oval dentro del citoplasma de los leucocitos (Marchiafava and Celli, 1884). El aislamiento y cultivo del meningococo no fue posible hasta 1887 cuando el patólogo Anton Weichselbaum, lo aisló a partir de exudados meníngeos *post mortem* y le llamó "*Diplococcus intracellularis meningitidis*", estableciéndose así la relación entre este microorganismo y la meningitis cerebroespinal epidémica (Weichselbaum, 1887). El microorganismo fue renombrado como *Neisseria meningitidis* por parte de Albert Neisser después de haber caracterizado al patógeno relacionado, *Neisseria gonorrhoeae*. El uso de la punción lumbar atribuida por primera vez al físico alemán Quincke en 1893 permitió recuperar al meningococo del líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con meningitis. El primer aislamiento del meningococo a partir de la nasofaringe llevado a cabo por Kiefer en 1896 supuso un importante avance en el conocimiento de los mecanismos de transmisión y patogénesis de la enfermedad (Kiefer, 1896).

A comienzos del siglo XX se desarrolló con éxito el primer tratamiento frente a la EM, basado en la inmunoterapia reduciendo la mortalidad al 25%

(Jochmann, 1906). Durante la primera Guerra Mundial, con el objetivo de reducir el número de casos clínicos, se estableció un programa de prevención basado en evitar el hacinamiento y en la administración de sulfato de zinc inhalado a los portadores (Glover, 1920). Entre los años 1912 y 1917 se probaron las primeras vacunas antimeningocócicas en Estados Unidos e Inglaterra siguiendo estudios de Sophian, Black y Greenwood (Sophian and Black, 1912; Greenwood, 1917). En la década de los años 30, se describieron las primeras cepas capsuladas de meningococo, demostrando la naturaleza polisacáridica de la cápsula (Scherp and Rake, 1935) y sentando las bases para el desarrollo de las vacunas de polisacárido capsular. Con el desarrollo de las sulfonamidas en 1937 y el empleo de las mismas para tratar y erradicar el estado de portador, la mortalidad de la EM se redujo drásticamente (Schwentker, 1937). El aumento de la resistencia a las sulfamidas se produjo paralelamente con el desarrollo de las primeras vacunas polisacáridicas a partir de los trabajos desarrollados por Gotschlich y colaboradores sobre los polisacáridos capsulares del meningococo (Gotschlich et al., 1969; Goldschneider et al., 1969a, b). En las últimas décadas del siglo XX, se introdujeron las vacunas basadas en vesículas de membrana externa (OMVs) para el control de brotes originados por el serogrupo B.

Actualmente, los numerosos brotes causados por los serogrupos mayoritarios y la emergencia de los serogrupos Y, X y W-135 en la pasada década, demuestran que el meningococo continúa siendo una amenaza para la salud pública. Los avances en el conocimiento de la biología y patogénesis del microorganismo, la nueva generación de vacunas conjugadas frente a los serogrupos A, C, W-135 e Y, junto con las buenas perspectivas puestas en la vacuna frente a serogrupo B, contribuirán a la erradicación potencial del meningococo en los países industrializados en la próxima década. El gran desafío será la introducción de las nuevas vacunas antimeningocócicas en los países en vías de desarrollo, con especial y urgente necesidad en África subsahariana (Stephens, 2007; Stephens et al., 2007).

## 1.2 Posición taxonómica. Características microbiológicas

La primera edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ubicaba a *N. meningitidis* dentro del género *Neisseria* que junto con los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Kingella* constituían la familia *Neisseriaceae* (Vedros, 1984). La nueva clasificación de microorganismos basada en las secuencias genéticas del ARN ribosómico 16S, que recoge la segunda edición del manual, sitúa al género *Neisseria* en la clase  $\beta$  del *phylum* proteobacterias. Las bacterias incluidas en este *phylum* se caracterizan por presentar una morfología, fisiología y metabolismo muy variable.

Las especies del género *Neisseria* colonizan las membranas mucosas de los mamíferos. Se han descrito como especies humanas: *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. subflava* (biovariedades *subflava*, *flava* y *perflava*), *N. mucosa*, *N. flavescens*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea*, *N. elongata* subespecies *elongata*, *glycolytica* y *nitroreducens* y *N. bacilliformis*. *N. gonorrhoeae* subespecie *kochii* (*N.kochii*), endémica de Sudán y raramente aislada en otras áreas geográficas, está fenotípica y genéticamente relacionada con *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. De todas ellas, solamente *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* son patógenos exclusivamente humanos. *N. gonorrhoeae* es considerada siempre patógena independientemente del lugar del cual se aisle, mientras que *N. meningitidis* a pesar de ser el agente etiológico de la EM, puede colonizar la nasofaringe sin producir enfermedad. Las especies no patógenas forman parte de la microbiota normal del tracto respiratorio superior, colonizando la nasofaringe y pudiendo actuar como patógenos oportunistas de forma ocasional (Janda and Knapp, 2003).

*N. meningitidis* al igual que la mayoría de las especies del género *Neisseria* (con excepción de *N. elongata*, *N. weaveri* y *N. bacilliformis* con morfología bacilar), es un diplococo gramnegativo (0,6-0,8  $\mu\text{m}$  de diámetro), que suele aparecer unido con caras laterales adyacentes aplanadas y cóncavas, lo que le confiere una forma típica de grano de café. Como otras especies del género, son células inmóviles, no productoras de endosporas, aerobias estrictas y relativamente exigentes en sus requerimientos nutritivos. Son particularmente

útiles los medios enriquecidos con sangre (agar sangre), especialmente cuando se suplementan con sangre hemolizada (agar chocolate). Las condiciones óptimas de crecimiento son una temperatura de 35-37°C, bajo una atmósfera de 5-10% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 50%. Desde el punto de vista metabólico, *N. meningitidis* es un microorganismo quimio-heterótrofo, citocromo-oxidasa y catalasa positivo y que produce gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) (Janda and Knapp, 2003).

El aislamiento a partir de muestras estériles como LCR o sangre se puede hacer en medio agar sangre pero, en el caso de la nasofaringe es necesario eliminar la microbiota acompañante incluyendo neisserias saprofitas y otras especies comensales. El medio selectivo más utilizado es el medio descrito por Thayer y Martin en 1966, consistente en agar sangre al que se le añade antibióticos como colistina, nistatina, vancomicina y trimetoprim (agar CNV). El crecimiento en este medio se considera un método básico para la diferenciación de cepas patógenas y saprofitas aunque hay que señalar que tanto *N. lactamica* como *N. polysaccharea* crecen en este medio por ser resistentes a colistina.

La identificación y diferenciación de *N. meningitidis* respecto de otras neisserias saprofitas se realiza mediante una serie de pruebas bioquímicas entre las que se incluyen la degradación de los azúcares y los perfiles enzimáticos. La producción de ácidos a partir de carbohidratos (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa y fructosa) ayuda a la identificación de las especies del género. El meningococo produce degradación de glucosa y de maltosa pero no de sacarosa, fructosa y lactosa. Las pruebas enzimáticas basadas en el cambio de color de un sustrato cromogénico cuando determinados enzimas actúan sobre el mismo, permiten la identificación rápida de algunas especies. Resulta de especial interés la producción de la enzima GGT de forma casi exclusiva por *N. meningitidis*. Estas pruebas adicionales permiten la identificación adecuada de variantes tales como las cepas de meningococo que no producen ácido a partir de maltosa y que podrían identificarse de forma errónea como *N. gonorrhoeae* (Saez-Nieto et al., 1982).

### 1.3 Determinantes antigénicos de virulencia

La superficie celular externa de *N. meningitidis* presenta la estructura típica de una bacteria gramnegativa, con una membrana plasmática interna y una membrana externa separadas por la pared celular constituida por peptidoglicano. La membrana externa es una bicapa fosfolipídica que contiene lipopolisacárido (LPS) y proteínas. Una cápsula de naturaleza polisacáridica rodea a la membrana externa del meningococo.

La cápsula, el LPS, las proteínas de membrana externa (OMPs) y las fimbrias o pili son los principales determinantes antigénicos de superficie del meningococo. El estudio de los mismos tiene interés tanto para la clasificación del microorganismo como para estudios de patogenicidad.

#### 1.3.1 Cápsula

El polisacárido capsular de *N. meningitidis* interacciona con el medio externo interviniendo en numerosos procesos biológicos relacionados con la patogénesis del microorganismo.

##### 1.3.1.1 Composición química de los principales polisacáridos capsulares

Los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* pertenecen al grupo II de antígenos capsulares, expresándose a temperaturas por encima de 20°C. Basándose en la composición química y en las propiedades inmunológicas de la cápsula, se han descrito hasta el momento 13 serogrupos, siendo los serogrupos A, B, C, Y, W-135 y recientemente el X, los asociados a casos de enfermedad (Stephens, 2007; Stephens et al., 2007). Los serogrupos B, C, W-135 e Y contienen ácido siálico como principal componente de la cápsula. Las estructuras de los polisacáridos capsulares de los serogrupos B y C están altamente relacionadas. Ambas se diferencian en las uniones entre los monómeros de ácido siálico, con enlaces  $\alpha(2\rightarrow9)$  en el serogrupo C y  $\alpha(2\rightarrow8)$  en el serogrupo B (Bhattacharjee et al., 1975; Fairley et al., 1996). El polisacárido capsular del serogrupo B es químicamente similar al expresado por *Escherichia coli* K1, presentando como diferencia la expresión de una O-acetiltransferasa en *E. coli*

K1 (Orskov et al., 1979) mientras que la cápsula del meningococo serogrupo B no parece modificarse mediante O-acetilación. Las cápsulas de los serogrupos W135 e Y son heteropolímeros que alternan restos de ácido siálico unidos mediante enlaces  $\alpha(2\rightarrow6)$  con residuos de D-galactosa y D-glucosa, respectivamente (Bhattacharjee et al., 1976). La composición del serogrupo A, también con alta implicación clínica, y del serogrupo X son similares, tratándose en el serogrupo A, de unidades de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato con enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  y N-acetil-D-glucosamina-1-fosfato con enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  en el serogrupo X (Bundle et al., 1974a, b).

### **1.3.1.2 Organización genética de la biosíntesis y del transporte del polisacárido capsular**

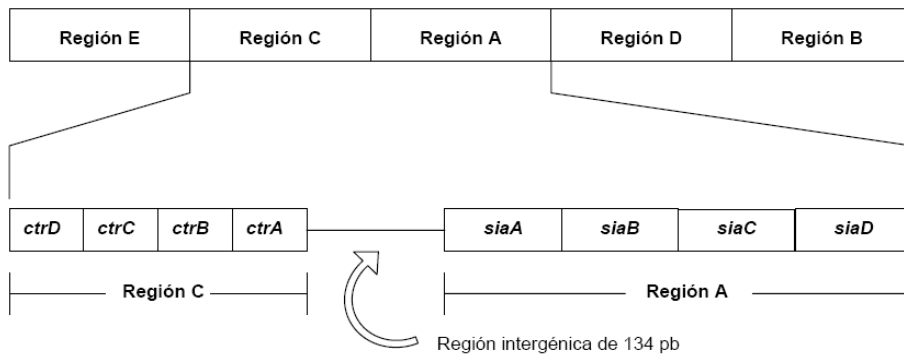
La biosíntesis del polisacárido capsular del meningococo es un proceso que ocurre en el citoplasma tras el cual, el polímero capsular es transportado a la superficie celular. Todos los genes implicados en estos procesos se encuentran agrupados en el operón denominado *cps*, descrito por primera vez en el serogrupo B (Frosch et al., 1989).

El análisis funcional del *cps*, con un tamaño de 24 Kb, permitió diferenciar 5 regiones designadas de la A a la E y ordenadas como E, C, A, D y B (Figura 1). Los genes requeridos para la expresión de la cápsula se localizan en las regiones A, B y C. En la región A se codifican las enzimas necesarias para la biosíntesis del polisacárido capsular (Edwards et al., 1994) mientras que las regiones B y C contienen los genes responsables de la modificación lipídica y del transporte del polímero capsular a la membrana externa de la superficie bacteriana, respectivamente (Frosch et al., 1992; Frosch and Muller, 1993). La región D contiene algunos genes implicados en la biosíntesis del LPS. La función de los genes que constituyen la región E, no está por el momento bien definida (Hammerschmidt et al., 1994; Petering et al., 1996).

La región A, es un fragmento de 5 Kb que contiene genes que reciben diferentes nomenclaturas como *sia*, *neu* o *syn*. De este modo, los serogrupos con cápsulas compuestas de ácido siálico, como son los serogrupos B, C, W135 e Y,

contienen en la región A los genes *siaA*, *siaB*, *siaC* y *siaD* que se transcriben de forma coordinada constituyendo un único operón (Swartley et al., 1996). Los genes *siaA*, *siaB*, *siaC* están muy conservados y participan tanto en la síntesis de los monómeros de ácido siálico como en su activación a citidina monofosfato-ácido siálico (CMP-NANA).

**Figura 1: Organización genética del polisacárido capsular en *N. meningitidis* serogrupo B**

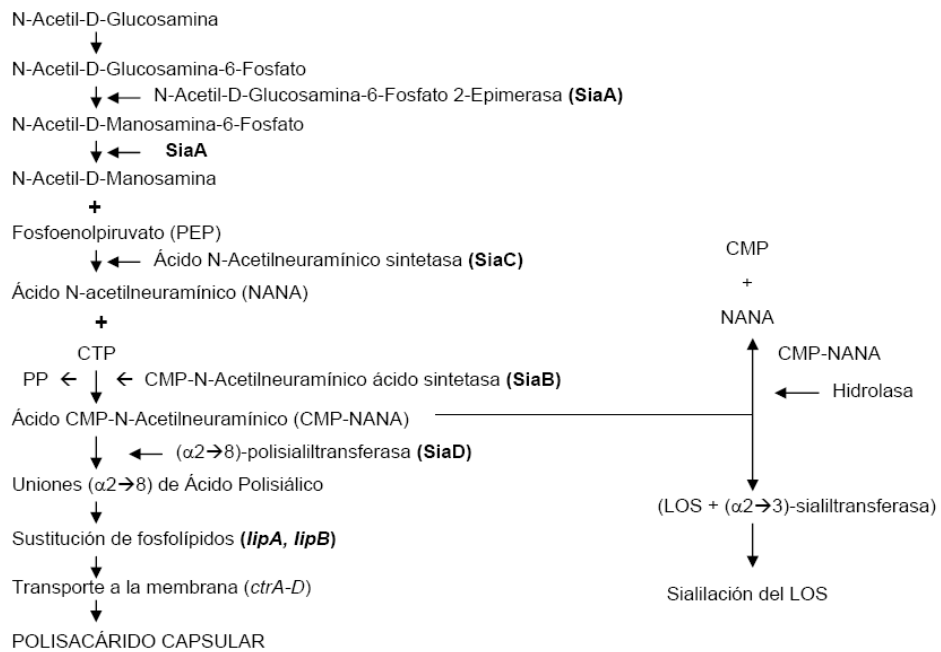


Adaptado de (Swartley et al., 1997).

La ruta de biosíntesis del polisacárido capsular, detallada en la Figura 2 para el serogrupo B, se inicia a partir de la N-acetil D-glucosamina que tras varios pasos enzimáticos catalizados por las enzimas SiaA (N-acetilDGlucosamina 6-fosfato 2-epimerasa) y SiaC (ácido N-acetilneuramínico sintetasa) origina ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico (NeuNAc o NANA). El ácido siálico generado debe convertirse en su forma activa, CMP-NANA, por la acción de SiaB (CMP-ácido N-acetilneuramínico sintetasa). A continuación se forman las diferentes uniones entre las moléculas de CMP-NANA debido a la acción de *siaD* que es una polisialiltransferasa que participa tanto en la polimerización de las cadenas

de ácido siálico como en su elongación (Swartley et al., 1997). Existen divergencias genéticas entre los diferentes serogrupos debido a que el gen *siaD* presenta secuencias específicas en cada uno de los serogrupos (Edwards and Frosch, 1992).

**Figura 2: Ruta de biosíntesis del polisacárido capsular en *N. meningitidis* serogrupo B**

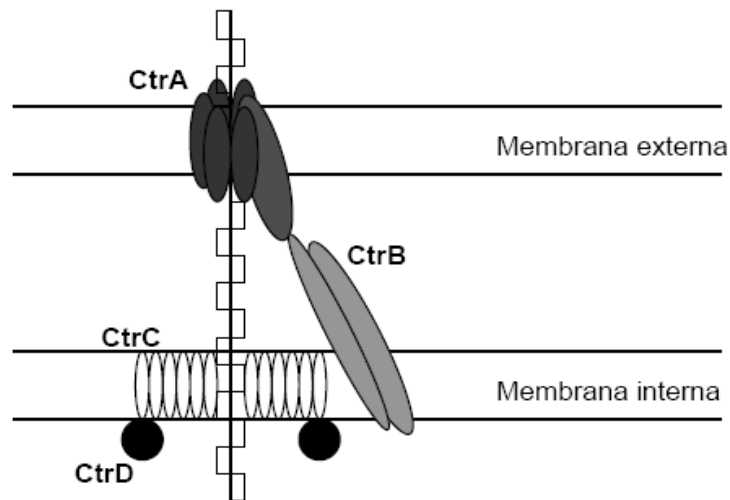


Adaptado de (Swartley et al., 1997).

La ruta de transporte del polisacárido capsular hacia la superficie celular está regulada por 4 genes policistrónicos (*ctrA*, *ctrB*, *ctrC* y *ctrD*) que están situados en la región C, que es adyacente a la región A. Es un proceso dependiente de ATP que requiere la acción de un sistema de transportador ABC (*ATP-binding cassette*) (Roberts, 1996). Los transportadores ABC contienen 4 dominios o subunidades con 2 proteínas integrales de membrana hidrofóbicas que forman el canal a través de la membrana y 2 proteínas de membrana hidrofílicas de unión a ATP. En *N. meningitidis*, las proteínas CtrD y CtrC dirigen la translocación del polisacárido capsular a través de la membrana interna, mientras que la proteína CtrA lo hace a través de la membrana externa. El gen *ctrB* participa en la estabilización de las zonas de translocación del polisacárido capsular en ambas membranas (Frosch et al., 1991; Frosch et al., 1992).

La Figura 3 muestra un modelo hipotético de transporte, donde las proteínas que forman parte del transportador ABC dirigen el proceso a través de las membranas hacia la superficie externa de la bacteria.

**Figura 3. Sistema de transporte del polisacárido capsular en *N. meningitidis* regulado por las proteínas CtrA, CtrB, CtrC y CtrD**



Adaptado de (Frosch, 2006).

Los genes *ctrA-D* están separados de los genes *siaA-D* que forman parte del *cps*, por una región intergénica (RIG) de 134 pb. Esta RIG, que presenta idéntica secuencia en todos los serogrupos que expresan cápsulas de ácido siálico, contiene los promotores que inician la transcripción de ambos operones desde puntos de inicio adyacentes y de manera divergente (Swartley et al., 1996). Esta región, es crítica en la regulación transcripcional de la expresión de la cápsula, hecho que ha sido demostrado mediante procesos de delección, inserción y mutagénesis, realizados en la misma (Tzeng et al., 2001).

Antes de ser exportados a la superficie, los polímeros de ácido siálico son modificados por sustitución lipídica. Las enzimas codificadas en la región B, por los genes *lipA* y *lipB*, son responsables de la sustitución de fosfolípidos en las

cadenas terminales de los polisacáridos capsulares (Figura 2) (Frosch and Muller, 1993).

La región D, con un tamaño de 5.5 Kb, contiene genes que presentan homología con genes responsables de la síntesis del LPS en *E. coli*, como son *galE*, *rfbB*, *rfbC* y *rfbD*. El primer gen en esta región y por tanto adyacente al gen *siaD* de la región A, es el gen *galE*. De este gen están presentes dos copias en el genoma de *N. meningitidis*, siendo únicamente funcional la localizada en el *locus* capsular.

Los genes que forman parte de las regiones B y C se mantienen altamente conservados tanto entre los serogrupos con cápsulas compuestas de ácido siálico como entre los que exhiben distinta composición, mientras que la región A varía entre los diferentes serogrupos. En el serogrupo A, los genes que constituyen la región A, denominados *mynA*, *mynB*, *mynC* y *mynD* son los responsables de la síntesis del polímero de N-acetil-D-manosamina-1-fosfato (Swartley et al., 1998). La región A encargada de la síntesis capsular en el serogrupo X, consiste en tres genes que se transcriben conjuntamente, *xcbA*, *xcbB* y *xcbC* (Tzeng et al., 2003).

#### **1.3.1.3 Bases genéticas de la O-acetilación del polisacárido capsular**

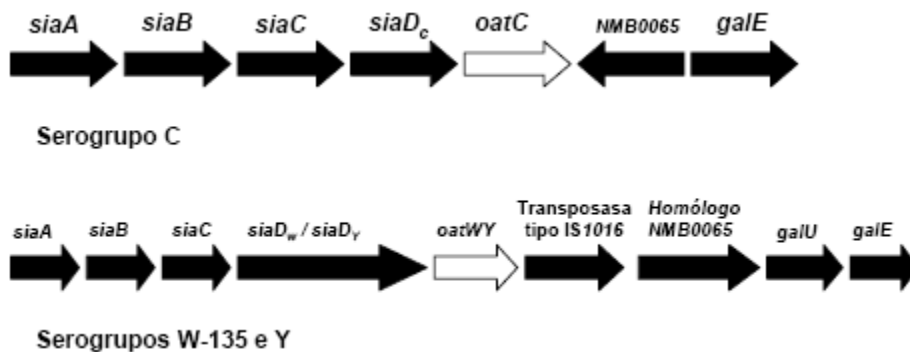
Los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* pueden modificarse por acetilación gracias a la acción de O-acetiltransferasas. Así como las cápsulas de los serogrupos C, W135 e Y sí que pueden presentar grupos O-acetilo, no se ha descrito hasta el momento ningún mecanismo de acetilación para el serogrupo B. Los residuos de ácido siálico de los polisacáridos capsulares de los serogrupos C, W135 e Y pueden estar acetilados en dos posiciones (posición 7 u 8 en el serogrupo C y posición 7 ó 9 en los serogrupos W135 e Y), aunque sólo se ha identificado un gen O-acetiltransferasa en cada serogrupo. Las enzimas codificadas por los genes *oatC* y *oatWY* median la acetilación en la posición 8 en el serogrupo C y en la posición 7 en los serogrupos W135 e Y, respectivamente.

En el serogrupo C, el gen *oatC* codifica una proteína de 461 aminoácidos que no muestra homología con ninguna de las secuencias hasta el

momento descritas en el GenBank. En los serogrupos W135 e Y, el gen *oatWY* codifica la proteína OatWY que muestra homología en su secuencia con miembros de la familia de las NodL-LacA-CysE acetiltransferasas. Los genes *oatC* y *oatWY* se localizan dentro de la región A del *cps*, en la región 3' del gen *siaD*, quedando probado que ambos se cotranscriben con el operón *sia* y que deben ser considerados una parte de la región A del operón capsular (Claus et al., 2004).

La Figura 4 representa un esquema de la región A y parte de la región D del *cps* de los serogrupos C, W-135 e Y, donde se ubican los genes responsables de la acetilación capsular en estos serogrupos.

**Figura 4. Localización en el operón capsular de los genes responsables de la O-acetilación en los serogrupos C, W-135 e Y de *N. meningitidis***



Adaptado de (Claus et al., 2004).

En el serogrupo C, la secuencia del gen *oatC* contiene dos trectos homopoliméricos compuestos por 7 nucleótidos de timina (poliT) y adenina (poliA) situados entre las posiciones 210-216 y 458-464, respectivamente, que regulan mecanismos de variación de fase. En los serogrupos W135 e Y también

se han descrito cambios en el estado de acetilación debidos a procesos de delección o por la inserción de la secuencia IS1301 en el gen *oatWY* (Claus et al., 2004).

Diferentes estudios realizados en Reino Unido, mostraron la prevalencia del estado de la O-acetilación capsular en los serogrupos C, W135 e Y, siendo muy frecuente entre los aislados de los serogrupos C e Y (alrededor del 80%) y en escasa proporción en el serogrupo W135 (Borrow et al., 2000; Longworth et al., 2002b). La implicación de la acetilación tanto en el estado de portador como en la patogénesis de los aislados clínicos de meningococo no está muy clara. El polisacárido capsular en estado no acetilado podría ser más inmunógeno que en la forma acetilada, pero aún no existen evidencias de si estas diferencias en acetilación tienen un efecto en la virulencia del microorganismo (Richmond et al., 2001).

#### **1.3.1.4 La cápsula como factor de virulencia. Mecanismos de regulación de la expresión de la cápsula**

La cápsula es el principal factor de virulencia en meningococo, siendo la expresión de la misma un requisito indispensable para que el microorganismo sobreviva en la circulación sistémica, evadiendo la inmunidad mediada por el sistema del complemento y la fagocitosis controlada por las células fagocitarias del huésped (Vogel and Frosch, 1999). Además, la cápsula protege a la bacteria frente a péptidos antimicrobianos tales como la Polimixina D, defensinas y protegrinas, lo que le permite dividirse en las células epiteliales o del endotelio cerebral (Spinosa et al., 2007).

Una estrategia adicional del meningococo es la habilidad para modular la expresión de estructuras de superficie, especialmente aquellas que desempeñan un papel clave en la interacción con el huésped, como es el caso de la cápsula. Aunque la expresión de la cápsula es crucial en la patogénesis del meningococo, ésta no se expresa de forma constitutiva en todos los estados de la infección. Los aislados de portadores no expresan cápsula o expresan menos que aquellos recuperados de sangre o de LCR, lo que mantiene la hipótesis de

que la expresión de la cápsula es regulada durante los diferentes estados de la infección (Cartwright et al., 1995). Estudios epidemiológicos realizados durante un brote de EM producida por el complejo ET-5 en Washington, mostraron que las cepas invasivas aisladas de LCR y sangre expresaban más cápsula que aquellas presentes en nasofaringe (Tzeng and Stephens, 2000). Resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado en Reino Unido durante un brote producido por el serogrupo B, en donde las cepas obtenidas de portadores y de enfermos eran fenotípica y genotípicamente idénticas con la excepción de la expresión de la cápsula, inexistente en las cepas de portadores (Cartwright et al., 1987). De forma experimental se ha demostrado que la pérdida de la cápsula afecta a los mecanismos de adherencia e invasión del meningococo mediante la exposición de estructuras de superficie como las proteínas de membrana Opa y OpC (Virji et al., 1995).

Se ha sugerido que la expresión de la cápsula se regula en el mismo momento en el que el meningococo se adhiere a las células epiteliales y endoteliales, de modo que la pérdida de la encapsulación está asociada con una mayor capacidad de adhesión a estas células (Hammerschmidt et al., 1996b). El regulador transcripcional CrgA, que controla la expresión de numerosos genes durante el proceso de adhesión, regula negativamente la expresión de los genes *sia* del *cps* (Deghmane et al., 2000; Deghmane et al., 2002). Recientemente, se ha sugerido que el sistema de dos componentes MisS/MisR, también conocido como PhoP/PhoQ, participa en la regulación de la cápsula (Tzeng et al., 2008). Sin embargo, el mecanismo detallado de cómo está regulada la expresión de este esencial factor de virulencia del microorganismo se desconoce.

Uno de los varios mecanismos de cambio antigénico que posee el meningococo, es el intercambio alélico de genes o de fragmentos de genes como resultado de procesos de transformación y de transferencia horizontal de ADN. En el caso del *locus* capsular, con una región central (región A) específica para cada serogrupo, flanqueada por regiones conservadas (regiones B, C y D) en todos los serogrupos, el recambio alélico entre los genes de biosíntesis mediante recombinación homóloga se ve favorecido. Este tipo de intercambio conocido

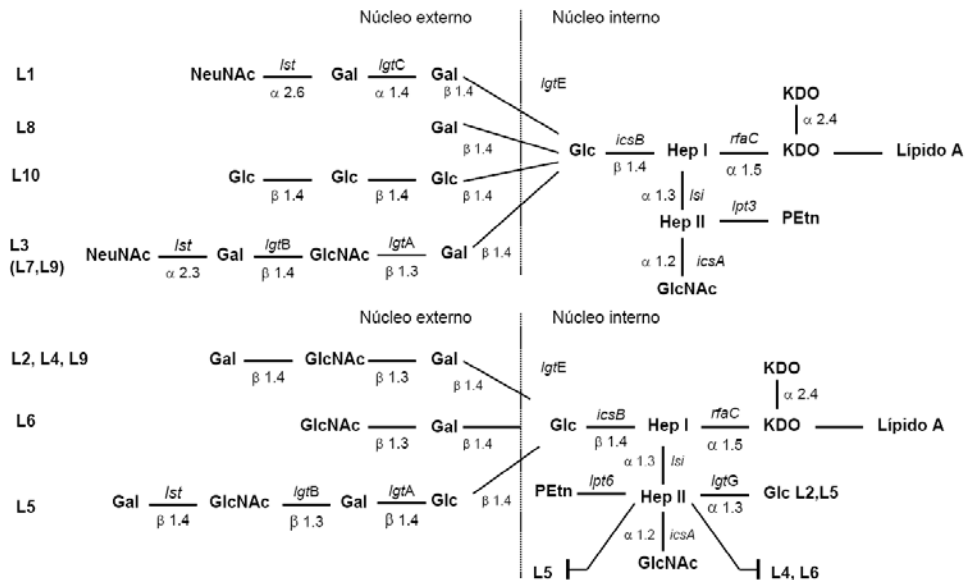
como *switching* capsular, ha sido documentado tanto *in vitro* como *in vivo*, produciéndose como resultado un intercambio capsular, que es un importante mecanismo de virulencia que permite al meningococo escapar de la inmunidad tanto natural como de la adquirida mediante la vacunación (Swartley et al., 1997).

### 1.3.2 Lipopolisacárido

El LPS constituye el componente antigénico más abundante de la envoltura celular de *N. meningitidis*. Se compone de dos regiones bien diferenciadas desde el punto de vista genético y estructural: una parte lipídica denominada lípido A y una parte de naturaleza oligosacárida (Jennings et al., 1980). El lípido A se mantiene anclado a la membrana externa mediante diferentes ácidos grasos. Esta estructura lipídica, que es una endotoxina, está unida a un núcleo oligosacárido superficialmente expuesto. La fracción oligosacárida del LPS se divide en dos regiones; una parte interna relativamente conservada y otra externa altamente heterogénea, base de la clasificación para los 12 diferentes inmunotipos (L1-L12). El núcleo del LPS del meningococo ha perdido el antígeno O, un polímero de restos azucarados que forma parte del LPS en enterobacterias, por lo que en ocasiones es denominado lipooligosacárido (LOS) (Jennings et al., 1987).

La Figura 5 muestra la estructura del LPS en los diferentes inmunotipos, detallando los enlaces entre los restos azucarados así como los genes que codifican las transferasas responsables para la adición de los azúcares.

**Figura 5: Estructura de los diferentes inmunotipos (L1-L12) expresados por *N. meningitidis***



KDO: ácido 3-Desoxi-D-mano-2-octulósico; Hep: heptosa; Glc: glucosa; Gal: galactosa; GLcNAc: N-acetil glucosamina; Petn: fosfoetanolamina; NeuAc: ácido siálico.

Adaptado de (Wright et al., 2006).

La biosíntesis del lípido A ha sido extensamente estudiada en *E. coli* y muchos de los genes implicados en la misma han sido también identificados en *N. meningitidis*. La mayoría de los genes responsables de la adición de los azúcares en la parte de oligosacárido del LPS del meningococo se encuentran agrupados en 3 regiones del genoma denominadas: Lgt-1, Lgt-2 y Lgt-3 (Zhu et al., 2002). La región Lgt-1 puede contener hasta 5 genes: *IgtA*, *IgtB*, *IgtC*, *IgtD* y *IgtE*, responsables de las uniones de las cadenas α en el núcleo externo del LPS. Los genes *IgtA*, *IgtC* y *IgtD* presentan variaciones de fase permitiendo cambios en la expresión de los mismos. Este mecanismo de variación de fase, permite la

expresión de diferentes estructuras de LPS para una misma cepa de meningococo teniendo así la capacidad de expresar varios inmunitipos al mismo tiempo (Jennings et al., 1995). Lgt-2 es un operón que contiene dos genes: *lgtF* o *icsB* y *rfaK* o *icsA* que participan en la elongación de la cadena  $\gamma$  mediante la unión de Glc a HepI y de GlcNAc a HepII, respectivamente (Kahler et al., 1996a, b; van der Ley et al., 1997). La región Lgt-3 contiene los genes *lgtG* y *lpt6* que contribuyen a la formación de la cadena  $\beta$ . Los dos genes restantes implicados en la formación de la estructura del LPS, se encuentran en zonas del genoma localizadas fuera de estas tres regiones descritas: el gen *lpt3* une PEtn en la posición 3- de Hep II formando la cadena  $\beta$  (Tang et al., 2002) y el gen *lst* es el responsable de la sialización del LPS (Tsai et al., 2002).

El LPS en *N. meningitidis* posee un papel crucial en la patogénesis del microorganismo interviniendo en los procesos de colonización, invasión, diseminación a través del torrente circulatorio y en el daño tisular. Aunque el lípido A o endotoxina es el principal componente tóxico del LPS, con implicación directa en la patogénesis de la sepsis tras la invasión de la bacteria (Brandtzaeg et al., 1992), la región oligosacárida también participa en los procesos de adherencia y de resistencia al suero. La inactivación del gen *plxA*, que codifica el enzima responsable del primer paso en la biosíntesis del lípido A, reduce notoriamente la adhesión e invasión de las células epiteliales por parte de la bacteria (Gorter et al., 2003). Se ha demostrado que cepas mutantes en los genes *pgm* y *rfaK*, ambos implicados en la síntesis del oligosacárido, invaden las células epiteliales mucho más lentamente y presentan problemas para sobrevivir en el torrente sanguíneo (Plant et al., 2006). En un estudio realizado en ratones, los mutantes en LPS eran incapaces de persistir en pulmón y de invadir la circulación sistémica, hecho que demuestra la implicación del LPS en las fases iniciales de la infección meningocócica (Zarantonelli et al., 2006). Se ha descrito la asociación entre ciertos tipos de LPS y enfermedad invasiva en un estudio donde el 97% de los aislados clínicos expresaban los inmunitipos L3, L7 y L9 mientras que los inmunitipos relacionados con cepas de portadores eran mucho más heterogéneos con un predominio de los tipos L1 y L8 (Jones et al., 1992).

La implicación del LPS en la fisiopatología de la infección meningocócica ha sido ampliamente demostrada en diferentes estudios. Durante los procesos de crecimiento y lisis del meningococo, la endotoxina se libera en forma de OMVs formadas en un 50% por LPS y el 50% restante por OMPs, lípidos y polisacárido capsular (Poolman et al., 1995). Esta liberación de endotoxina inicia la cascada de respuesta inflamatoria produciendo citoquinas tales como  $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8, estando asociados todas ellas (aunque en mayor medida el  $TNF-\alpha$ ) con la severidad del shock, fallo multiorgánico y la coagulación intravascular diseminada (CID). Las concentraciones en plasma y en LCR de LPS están directamente relacionadas con las manifestaciones clínicas y con el pronóstico de la EM invasiva. Aquellos enfermos con shock séptico, fallo multiorgánico y coagulopatías severas presentan elevadas concentraciones plasmáticas de LPS, con un aumento de la mortalidad de forma directamente proporcional al incremento en unidades/ml de endotoxina en plasma (Brandtzaeg, 2003).

### 1.3.3 Pili

Los pili o fimbrias son proyecciones filamentosas, compuestas por subunidades polipeptídicas repetidas, que se extienden a partir de la superficie bacteriana (Devoe and Gilchrist, 1974).

Los pili tipo IV (Tfp) se encuentran en gran variedad de bacterias, incluyendo especies del género *Neisseria*, estando estructuralmente compuestos por el ensamblaje de subunidades de pilina (PilE) formando una estructura de  $\alpha$ -hélice. La proteína PilE, codificada por el gen *pilE* se sintetiza como un precursor, la prepilina, que es procesada por la enzima PilD (Stephens et al., 1985). La proteína PilC que también forma parte de la estructura Tfp, está codificada por dos genes que se expresan como PilC1 y PilC2, siendo necesaria la expresión de al menos una de estas dos formas para la formación de los pili y para los procesos de transformación. Las proteínas PilD, PilF y PilG, participan en el ensamblaje y estabilización de fibras de pilina. La secreción y translocación a la superficie bacteriana es llevada a cabo por parte de PilQ (Tonjum et al., 1995).

La proteína citoplasmática PilT es necesaria para que se produzca la retracción de los pili (Pujol et al., 1999).

*N. meningitidis* expresa dos tipos de Tfp: pili de clase I y pili de clase II, los cuales difieren entre sí antigénicamente y estructuralmente. Cambios en la estructura de los pili influyen de manera significativa la adherencia de meningococo y de gonococo a las células epiteliales (Virji et al., 1989; Virji et al., 1992). Los Tfp, además de mediar el contacto entre *N. meningitidis* y las células del hospedador, están implicados en los procesos de motilidad, transformación, formación de biopelículas y evasión del sistema inmune. La importancia de los pili en la patogénesis del meningococo se ha demostrado por el hecho de que éstos son ampliamente expresados en aislados clínicos de pacientes con meningitis y sepsis meningocócica (Stephens and McGee, 1981). Se ha sugerido que la expresión de PilC1 es clave para la adhesión del meningococo a las células epiteliales humanas ya que mutantes encapsulados *pilC1* presentaban pili pero eran incapaces de adherirse, lo que indica que el fenómeno de adhesión está regulado por la expresión de PilC1 (Nassif et al., 1997).

El receptor CD46, el cuál se expresa en la mayoría de las células humanas excepto en hematíes, se ha propuesto como receptor del Tfp. Diferentes estudios han demostrado que pili purificados pueden unirse a una proteína del tamaño del receptor CD46, que la adhesión del meningococo a las células se puede bloquear mediante anticuerpos anti-CD46 y que ratones transgénicos que expresan receptores CD46 humanos pueden padecer EM (Johansson et al., 2005; Kallstrom et al., 1997).

#### **1.3.4 Proteínas de membrana externa**

Al igual que en otras bacterias gramnegativas, la membrana externa del meningococo además de lípidos y LPS contiene numerosas OMPs.

Las proteínas mayoritarias de membrana externa de *N. meningitidis* se dividen en 5 grupos, definidas como proteínas de Clase 1 a proteínas de Clase 5.

Las proteínas de Clase 1 o PorA, con un peso molecular entre 44 y 47 KDa, son porinas con selectividad catiónica que se expresan en la superficie de

la mayoría de los aislados clínicos de meningococo (Tomassen et al., 1990). Su expresión está controlada por el gen *porA*, el cual presenta una estructura en mosaico fruto de procesos de recombinación mediante transformación. Las proteínas de Clase 1 se organizan estructuralmente atravesando la membrana externa formando 8 bucles hidrofílicos expuestos superficialmente. La secuenciación de estas proteínas ha permitido conocer la existencia de tres regiones variables definidas como RV1, RV2 y RV3, siendo las dos primeras las que presentan un mayor grado de polimorfismo y las que constituyen la base para serosubtipar a las cepas de meningococo (McGuinness et al., 1993). Debido a que PorA es una abundante proteína de membrana, es reconocida frecuentemente por anticuerpos bactericidas. Anticuerpos monoclonales (Acms) dirigidos frente a PorA pueden activar la lisis de la bacteria mediada por el complemento y se ha visto que presentan acción protectora frente a la infección meningocócica, tal y como se ha demostrado en modelos experimentales con ratas jóvenes (Saukkonen et al., 1987). Debido a su acción protectora, PorA ha sido incluida en la formulación de diversas vacunas como las desarrolladas en Cuba y Noruega o en la vacuna hexavalente de OMVs (Danzig, 2004).

Las proteínas de Clase 2 y Clase 3 o PorB, están codificadas por dos alelos distintos del mismo gen, *porB*. Dichos alelos son mutuamente excluyentes de tal manera que cada cepa o expresa la proteína PorB2 (41KDa) de Clase 2 o la proteína PorB3 (38 KDa) de Clase 3 (Evans et al., 1968). Recientemente, se ha descrito un aislado clínico que expresaba un alelo híbrido, *porB* 2/3, resultado de la recombinación entre los genes *porB2* y *porB3* y que mostraba en su secuencia regiones de las proteínas PorB2 y PorB3 (Abad et al., 2008). Ambas clases de proteínas que forman poros con selectividad aniónica, son las proteínas predominantes de la membrana externa del meningococo. Estructuralmente, constan de 8 bucles hidrofílicos expuestos en superficie con cuatro regiones variables: RV1, RV2, RV3 y RV4. Las proteínas de Clase 2 y Clase 3 presentan un alto grado de similitud en su estructura primaria, aunque la proteína PorB3 parece tener una conformación más estable y estar menos expuesta en superficie que la proteína PorB2 (Minetti et al., 1998; Feavers et al.,

1992). PorB puede estimular la proliferación de linfocitos B y con ello la secreción de inmunoglobulinas uniéndose a receptores TLR-2 (Wetzler et al., 1996). Así mismo, es capaz de anclarse a la membrana de las células del huésped formando canales funcionales e interfiriendo en las señales de  $Ca^{2+}$  (Muller et al., 1999).

Las proteínas de Clase 4 o proteína M modificable por reducción (RmpM), tienen un peso molecular de 33 KDa y son antigénicamente muy estables. RmpM está estrechamente relacionada con PorA y PorB y con las proteínas reguladoras de hierro, Lbpa; TbpA y FrpB (Jansen et al., 2000; Prinz and Tommassen, 2000). Algunos estudios han descrito que anticuerpos dirigidos frente a RmpM parecen evitar la lisis de la bacteria mediada por el complemento y que pueden bloquear la actividad bactericida del suero humano o la actividad inducida por anticuerpos frente a porinas y al LPS (Virji and Heckels, 1988; Plummer et al., 1993). En la actualidad esta capacidad bloqueante se ha puesto en duda (Rosenqvist et al., 1999).

Las proteínas de membrana de Clase 5 o proteínas asociadas a opacidad, se dividen en dos grupos: Opa y Opc (25-30 KDa). Las proteínas Opa presentan una gran variabilidad antigénica de fase llegando a expresar hasta cuatro variantes diferentes (Aho et al., 1991). La proteína Opc, codificada por un solo gen, está relativamente conservada sin presentar apenas variaciones antigénicas de fase, tan sólo cambios en su nivel de expresión pudiendo llegar a ser indetectable (Olyhoek et al., 1991). Ambas proteínas son importantes en los procesos de adhesión e invasión bacteriana uniéndose a receptores CD66 y de heparan sulfato, aunque dicha interacción con las células pueda ser enmascarada por la cápsula y el LPS (Virji et al., 1993). Se ha observado que las proteínas Opa pueden interactuar con los macrófagos, neutrófilos y linfocitos T CD4+ (Boulton and Gray-Owen, 2002). La proteína Opc es capaz de estimular la producción de anticuerpos bactericidas, por lo que podría ser candidata en el desarrollo de vacunas (Rosenqvist et al., 1993; Jolley et al., 2001).

Además de las proteínas mayoritarias de membrana, *N. meningitidis* expresa otras muchas proteínas, designadas como proteínas minoritarias de

membrana. Entre ellas, cabe destacar debido a su importancia antigénica y funcional, a las proteínas de membrana externa reguladas por hierro, que son expresadas cuando el meningococo crece en condiciones de pH bajo y con limitación de hierro. Estas proteínas reguladas por hierro que presentan gran interés como candidatas a vacunas, son capaces de unir directamente transferrina, lactoferrina, hemoglobina y haptoglobina a través de sus receptores (Ferreiros et al., 1991).

A partir de la secuenciación del genoma completo de los principales serogrupos de *N. meningitidis*, se han identificado nuevos antígenos denominados antígenos derivados del genoma de *Neisseria* (GNA). Entre ellos, destacan aquellos que forman parte de las nuevas vacunas formuladas frente al serogrupo B, como son las proteínas de superficie NadA (NMB1994), GNA2132 y GNA1870, que inducen la producción de anticuerpos bactericidas (Pizza et al., 2000; Giuliani et al., 2006). La proteína NadA, presenta una estructura molecular similar a una nueva clase de adhesinas (YadA y UspA<sub>2</sub>) y se une a las células epiteliales interviniendo en la interacción de la bacteria con el hospedador (Comanducci et al., 2002). El antígeno GNA2132, induce inmunidad protectora en humanos y es reconocido por sueros de pacientes que han padecido EM. Es una proteína capaz de unirse a heparina, lo que se ha visto que está se correlacionado con un aumento en la supervivencia en suero humano de cepas mutantes en cápsula (Serruto et al., 2010). La lipoproteína de superficie GNA1870, se ha descrito como la proteína de unión al factor H (fHBP). Mediante la unión al factor H (fH), regulador clave de la vía alternativa del sistema del complemento, permite a la bacteria evadir la acción bactericida del sistema inmune innato. Por ello, se ha demostrado que la expresión de esta proteína favorece la supervivencia del meningococo en sangre y en suero, así como en presencia de péptidos antimicrobianos, independientemente de su nivel de expresión. Se ha descrito que aunque el fH se une a las diferentes variantes de las tres subfamilias descritas para esta proteína, la producción de anticuerpos bactericidas depende del tipo de variante expresada (Madico et al., 2006; Seib et al., 2009).

## 1.4 Clasificación y caracterización de *N. meningitidis*

Se han desarrollado una gran variedad de métodos inmunológicos y moleculares para clasificar y caracterizar a las cepas de *N. meningitidis*, de gran utilidad en la vigilancia epidemiológica y en el manejo de la EM.

### 1.4.1 Métodos serológicos de tipificación

La clasificación serológica de las cepas de meningococo ha estado tradicionalmente basada en las características fenotípicas de las estructuras o antígenos de superficie de la bacteria. Por ejemplo, la designación antigénica de un aislado de *N. meningitidis* podría ser: C:2a:P1.5:L3, en base a la especificidad inmunológica de la cápsula, de las proteínas de membrana externa PorB y PorA y del LPS que definirían el serogrupo (C), serotipo (2a), serosubtipo (P1.5) e inmunotipo (L3), respectivamente.

Basándose en las diferencias estructurales e inmunológicas del polisacárido capsular se conocen 13 serogrupos (A, B, C, D, X, Y, Z, E, W-135, H, I, K y L) y hasta la actualidad, sólo seis (A, B, C, Y, W-135 y X) están asociados con EM (Stephens, 2007; Stephens et al., 2007). Para la determinación del serogrupo, en función de la composición de los polisacáridos capsulares, el método más empleado es la aglutinación con antiseros serogrupo-específicos que puede realizarse directamente en muestras clínicas como LCR y sangre o con bacteria aislada en cultivo. La técnica de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA), utilizando anticuerpos que reconocen a los distintos serogrupos, permitiría el serogrupado simultáneo de un mayor número de cepas al mismo tiempo (Rosenqvist et al., 1990). Sin embargo, existen numerosos aislados que no expresan cápsula por lo que no podrían ser caracterizados por este método (Yazdankhah and Caugant, 2004).

*N. meningitidis* puede ser clasificada en un alto número de serotipos y serosubtipos, basándose en las proteínas de membrana de Clase 2/3 y de Clase 1. Los distintos serotipos y serosubtipos se determinan dependiendo de la reactividad de estas porinas frente a Acms dirigidos específicamente frente a alguna de las regiones variables de las proteínas PorB y PorA, respectivamente

(Hansman and Ashton, 1994; Russell et al., 2004). El uso de este método de tipificación está limitado por la aparición de múltiples variantes antigénicas de PorA y PorB que no son reconocidas por los Acms comercialmente disponibles.

Las diferentes variantes estructurales del LPS permiten la división en 12 inmunotipos, inicialmente definidos por la reactividad frente a Acms, aunque éstos no son utilizados como marcador epidemiológico (Scholten et al., 1994). La mayoría de los aislados de meningococo expresan al mismo tiempo más de un inmunotipo de LPS. Los inmunotipos L3, L7 y L9 son los más frecuentemente expresados por las cepas de los serogrupos B y C, seguido por los inmunotipos L2, L1 y L8 (Jennings et al., 1999). Los inmunotipos L10 y L11 están únicamente asociados a cepas pertenecientes al serogrupo A (Scholten et al., 1994).

Todos estos métodos serológicos empleados para la caracterización fenotípica de las cepas de meningococo, al ser de fácil aplicación y no requerir excesivos medios técnicos para su desarrollo, han sido ampliamente utilizados generando importantes beneficios para la salud pública. Sin embargo, su uso presenta ciertas limitaciones y desventajas frente a los métodos genotípicos o moleculares.

#### **1.4.2 Métodos moleculares de tipificación**

Desde finales de la década de los 90, el desarrollo de métodos moleculares de caracterización ha mejorado el conocimiento de la epidemiología y evolución de *N. meningitidis*. Estos métodos basados en la aplicación de técnicas moleculares, presentan mayor capacidad de tipificación, mayor reproducibilidad y mayor poder discriminatorio que los métodos fenotípicos y además no se ven afectados por cambios en los determinantes antigénicos de la bacteria. Dentro de estos métodos, hay que diferenciar entre aquellos basados en el análisis del polimorfismo de restricción, de amplificación y de secuenciación.

El análisis del polimorfismo de restricción consiste en la comparación del número y tamaño de los fragmentos producidos por la digestión del ADN cromosómico con enzimas de restricción. Las variaciones en cuanto a número y

tamaño de los fragmentos de restricción se han definido como Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; RFLP). La separación de los fragmentos de restricción generados, puede realizarse mediante electroforesis convencional o por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*; PFGE), siendo esta última una de las técnicas más empleadas en estudios de tipificación y epidemiológicos para meningococo. Empleando PFGE se obtiene un patrón más simplificado de los fragmentos de restricción generados tras la digestión del ADN, mediante utilización de enzimas de baja frecuencia de corte y la aplicación de un campo eléctrico que va cambiando periódicamente de orientación. Es una técnica bastante discriminativa y ampliamente utilizada en los estudios de tipificación bacteriana de los últimos años (Bygraves and Maiden, 1992).

La técnica denominada *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), haciendo uso de la variabilidad electroforética de isoenzimas metabólicos de meningococo, ha sido aplicada para clasificar al microorganismo en una serie de Tipos Electroforéticos (ET), agrupando a las cepas en complejos clonales (Caugant et al., 1987a; Caugant et al., 1987b; Caugant et al., 1987c). El estudio de la epidemiología global mediante MLEE, permite definir los principales grupos poblacionales o líneas hipervirulentas de *N. meningitidis* existentes a nivel mundial.

En 1998, Maiden y colaboradores desarrollaron un nuevo método molecular llamado *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) adaptando los principios del MLEE a la posibilidad de la comparación y el intercambio de datos entre distintos laboratorios a través de Internet (<http://pubmlst.org/neisseria>). Esta técnica, consiste en amplificar y posteriormente secuenciar fragmentos internos de 7 genes conservados (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm*) necesarios para el funcionamiento celular (genes *housekeeping*), que no están sometidos a presión selectiva y que presentan niveles adecuados de diversidad genética para su utilización en estudios de epidemiología global. Para cada una de las cepas analizadas se obtiene un patrón o combinación de 7 alelos, correspondientes a

cada uno de los *loci* estudiados y esta combinación es lo que se define como *Sequence Type* (ST). La relación entre los diferentes STs se obtiene mediante la construcción de un dendograma a partir de la comparación de la similitud dos a dos de los perfiles alélicos y posterior agrupación mediante el método de agregación, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) (Maiden et al., 1998).

La amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la posterior secuenciación de los genes de la biosíntesis capsular, es de gran utilidad para determinar el serogrupo de aislados de *N. meningitidis*. En 1997, Borrow y colaboradores describieron por primera vez un protocolo de PCR para la caracterización de cepas de meningococo B y C, basado en la amplificación del gen *siaD* (Borrow et al., 1997). Actualmente la técnica se aplica también a los serogrupos A, Y, W-135 e Y (Taha, 2000) y puede ser utilizada para serogrupar cepas que no expresan cápsula (Lansac et al., 2000; Porritt et al., 2000). De manera similar, la amplificación de los genes *porA* y *porB* y haciendo uso de las bases de datos disponibles con las secuencias de las regiones variables de ambos genes (<http://neisseria.org/nm/typing/pora/> y <http://neisseria.org/nm/typing/porb/>), también es de gran utilidad para la caracterización de cepas (Jelfs et al., 2000a, b). Recientemente, otros antígenos de superficie han sido empleados como marcadores epidemiológicos, como es el caso del gen *fetA*, que parece estar muy conservado entre los aislados de líneas hiperinvasivas (Thompson et al., 2003). Está disponible una base de datos con las secuencias de la región variable del gen (<http://neisseria.org/nm/typing/feta/>).

Hay que tener en cuenta que ninguno de los antígenos de superficie incluidos en las nuevas vacunas frente al serogrupo B aparece en los métodos actualmente empleados para caracterizar y tipificar a los aislados de meningococo, por lo que el futuro podría traer nuevos esquemas de clasificación.

## 2 La infección meningocócica

### 2.1 Epidemiología

Transcurridos 200 años desde la primera descripción documentada de EM, el meningococo continúa siendo el principal responsable de la meningitis bacteriana endémica y epidémica así como una causa importante de sepsis, afectando tanto a países industrializados como a aquellos en vías de desarrollo (Stephens, 2007).

La EM puede ocurrir como: casos esporádicos (<1 caso/100.000 habitantes/año), enfermedad hiperesporádica o brotes localizados (1-10 casos/100.000 habitantes/año) o epidemias y pandemias (10-1000 casos/100.000 habitantes /año) (Tzeng and Stephens, 2000). La incidencia viene influenciada por la virulencia de la cepa circulante, por factores ambientales que afectan al reservorio humano del meningococo y por la susceptibilidad del huésped a la EM. La tasa de infección es más elevada en niños pequeños, al perder la inmunidad protectora materna, y asciende de nuevo en adolescentes y adultos jóvenes, probablemente relacionado con un aumento en la adquisición y transmisión de la bacteria (Goldschneider et al., 1969a, b).

Los serogrupos A, B y C producen casi el 90% de los casos de EM a nivel mundial, siendo los serogrupos B y C responsables de la mayoría de los casos ocurridos en Europa y en América mientras que el serogrupo A predomina en África y Asia (Harrison et al., 2009).

El serogrupo A, está relacionado con la mayor incidencia de EM causando pandemias y epidemias en diversas áreas geográficas del mundo, especialmente en África y en menor grado en China y Rusia. La zona subsahariana conocida como “el cinturón africano de la meningitis” fue descrita por Lapeyssonnie en 1963 comprendiendo, desde Etiopía hasta Senegal, incluyendo 18 países con una población de 300 millones de personas (Lapeyssonnie, 1963). Las características epidemiológicas de esta franja del continente africano son únicas, produciéndose ondas epidémicas cíclicas cada 5-10 años, condicionado por factores ambientales y por aspectos relacionados con

el huésped, tales como la desnutrición y la alta incidencia de enfermedades infecciosas (Molesworth et al., 2003). Estudios de epidemiología molecular y análisis genético sugieren que las cepas del serogrupo A causantes de estas epidemias son altamente clonales, apareciendo y diseminándose de forma rápida. Los complejos ST-1 CC (anteriormente conocido como subgrupo I) y ST-5 CC (subgrupo III) se han asociado con la expansión de la EM de forma pandémica. Cepas pertenecientes al complejo ST-1 CC ocasionaron epidemias en Europa, África, América, Asia y Oceanía. En los últimos 40 años se han producido tres ondas pandémicas causadas por el complejo ST-5 CC. La primera de ellas, se inició en China en los años 60 dispersándose a Europa del este, Rusia, Escandinavia y Brasil. La segunda, comenzó de nuevo en China y se extendió a Nepal y a la India, llegando hasta Arabia Saudí con el peregrinaje anual a La Meca, desde donde se introdujo en Europa, África y Estados Unidos. Desde mediados de los años 90, el ST-5 está siendo reemplazado en África por un nuevo clon del complejo ST-5 CC, el ST-7, produciendo una nueva onda epidémica (Nicolas et al., 2001).

El serogrupo B, es el más prevalente en la mayoría de los países industrializados, asociado a casos esporádicos con incidencias anuales de 1-5 casos/100.000 habitantes y también a brotes epidémicos con tasas de ataque de 5-50 casos/100.000 habitantes/año (Harrison et al., 2009). Los aislados de este serogrupo responsables de causar brotes se engloban dentro de una serie de complejos clonales como: ST-11 CC (ET-37), ST-32 CC (ET-5) y ST-41/44 CC (Dyet and Martin, 2006). Aislados del serogrupo B, resistentes a sulfamidas y pertenecientes al complejo ST-11 CC fueron responsables de una epidemia en campos militares durante la guerra de Vietnam. A mediados de los años 70, un clon perteneciente a un nuevo genotipo, el complejo ST-32 CC (ET-5), se extendió por toda Europa y América (Caugant, 1998). Desde entonces se han documentado numerosas variantes, con tres serosubtipos distintos responsables de epidemias en Noruega, Cuba y Chile. Tanto en Noruega como en Cuba se desarrollaron e implantaron vacunas frente a las variantes prevalentes en ambos países, conocidas como “cepa noruega” (B:15:P1.7,16) y “cepa cubana”

(B:4:P1.19,15) (Bjune et al., 1991; Sierra et al., 1991). Durante los años 90, componentes del complejo ST-41/44 CC desplazaron al complejo ST-32 CC convirtiéndose en responsables de la mayor parte de los casos de EM causada por el serogrupo B en muchos países europeos. Una variante de este complejo clonal, fenotípicamente B:4:P1.7b.4, ha sido la responsable de una onda hiperendémica en Nueva Zelanda, afectando a la población Maorí y de las islas del Pacífico (Maiden and Caugant, 2006).

Las cepas pertenecientes al serogrupo C, se relacionan con una elevada proporción de casos de enfermedad invasiva en adolescentes y en adultos jóvenes (Harrison et al., 2001). A finales de los años 80, emergió en Ontario (Canadá), un clon hiperinvasivo de cepas C:2a:P1.5,2, identificadas como ET-15, variante del ET-37 que reemplazaron a cepas endémicas B:2b, B:4 y B:15. Este clon ST-11 CC se dispersó internacionalmente en los años 90 causando brotes en diferentes países incluyendo España (Ashton and Caugant, 2001). Este hecho desencadenó la implantación de las vacunas conjugadas frente al serogrupo C, inicialmente en Reino Unido (Richmond et al., 2001) y posteriormente en numerosos países, entre ellos España en el año 2000 (Larrauri et al., 2005). De forma independiente, en España a finales de la década de los 90, se produjo una onda epidémica de EM con marcado aumento en los años 1996 y 1997 en la incidencia de casos causados por cepas C:2b. Estos aislados asociados predominantemente al complejo clonal A4, desplazaron al complejo ET-37 que había sido hasta entonces el predominante, volviendo a observarse un intercambio clonal entre ambos a partir del año 2000 (Alcala et al., 2002).

Entre los años 2000 y 2002, una nueva variante del complejo ST-11 CC fue responsable de un brote internacional de EM causado por serogrupo W135. Los casos comenzaron en Arabia Saudí, asociados con la peregrinación a La Meca extendiéndose a Europa y Estados Unidos, con una elevada tasa de ataque. Aunque la vacunación podía proteger a los peregrinos de enfermedad invasiva, los datos mostraron que éstos eran un reservorio importante, lo que ponía en riesgo de padecer enfermedad invasiva a sus contactos cercanos.

Desde el año 2000, han sido documentados en Europa, África, Asia y más recientemente en Sudamérica (Efron et al., 2009), casos de EM producida por el serogrupo W135, perteneciente al complejo ET-37 relacionado con el brote de La Meca (Aguilera et al., 2002).

Desde los años 90, cepas del serogrupo Y, pertenecientes al complejo ST-23 CC y a otros relacionados, han producido un aumento en los casos de EM en Estados Unidos, América del Sur e Israel, mientras que en Europa, el serogrupo Y se asocia casi exclusivamente a pacientes con deficiencias en la vía terminal del complemento (Racoosin et al., 1998).

El serogrupo X, está siendo el responsable de brotes localizados en algunas partes de África subsahariana como Níger (Djibo et al., 2003).

En España, al igual que en otros países occidentales, la infección meningocócica presenta carácter endémico, sucediendo cada cierto tiempo ondas epidémicas de duración variable. La penúltima de estas ondas, a finales de los 70, estuvo causada por cepas de serogrupo B con tasas de incidencia de hasta 17 casos/100.000 habitantes (Saez Nieto et al., 1981). En los años 80 se produjo un descenso, con incidencias de 2-3 casos/100.00 habitantes, siendo el serogrupo B el mayoritario (Vazquez et al., 1993). A partir del año 1993, se produjo un aumento en el número de casos producidos por el serogrupo C, y es en año 1995 cuando se detecta, fundamentalmente en Galicia y en Cantabria, un incremento en la incidencia global de EM, acompañado por un aumento en el número de casos producidos por cepas del serogrupo C. La caracterización fenotípica de las cepas permitió detectar un cambio en el serosubtipo predominante, siendo el más frecuente el C:2b:P1.2,5, considerado como un posible subclon o una variante genética de la antigua cepa epidémica C:2b:NST, identificada antes de 1993 (Berron et al., 1998). En el año 1996, ante la sospecha de estar ante el comienzo de una nueva onda epidémica, se emprendió la campaña de vacunación con vacuna polisacárida frente al serogrupo C, inicialmente en Galicia, Cantabria y La Rioja, ampliándose posteriormente a todas las Comunidades Autónomas. Se vacunó a toda la población entre 18 meses y 19 años, y en algunas Comunidades se incluyeron individuos más

susceptibles de padecer EM como aquellos con déficits de complemento e inmunodeficiencias. Aunque esta intervención tuvo un claro efecto en la reducción del número de casos, debido a limitaciones en la respuesta inmunológica, se detectó de nuevo un incremento paulatino en los niveles de tasas de ataque. Siguiendo el ejemplo de Reino Unido, en otoño del año 2000 se introdujo en el calendario vacunal la nueva vacuna conjugada frente al serogrupo C, hecho que ha modificado drásticamente la incidencia de la EM debida a este serogrupo (Vazquez, 2002).

## **2.2 Patogénesis**

La epidemiología y la patogénesis de la EM se basan en la interacción entre la virulencia de las cepas y de los diferentes grupos clonales, los factores que condicionan la transmisión del microorganismo, el estado de portador y la susceptibilidad del huésped humano.

### **2.2.1 Virulencia**

La virulencia de una cepa de meningococo podría definirse en relación al número de casos que produce en una población tras su adquisición y a la habilidad de la misma para multiplicarse en el huésped.

La mayoría de los casos de EM invasiva están asociados con aislados pertenecientes a un número limitado de líneas hipervirulentas, mientras que las cepas aisladas de portadores son mucho más heterogéneas y excepcionalmente asociadas a clones invasivos (Jolley et al., 2000). Los complejos clonales designados como ST-11 CC, ST-32 CC y ST-269 CC están asociados con enfermedad. Las cepas pertenecientes al ST-11 CC, mayoritariamente de serogrupo C, aunque también de serogrupos B y W135, no parecen ser capaces de establecer una relación comensal con el huésped siendo colonizadores muy pobres. En contraste, otros clones, como el ST-23 CC y cepas del serogrupo Y parecen estar frecuentemente adaptados a la colonización en nasofaringe. (Caugant et al., 2007).

*N. meningitidis* es altamente variable además de ser naturalmente competente mediante transformación, lo que le permite modificar su genoma al incorporar ADN de otras cepas de meningococo o procedente de otras especies relacionadas que están adaptadas a su medio, la nasofaringe. Este fenómeno puede ocurrir durante la fase de portador, cuando múltiples cepas de meningococo pueden compartir el mismo nicho ecológico junto con otra variedad de bacterias comensales (Stephens, 2007).

### **2.2.2 Estado de portador**

*N. meningitidis* es un patógeno exclusivamente humano que coloniza la mucosa del tracto respiratorio superior, la nasofaringe. La mayoría de los individuos están colonizados en algún momento de manera asintomática, con tasas de colonización entre el 10% y el 35%. La enfermedad invasiva, que ocurre de forma excepcional, suele desarrollarse normalmente cuando un huésped susceptible adquiere a la bacteria, en la mayoría de los casos sin haber estado en contacto con otro enfermo (Claus et al., 2005; Caugant et al., 2007).

Hay una serie de factores bien conocidos que se relacionan con el estado de portador meningocócico. Las tasas de portadores son más altas (pudiendo alcanzar cifras elevadas), en situaciones que faciliten la transmisión del microorganismo, como ocurre entre poblaciones con contacto más cercano como es el caso de la población militar, colegios o en otras actividades socio-culturales. Condiciones ambientales como la humedad también pueden afectar, ya que la sequedad de la superficie mucosa predispone a la colonización por la bacteria. La edad es otro factor que condiciona la tasa de portador, siendo más baja en los primeros años de vida (<3% en niños hasta 4 años), aumentado de nuevo en adolescentes, pudiendo alcanzar cifras próximas al 40% entre los 15-24 años y volviendo a declinar en adultos (Caugant et al., 1994). Los individuos con infecciones del tracto respiratorio, tanto de etiología vírica como bacteriana, son más susceptibles de ser portadores (Stephens, 1999). El hábito de fumar, es uno de los factores de riesgo más frecuentemente relacionados con el estado de

portador meningocócico, afectando también a los fumadores pasivos (Stuart et al., 1989).

Diferentes estudios sobre la duración del estado de portador muestran que puede mantenerse de forma crónica durante varios meses, bien ser transitorio o incluso intermitente. Esto puede venir condicionado por las características de las cepas, ya que éstas son capaces de mostrar diferente propensión a establecer una relación comensal a largo plazo. Existen evidencias que demuestran la asociación comensal a largo plazo de determinados clones con el huésped, manteniendo el mismo clon durante meses, como es el caso del ST-23 CC. En contraste, las cepas del complejo ST-11 CC que en pocas ocasiones se aíslan de individuos sanos, presentan tasas de transmisión elevadas que compensan su corta duración como colonizadoras (Moxon and Jansen, 2005). Del mismo modo que los complejos clonales relacionados con enfermedad invasiva no están uniformemente distribuidos por el mundo, los complejos que circulan en portadores asintomáticos difieren entre países, por lo que los índices de portadores no son buenos indicadores a la hora de predecir cambios en la epidemiología de la EM (Caugant et al., 2007).

El método convencional para el estudio de portadores asintomáticos de meningococo es el cultivo de exudado nasofaríngeo. Sin embargo, las tasas de portadores que se obtienen siguiendo este método dependen del número de muestras que se tomen y de la sensibilidad del cultivo (Yazdankhah and Caugant, 2004). En el trabajo realizado por Sim y colaboradores se mostró cómo las tomas nasofaríngeas pueden subestimar las tasas de portadores, ya que sólo fue posible detectar un 10% de portadores en pacientes tonsilectomizados, comparados con el 45% identificado mediante estudio inmuno-histoquímico del tejido amigdalario (Sim et al., 2000).

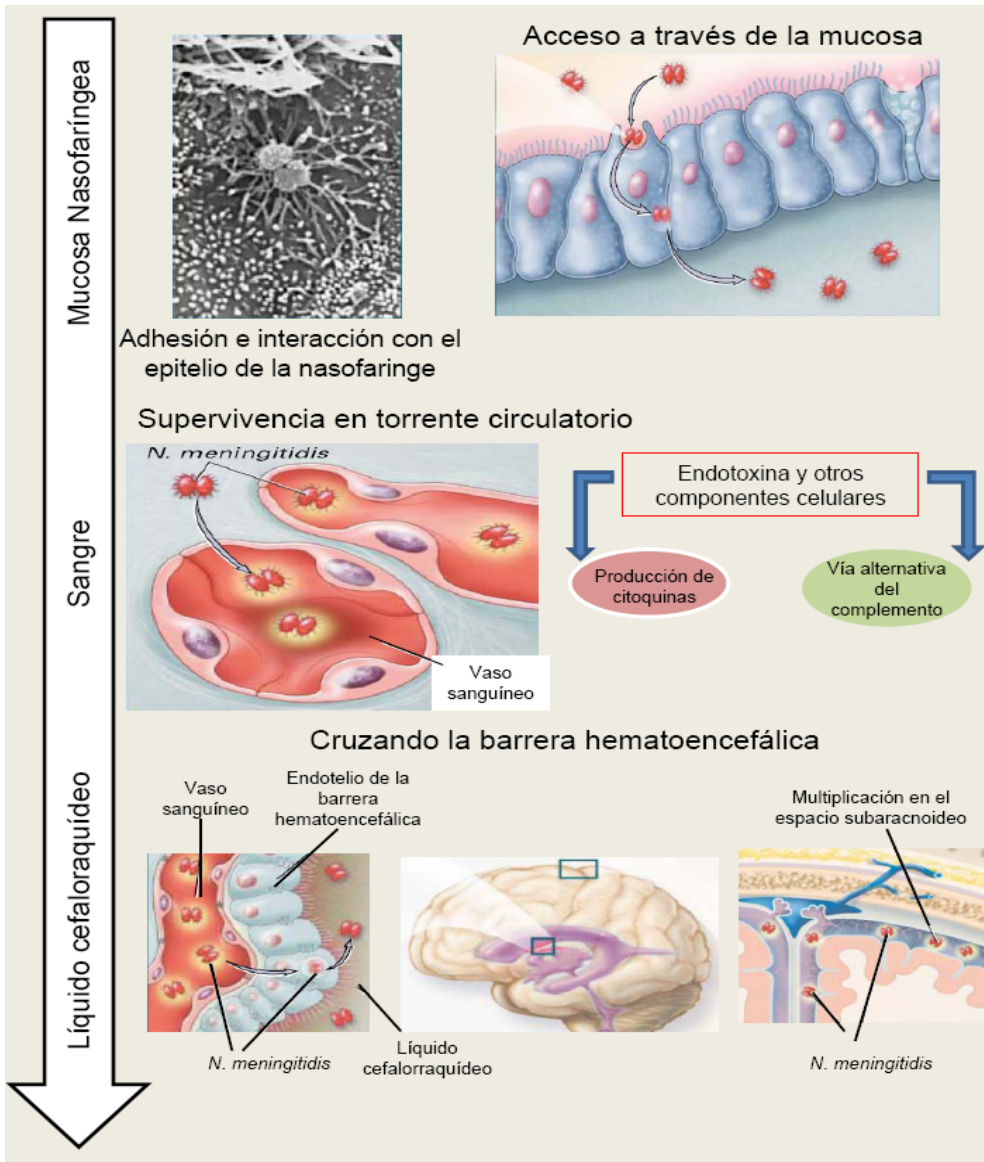
La exposición al meningococo a la que se ven sometidos los portadores asintomáticos, facilita el desarrollo de una respuesta inmune que los protege frente a la EM. Por una parte, el aumento de IgA juega un papel importante en la prevención de la invasión de las células epiteliales, y por otra el desarrollo de anticuerpos bactericidas frena la enfermedad invasiva (Caugant et al., 2007).

### 2.2.3 Mecanismos de transmisión e invasión

El meningococo se trasmite a través de aerosoles de secreciones respiratorias o de saliva, generalmente desde un individuo colonizado y asintomático a otro, por contacto directo. La adquisición de una cepa virulenta puede originar enfermedad invasiva en el transcurso de una semana, aunque en la mayoría de los casos el individuo permanecerá como portador asintomático.

La interacción entre *N. meningitidis* y el huésped comienza con la llegada de la bacteria a la nasofaringe, donde se fija a la superficie de las células epiteliales no ciliadas de la mucosa, multiplicándose y colonizando la misma (Stephens et al., 1983) (Figura 6). En este proceso inicial de adhesión, participan los pili uniéndose al receptor CD46, y las proteínas de membrana Opa y Opc. En la mayoría de los casos, la interacción entre la bacteria y su huésped se detiene en este punto de modo que el meningococo puede permanecer en la nasofaringe de forma asintomática, desde donde puede transmitirse y diseminarse entre diferentes individuos. Mientras que los pili y las adhesinas facilitan la adhesión y colonización, la cápsula previene el contacto íntimo entre la bacteria y las células epiteliales, favoreciendo que se produzca la transmisión a otro individuo. De manera excepcional, el meningococo atraviesa la barrera epitelial ganando acceso a la circulación sistémica a través de la cual se disemina, causando bacteriemia y enfermedad invasiva. La expresión de la cápsula, que protege a la bacteria de la fagocitosis y de la lisis mediada por el sistema del complemento, es crucial para la supervivencia del meningococo en el torrente circulatorio (Mackinnon et al., 1993; Vogel et al., 1996). La liberación de endotoxina y de otros componentes celulares estimula la producción de citoquinas, activándose la vía alternativa del complemento. *N. meningitidis* puede además colonizar la superficie de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, atravesar la misma y entrar en el espacio subaracnoideo, donde se multiplica y produce meningitis. Todos estos pasos invasivos son los responsables de las manifestaciones clínicas de la EM y se ven facilitados por los determinantes de virulencia, que permiten la multiplicación y diseminación de la bacteria así como la resistencia a la acción del sistema inmune.

**Figura 6: Mecanismos de colonización, transmisión e invasión utilizados por *N. meningitidis***



Adaptado de (Rosenstein et al., 2001).

#### **2.2.4 Susceptibilidad del huésped a la enfermedad meningocócica**

La ausencia de anticuerpos bactericidas protectores es el factor individual que probablemente más predispone al desarrollo de EM sistémica. La correlación directa entre la susceptibilidad a la enfermedad y la ausencia de anticuerpos bactericidas ha sido demostrada en estudios realizados con poblaciones militares, que presentaban niveles detectables de anticuerpos bactericidas y que eran frecuentemente portadores asintomáticos. La pérdida de los anticuerpos protectores maternos, demuestra el elevado riesgo que tienen los niños mayores de 3 meses de padecer enfermedad invasiva (Goldschneider et al., 1969a, b).

Deficiencias en el sistema del complemento pueden desencadenar una rápida, progresiva y fatal meningocemia, como ocurre en aquellos pacientes con déficit de properdina que es un componente de la vía alternativa del complemento. Las infecciones recurrentes por meningococo son más frecuentes en individuos con alteraciones en los componentes de la vía terminal del complemento (C5-C9) (Sjoholm et al., 1982; Fijen et al., 1999).

Polimorfismos en los genes que codifican el receptor Fc $\gamma$ -II (CD32), el receptor Fc $\gamma$ -III (CD16), la lectina de unión a manosa, el Toll-like receptor 4 (TLR4) y los niveles de inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-I), están asociados con elevado riesgo de sepsis meningocócica severa (Hibberd et al., 1999; Fijen et al., 2000; Read et al., 2001).

La EM está ocasionalmente relacionada con otras deficiencias del sistema inmune tales como el síndrome nefrótico, hipogammaglobulinemia, asplenia funcional o anatómica y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Aunque los individuos infectados por el VIH podrían padecer un riesgo 10 veces mayor de sufrir un caso esporádico, no se ha documentado un aumento de brotes epidémicos en aquellos países con elevadas tasas de infección por VIH (Stephens, 2007).

### 2.3 Aspectos clínicos de la enfermedad meningocócica

El meningococo causa una gran variedad de manifestaciones clínicas que pueden ir desde fiebre transitoria y bacteriemia oculta con rápida recuperación, hasta enfermedad fulminante con pronóstico muy grave, en ocasiones mortal a las pocas horas del inicio de los síntomas clínicos.

La meningitis, que se produce tras la diseminación hematogena de la bacteria y que puede ir acompañada de un cuadro séptico, es la presentación clínica más frecuente de la EM invasiva. El paciente presenta con frecuencia síntomas tales como: dolor de cabeza, fiebre, náuseas, vómitos, fotofobia, rigidez de nuca, signos positivos de Kernig's y Brudzinski y letargia. En niños pequeños, el comienzo puede ser más lento sin signos específicos y sin rigidez de nuca. En estos casos la fiebre, la falta de apetito y la irritabilidad ayudan a la sospecha clínica. Además, pueden ocurrir convulsiones hasta en el 20% de los casos pudiendo ser la causa de un primer episodio de epilepsia (Chin et al., 2006). Los enfermos con infección meníngea normalmente tienen una baja concentración bacteriana ( $<10^3$  UFC/ml) y de endotoxina ( $<3$  EU/ml) en plasma, en cambio presentan altas concentraciones de los mismos en LCR. Como consecuencia, se produce una elevada respuesta inflamatoria en el espacio subaracnoideo con un pronunciado aumento en la producción de interleuquinas, factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) y de otros mediadores de inflamación (Moller et al., 2005). El meningococo puede aislarse en sangre hasta en un 75% de los enfermos con meningitis, pero la sepsis meningocócica o meningococemia ocurre sólo entre un 5-20% de estos pacientes, siendo más frecuente en infecciones causadas por el serogrupo C y con mayor tasa de letalidad (Rosenstein et al., 2001).

La sepsis meningocócica, que puede cursar con o sin meningitis, suele iniciarse con fiebre repentina con desarrollo de una erupción maculopapular que pasa a ser petequial y que puede estar presente en el 80% de los pacientes (Nadel and Kroll, 2007). Estas petequias aparecen inicialmente tanto en las membranas mucosas como en las conjuntivas y después se diseminan al tronco y extremidades inferiores. En el shock meningocócico fulminante, las petequias

pueden confluir y formar áreas equimóticas de hemorragia y necrosis, que son indicadores de coagulopatías sistémicas. Alrededor del 10% de los enfermos en estado séptico desarrollan *purpura fulminans*, que resulta en una extensa destrucción tisular secundaria a la coagulopatía (Apicella, 2005), con daños isquémicos irreparables que pueden llevar a la amputación de alguna de las extremidades (Nadel and Kroll, 2007). El síndrome de Waterhouse-Friderichsen produce una necrosis hemorrágica aguda de las glándulas adrenales (Tzeng and Stephens, 2000). Pese a la instauración temprana de tratamiento antibiótico y medidas de soporte vital, la mortalidad en los casos de sepsis con meningitis puede llegar al 40% y hasta un 19% de los pacientes afectados presentan secuelas neurológicas o pérdida de algún miembro (Rosenstein et al., 2001). En estos cuadros fulminantes, el meningococo prolifera de forma rápida en la circulación con elevadas concentraciones en sangre ( $10^5$ - $10^8$  UFC/ml) (Brandtzaeg et al., 1989). La liberación del LPS desde la superficie de la bacteria en forma de OMVs, está considerada como el principal factor asociado a los elevados niveles de endotoxina en plasma ( $10^1$ - $10^3$  EU/ml) que se alcanzan en la sepsis meningocócica (Apicella, 2005).

El meningococo también puede producir bacteriemia aguda o crónica sin mayores complicaciones. En el caso de infección aguda transitoria, el enfermo presenta una sintomatología similar a una infección respiratoria de vías altas o a un proceso viral exantemático. En la mayoría de los casos se confirma el aislamiento del microorganismo en el hemocultivo cuando el paciente ya ha sido dado de alta. La bacteriemia crónica, es un proceso poco frecuente que puede durar desde semanas a meses. La presentación es similar al síndrome de artritis-dermatitis gonocócica, con fiebre intermitente, artralgias y erupción maculopapular inespecífica. Los síntomas pueden desaparecer durante días hasta que vuelven a aparecer con fiebre, dolor articular y signos de vasculitis (Harwood et al., 2005; Stephens et al., 2007).

Como resultado de la diseminación hematógica, *N. meningitidis* puede causar otras infecciones tales como: osteomielitis, artritis, celulitis, pericarditis, endoftalmitis y peritonitis. La neumonía meningocócica, asociada particularmente

a infecciones causadas por el serogrupo Y, puede ocurrir entre 5 al 15% de los casos de EM invasiva, siendo más frecuente en personas de edad avanzada y con alguna enfermedad de base. Se presenta como una neumonía adquirida en la comunidad y en algún caso puede no ser diagnosticada cuando se aísla al meningococo en muestras de esputo, confundiendo con un caso de portador (Winstead et al., 2000). También se ha comunicado la evidencia de miocarditis en un elevado porcentaje de los pacientes que fallecen por enfermedad EM. Se han documentado casos de conjuntivitis tanto en niños como en adultos, bien como una complicación de una infección sistémica o como una infección primaria y podría constituir una vía de entrada similar a la que representa la nasofaringe (Apicella, 2005). El meningococo también puede aislarse en el tracto genitourinario y anogenital produciendo infecciones indistinguibles de las gonocócicas tales como uretritis, cervicitis, salpingitis y proctitis (D'Antuono et al., 1999).

## **2.4 Diagnóstico microbiológico**

En el laboratorio, el diagnóstico microbiológico clásico de la EM se basa en el cultivo y aislamiento de *N. meningitidis* a partir de muestras clínicas, generalmente, LCR y sangre. El meningococo también puede recuperarse de otros especímenes tales como: biopsia de las petequias, exudado nasofaríngeo, exudado conjuntival, esputo y líquido sinovial. El aislamiento a partir de muestras estériles como el LCR y la sangre implica siempre confirmación de un caso clínico, mientras que la recuperación a partir de orofaringe se relaciona con un caso de portador en ausencia de síntomas. La interpretación de los aislamientos procedentes de muestras de esputo debe hacerse con cautela, pudiendo tratarse de contaminación orofaríngea y no de una neumonía (Janda and Knapp, 2003).

La tinción de Gram del sedimento del LCR permite realizar un diagnóstico presuntivo rápido, donde la bacteria se observa como un diplococo gramnegativo, con localización extracelular e intracelular en los neutrófilos polimorfonucleares (Dunbar et al., 1998). Mediante técnicas de aglutinación en látex o coaglutinación, que utilizan antiseros específicos, se pueden detectar

antígenos capsulares del meningococo en el LCR. La especificidad de la técnica es elevada siempre que no participen microorganismos que contienen antígenos reactivos cruzados como *E. coli* K1 y *N. meningitidis* serogrupo B. La sensibilidad puede variar, especialmente en los casos de serogrupo B, debido a la escasa inmunogenicidad del polisacárido capsular de este serogrupo (Janda and Knapp, 2003).

La morfología de las colonias, que suelen ser transparentes, no pigmentadas ni hemolíticas y con apariencia más mucosa en aquellas cepas que expresan más cápsula, ayuda a la identificación de los aislados que se confirma mediante pruebas bioquímicas.

Los métodos moleculares como la PCR, que permite amplificar secuencias de ADN específicas de *N. meningitidis* a partir de muestras clínicas, están siendo ampliamente usados. Ésta técnica proporciona mayor rapidez para la identificación en el caso de cultivos positivos y permite la detección en los casos en los que el cultivo es negativo, generalmente debido a la administración previa de antibióticos (Taha and Fox, 2007).

Adicionalmente al aislamiento e identificación del microorganismo en el laboratorio de microbiología clínica, la caracterización y tipificación de los aislados de meningococo, realizada generalmente en los laboratorios de referencia, es de esencial importancia en la vigilancia epidemiológica. Estos métodos fenotípicos y genotípicos de tipificación microbianos son de utilidad en el manejo de un brote y para analizar la evolución de las cepas a lo largo del tiempo.

## **2.5 Tratamiento de la enfermedad meningocócica. Mecanismos de resistencia antibiótica.**

Antes de que se iniciaran los tratamientos antimicrobianos, la mortalidad de los enfermos con EM sistémica se estimaba entre un 70-90% (Flexner, 1913). Aunque la introducción de los antibióticos cambió de manera espectacular el pronóstico de la EM, la mortalidad de la misma no se ha visto disminuida en las últimas décadas, manteniéndose en un 10% en los países industrializados (Goldacre et al., 2003).

Los primeros antibióticos utilizados con éxito en el tratamiento de la meningitis meningocócica y en la meningococemia fueron las sulfamidas (Schwentker, 1937). Las primeras cepas resistentes se describieron en el año 1963 en una epidemia ocurrida en California (Brown and Condit, 1965). Desde entonces, la resistencia a las sulfamidas ha ido en aumento, estimándose en la actualidad en más del 25% (Vazquez et al., 2001). Actualmente, no se utilizan ni en el tratamiento ni en la quimioprofilaxis de las infecciones meningocócicas.

A partir de los años 40, con el uso de la penicilina se obtuvieron los mismos resultados terapéuticos que con las sulfamidas. Aunque la penicilina ha sido considerada durante décadas un antibiótico seguro y efectivo frente a las infecciones producidas por *N. meningitidis*, su uso en los últimos años se ha visto condicionado por la aparición de cepas que presentan resistencia intermedia (Pen<sup>I</sup>). Desde su descripción a finales de la década de los 80 (Saez-Nieto et al., 1987; Sutcliffe et al., 1988), la frecuencia de estas cepas Pen<sup>I</sup> ha ido en aumento, con un elevado número de casos documentados a nivel mundial (Arreaza and Vazquez, 2000; Richter et al., 2001; Tapsall et al., 2001; Vazquez et al., 2001). El mecanismo de resistencia se debe a la disminución de la afinidad por la penicilina de la proteína fijadora de penicilina 2 (PBP2), codificada por el gen *penA*, como consecuencia de la formación de genes en mosaico que podrían derivar de la transformación con ADN procedente de especies comensales del género *Neisseria* y que colonizan la nasofaringe (Antignac et al., 2001b; Saez-Nieto et al., 1992). Hasta el momento sólo se han documentado cinco aislados

con elevada resistencia a penicilina (Dillon et al., 1983; Botha, 1988; Fontanals et al., 1989; Vazquez et al., 1996). En este caso, el mecanismo de resistencia se debe a la producción de una  $\beta$ -lactamasa plasmídica, generando una concentración mínima inhibitoria (CMI) a penicilina de 4  $\mu\text{g/ml}$  a  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ .

En la actualidad las cefalosporinas de tercera generación, ceftriaxona y cefotaxima, son los fármacos más utilizados en el tratamiento de la EM al demostrar una excelente eficacia *in vitro*, alcanzando concentraciones adecuadas en el sistema nervioso central como para tratar la infección meníngea (Apicella, 2005). De momento no se han descrito casos de resistencia cruzada ni correlación alguna entre aislados con sensibilidad disminuida a penicilina y resistencia a las cefalosporinas.

El cloranfenicol, sigue siendo utilizado en los países en vías de desarrollo y además constituye una alternativa de elección en pacientes alérgicos a fármacos  $\beta$ -lactámicos (Apicella, 2005). Se han descrito cepas resistentes al cloranfenicol debido a la producción de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), mediada por el gen *catP* (Galimand et al., 1998; Shultz et al., 2003).

Los métodos de referencia para el estudio de sensibilidad de un aislado de *N. meningitidis* son la microdilución en caldo Muller-Hinton y la dilución en agar Muller-Hinton, ambos suplementados con sangre de caballo. Así mismo, el método de E-test puede ser utilizado para determinar la sensibilidad de aislados individuales, especialmente en los laboratorios de microbiología clínica. La definición de los puntos de corte se estableció en el año 2005 por parte del Instituto para los Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), con especial controversia en los puntos de corte para la penicilina. Mientras que hasta entonces la resistencia a penicilina era definida con CMIs  $> 2 \mu\text{g/ml}$ , el CLSI estableció como punto de corte una CMI  $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$  y la sensibilidad a cefotaxima y ceftriaxona con CMIs  $\leq 0,12 \mu\text{g/ml}$  (Vazquez, 2007).

Se han desarrollado técnicas moleculares basadas en la metodología de PCR, para la detección y caracterización de aislados con sensibilidad disminuida a penicilina (Antignac et al., 2001a; Stefanelli et al., 2003).

### **3 Interacción entre *N. meningitidis* y el sistema del complemento**

#### **3.1 Aspectos generales del sistema del complemento**

El sistema del complemento se describió por primera vez en 1890 por Nuttal y cols como un componente termolábil del suero (Walport, 2001). Se denominó complemento cuando Paul Ehrlich lo describió en 1899 como “acción complementaria” a los anticuerpos para destruir microorganismos. De hecho, se considera que el sistema del complemento es la parte más antigua del sistema inmune ya que a diferencia del sistema inmune adaptativo, se encuentra tanto en vertebrados como en invertebrados (Nonaka, 2001).

El sistema del complemento está compuesto aproximadamente por unas 30 proteínas que circulan en plasma y por varias proteínas asociadas a receptores de membrana. La activación del sistema del complemento está mediada por tres vías diferentes, iniciándose bien por la vía clásica o por la vía de las lectinas y amplificándose por la vía alternativa. Cada una de las vías comprende una serie de pasos proteolíticos que permiten la activación en cascada de los factores del complemento. En ausencia de regulación negativa, las tres vías convergen en la formación del componente C3b que es el componente clave del complemento. El depósito de C3b en la superficie de un microorganismo permite la eliminación del mismo mediante la inducción de fagocitosis aunque también en algunos casos, como ocurre en *N. meningitidis*, es capaz de activar la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) en la superficie microbiana que participa en la lisis de la bacteria (Walport, 2001).

El sistema del complemento tiene varias funciones: en primer lugar, permite la opsonización de microorganismos con o sin la lisis de los mismos; por otro lado, reconoce anticuerpos creando una conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa al activar la respuesta inmunológica celular; por último, el sistema del complemento también contribuye a la respuesta inflamatoria. Para ello, la formación de los componentes C3 y C5 genera pequeños péptidos (C3a y

C5a) que son moléculas pro-inflamatorias que atraen a las células fagocíticas al sitio de infección y regulan respuestas inflamatorias. El componente C5a es más potente en cuanto a atracción de neutrófilos y monocitos, mientras que el C3a desencadena la liberación de enzimas lisosomales así como la secreción de histamina procedente de mastocitos (Gasque, 2004). El componente C3a también participa en la migración de eosinófilos y mastocitos. Aunque C3a es una anafilotoxina mucho menos potente que C5a, puede alcanzar concentraciones hasta 20 veces más elevadas que C5a (Sahu and Lambris, 2001). Por último, se ha demostrado que C3a posee actividad antimicrobiana al destruir bacterias grampositivas y gramnegativas (Nordahl et al., 2004).

### **3.1.1 Vía clásica**

La vía clásica, que fue la primera vía del complemento en descubrirse, se activa principalmente debido a la unión de los anticuerpos a los antígenos, mediante unión y activación del complejo C1 que está formado por los componentes C1q, C1r y C1s. El componente C1q incluye seis subunidades cada una de las cuales contiene un dominio de tipo colágeno donde C1r y C1s interaccionan y un dominio globular que es el que se une a la molécula diana (Ziccardi, 1983). El complejo C1 puede unirse a las bacterias directamente a través del LPS, mediante unión a proteínas de fase aguda o por la unión a inmunoglobulinas IgM o IgG (Loos, 1982a, b; Yuste et al., 2007). Una vez que ocurre la unión, suceden cambios conformacionales en C1q que producen la auto-activación del C1r que subsecuentemente activa al C1s, permitiendo que el complejo C1 desencadene la producción de C4 y posteriormente de C2, para generar C4b2a que es la convertasa del componente C3 de la vía clásica (Haines and Lepow, 1964). Esta convertasa de C3 se encarga de que el C3 activo genere C3b que es capaz de unirse a la superficie del patógeno. El componente C1q también es capaz de reconocer determinados patógenos y eliminar complejos inmunes al unirse al receptor 1 del complemento (CR1) (Klickstein et al., 1997).

### 3.1.2 Vía de las lectinas

La vía de las lectinas se inicia cuando lectinas de unión a manosa (MBL) o ficolinas se unen a carbohidratos que contienen azúcares del tipo N-acetilglucosamina o a residuos de manosa de una forma dependiente de calcio (Fujita et al., 2004). Las MBL, también denominadas colectinas, son lectinas de tipo C que forman interacciones múltiples, cuya estabilidad depende de la distribución y la geometría de los azúcares (Sim and Laich, 2000). Tanto las MBL como las ficolinas forman complejos con serin proteasas tipo 2 (MASP-2) que permiten la formación de C4 y C2, originando posteriormente la misma convertasa de C3 producida a partir de la vía clásica (Matsushita and Fujita, 1992; Thiel et al., 1997). Aunque hasta el momento se han descrito tres serin proteasas diferentes, solamente MASP-2 se ha demostrado que participa en la vía de lectinas. MASP-1 es una proteasa incapaz de originar C4 y C2 mientras que la función de MASP-3 es desconocida (Sim and Laich, 2000). Debido a que las MBL tienen una estructura muy similar a C1q, se ha sugerido que también pueden unirse al receptor 1 del complemento (Ghiran et al., 2000).

### 3.1.3 Vía alternativa

Durante mucho tiempo, la vía alternativa no se consideró como una de las vías del complemento debido a que para su activación no es necesario que se reconozcan moléculas específicas. Esta vía amplifica la activación del complemento iniciada a partir de la vía clásica o de la vía de las lectinas (Muller-Eberhard, 1988). El componente C3 está compuesto por cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas mediante un puente disulfuro y un enlace tioéster altamente reactivo. La vía alternativa se activa espontáneamente mediante la hidrólisis del enlace tioéster que origina las formas C3 (H<sub>2</sub>O) o C3b (Pangburn and Muller-Eberhard, 1983). C3b es capaz de unirse de forma covalente a las superficies de los patógenos una vez que el enlace tioéster queda expuesto (Law et al., 1979). En presencia de iones de magnesio, el factor B se une a la superficie a la que se une C3b y por mediación del factor D, se origina la formación de la convertasa de C3 a partir de la vía alternativa denominada C3bBb. El regulador positivo de la vía

alternativa denominado properdina, estabiliza la convertasa C3bBb y prolonga su actividad. Posteriormente, la formación de C3 a partir de la convertasa de la vía alternativa libera más C3b, originando la amplificación de la activación del complemento. La vía alternativa tiene una débil aunque constante activación pero en determinadas condiciones, los reguladores negativos pueden interaccionar con el componente C3b para prevenir la formación de la convertasa C3bBb y de este modo prevenir fenómenos de autoinmunidad para evitar que el sistema del complemento reaccione contra las células del huésped.

### **3.1.4 Activación del componente C3b y formación del complejo de ataque a la membrana**

El componente C3b juega un papel clave en la inmunidad mediada por el sistema del complemento ya que es el componente en el que convergen las tres vías del complemento. Una vez que se ha formado el componente C3b, es capaz de actuar como una opsonina al reconocer los microorganismos e inducir la fagocitosis a través del receptor del complemento CR1. Por otro lado, el componente iC3b que es un componente originado de la hidrólisis de C3b, también es capaz de inducir fagocitosis a través de los receptores del complemento CR3 y CR4. Para la mayoría de los microorganismos, la fagocitosis es el principal mecanismo del huésped para su eliminación. Sin embargo, en el caso de *N. meningitidis*, la bacteriolisis inducida tras la formación del MAC es primordial para la eliminación del meningococo y parece tener mayor importancia que la fagocitosis (Figueroa et al., 1993).

Una vez que se ha formado el componente C3b, éste es capaz de unirse a las convertasas de C5 (C4b2a3b y C3bBb3b) dando lugar al componente C5. Posteriormente, C5 puede originar el componente C5a que es una potente anafilotoxina, y el componente C5b que es el componente que inicia la formación del MAC. Para ello, es necesario que se produzca de forma rápida la unión de los componentes C5b y C6 ya que de lo contrario, cambios conformacionales en C5b impedirían la posterior formación del MAC. Una vez que se ha formado el complejo C5b-6, adquiere naturaleza hidrofóbica al unirse

el componente C7 de modo que el nuevo complejo formado (C5b-7), de carácter hidrofóbico, es capaz de insertarse en la bicapa lipídica que constituye la membrana externa de la bacteria (DiScipio et al., 1988). Posteriormente, se inserta el componente C8 que es el que regula el número de moléculas de C9 que polimerizan en la membrana. Se cree que es necesario entre seis y nueve moléculas de C9 para que se origine un poro que altere la estructura de la membrana bacteriana y de este modo se produzca la lisis celular, aunque el tamaño del poro varía en función del número de moléculas de C9 que participen en la formación del mismo (Podack and Tschopp, 1982).

### **3.1.5 Reguladores del sistema del complemento**

La activación descontrolada del sistema del complemento es un fenómeno nocivo para el huésped y por ello, debe estar estrechamente regulado para limitar la formación de C3b o prevenir la inserción del MAC. La regulación está mediada a partir de componentes solubles localizados en el plasma y de proteínas asociadas a membranas celulares.

Los reguladores solubles como la proteína de unión a C4 (C4BP), fH y el inhibidor de C1 (C1INH) que están presentes en el plasma y en las superficies mucosas, regulan de forma negativa la activación del complemento al reducir la producción de convertasas de C3.

El principal regulador negativo de la vía clásica y de la vía de las lectinas es C4BP que se une a C4b y actúa como un cofactor junto al factor I (fI) en la ruptura de C4b a C4d que es hemolíticamente inactivo. Además, C4BP puede producir una disociación irreversible de la convertasa de C3 de la vía clásica (C4b2a) inactivando de este modo la vía clásica y la vía de las lectinas (Blom et al., 2003).

El fH, principal regulador negativo de la vía alternativa, controla la activación del sistema del complemento mediante 3 mecanismos. Por un lado, actúa como un cofactor del fI en la ruptura e inactivación de C3b a iC3b. También participa en la inactivación de la vía alternativa al disociar la convertasa de C3 de la vía alternativa (C3bBb) en C3b y factor Bb. Por último, el fH es capaz de

competir con el factor B por unirse a C3b inactivando también de esta forma la activación de la vía alternativa.

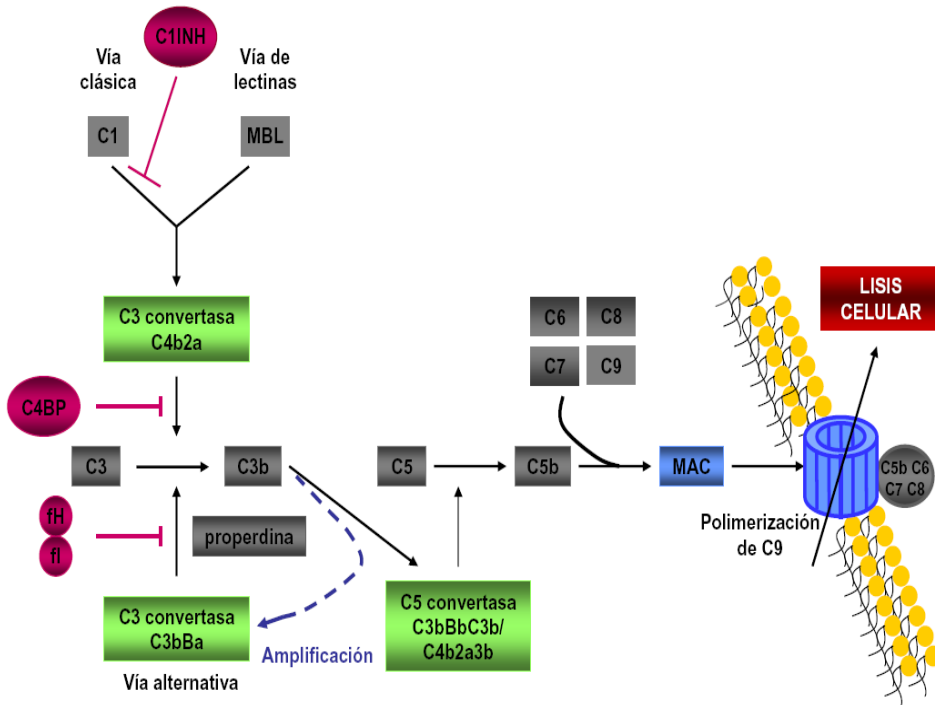
La proteína S (también denominada vitronectina) y la proteína clusterina, son proteínas plasmáticas que inhiben la inserción del complejo C5b-7 a la superficie celular y la polimerización de C9, evitando la formación del MAC y bloqueando de este modo la activación de la vía terminal del sistema del complemento.

Existen otros reguladores negativos del complemento que son receptores asociados a membranas de las células huésped como son: CR1, CD46, CD55 y CD59. El CD46, receptor del Tpf (pili tipo IV), funciona como cofactor para la inactivación de C3b y C4b por el fl. Su importancia en la patogénesis de la EM se ha demostrado en estudios con ratones que expresaban una isoforma de CD46 y que eran más susceptibles de padecer enfermedad sistémica comparados con los controles (Johansson et al., 2003).

La properdina, es el único regulador positivo del sistema del complemento que se conoce hasta el momento. Aunque su concentración en plasma es baja, es esencial para la activación de la vía alternativa del complemento ya que esta proteína es capaz de estabilizar la convertasa C3bBb.

La Figura 7 representa un esquema de la activación y regulación de las tres vías del sistema del complemento en *N. meningitidis*, con la formación e inserción del MAC en la superficie de la bacteria.

**Figura 7: Activación y regulación del sistema del complemento en *N. meningitidis***



Adaptado de (Schneider et al., 2007).

### **3.2 Deficiencias en factores del complemento asociadas con la infección meningocócica**

La importancia del sistema del complemento en la inmunidad innata frente a la infección meningocócica se demuestra por el hecho de que individuos con deficiencias genéticas en componentes del complemento presentan una elevada susceptibilidad para padecer EM (Figuroa et al., 1993).

La deficiencia en C3, componente clave del sistema de complemento, a pesar de no ser muy común, está asociada con mayor riesgo para padecer infecciones por bacterias como *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

La deficiencia en MBL, que es una de las inmunodeficiencias congénitas más comunes, observada en un 5% de la población y hasta un 35% puede ser portadora de variantes alélicas que pueden causar descenso de las concentraciones séricas de MBL, afectando a la activación de la vía de las lectinas y en consecuencia aumentando la susceptibilidad a la infección meningocócica, particularmente en la infancia (Garred et al., 2003).

El desarrollo de EM también se ha asociado con déficits en la activación de la vía alternativa del complemento. Individuos con deficiencias en properdina o en el factor D, pueden tener hasta 250 veces más riesgo de sufrir EM (especialmente las causadas por serogrupos W-135 e Y), que además se correlacionan con una elevada mortalidad (Figuroa and Densen, 1991; Sjöholm et al., 2006). Se ha descrito que la presencia de ciertos polimorfismos en la región promotora del gen que codifica el fH, principal regulador de la vía alternativa, está asociado a un mayor riesgo de desarrollar EM debido al aumento en el suero de esta proteína, disminuyendo de este modo la actividad bactericida del suero (Haralambous et al., 2006).

Individuos con deficiencias en los componentes que forman el MAC (C5-C9), tienen hasta 10.000 veces más riesgo de desarrollar EM que la población normal y además, la mitad de ellos suelen presentar infecciones recurrentes, frecuentemente en la edad adolescente y causadas por los serogrupos W-135 e

Y (Pollard and Scheifele, 2001; Sjöholm et al., 2006). A pesar del elevado riesgo que presentan estos individuos para padecer EM, el curso de la infección es más benigno y la mortalidad es más baja si se compara con la población general. Esto se cree que es debido a que una disminución en la actividad lítica del complemento genera una menor liberación de productos bacterianos, como el LPS y peptidoglicano, responsables de la liberación de citoquinas (Schneider et al., 2007).

### **3.3 Mecanismos moleculares de resistencia al suero en *N. meningitidis***

La evasión de la lisis bacteriana mediada por el sistema del complemento es necesaria para la supervivencia del meningococo en la circulación sistémica y para la diseminación de la infección. *N. meningitidis* ha desarrollado numerosas estrategias para evadir la acción del complemento.

La presencia de anticuerpos bactericidas del suero frente a la cepa infectante se considera como uno de los factores de defensa del huésped más importantes frente a la EM invasiva (Goldschneider et al., 1969a, b). Estos anticuerpos bactericidas se adquieren durante la fase de colonización de la nasofaringe por el meningococo o por especies comensales como *N. lactamica*, que expresa epítomos en su superficie que inducen reacción cruzada con *N. meningitidis* (Troncoso et al., 2002). La disminución de la actividad bactericida en niños pequeños, debido al descenso de los niveles de anticuerpos maternos adquiridos pasivamente, es una de las principales causas por las que la población infantil presenta elevadas tasas de EM (Goldschneider et al., 1969a).

Las principales estructuras de superficie de *N. meningitidis* que confieren resistencia a la actividad bactericida del suero son el LPS y el polisacárido capsular. De hecho, los genes responsables de la supervivencia del meningococo en presencia de suero humano están implicados en la biosíntesis de la cápsula o del LPS (Geoffroy et al., 2003).

El LPS desempeña un papel importante en la evasión del sistema inmune, requiriéndose su expresión para evitar la lisis de la bacteria mediada por

el complemento (Hammerschmidt et al., 1994; Kahler et al., 1998). Basándose en su diversidad estructural, particularmente de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , se han descrito diferentes inmunotipos expresados por *N. meningitidis*. La estructura de lacto-N-neotetraosa (LNnT) de la cadena  $\alpha$  mimetiza con glicoesfingolípidos humanos constituyentes de los antígenos de los grupos sanguíneos, lo que le sirve al meningococo para escapar a la acción inmune (Mandrell et al., 1988).

Los inmunotipos L3, L7, L9, L2 y L5 pueden ser modificados estructuralmente mediante la adición de ácido siálico a la galactosa terminal de la cadena  $\alpha$ . Este ácido siálico puede ser sintetizado de manera endógena en los serogrupos B, C, W-135 e Y o ser obtenido a partir del medio externo, como ocurre en *N. gonorrhoeae* (Parsons et al., 1988; Mandrell et al., 1991). En el caso del gonococo está claramente demostrado que la modificación del LPS mediante sialización incrementa la resistencia al suero al evadir la acción del complemento. La unión del fH al LPS sializado, aumenta la hidrólisis e inactivación de C3b a iC3b mediante el fI (Ram et al., 1998). El efecto de la sialización del LPS en la resistencia al suero en *N. meningitidis* es más ambiguo. Algunos estudios con aislados clínicos de serogrupo C, demostraron que el grado de sialización del LPS se correlacionaba con su nivel de resistencia al suero (Estabrook et al., 1997) y contribuía a que se desarrollara bacteriemia en un modelo experimental utilizando ratas jóvenes (Vogel et al., 1996). La sialización del epítipo LNnT parece enmascarar a las proteínas de superficie Opa y Opc, lo que potencia la resistencia del meningococo frente a la opsonofagocitosis llevada a cabo por los neutrófilos humanos y a la fagocitosis por las células dendríticas (Unkmeir et al., 2002). En estudios realizados en serogrupo B, la contribución de la sialización del LPS a la resistencia al suero no está tan clara, donde los mutantes en *Ist* no mostraban mayor sensibilidad al suero comparando con la cepa salvaje (Tsai et al., 1987) o tan sólo en presencia de altas concentraciones de suero (Vogel et al., 1999). La diferencia en la contribución de la sialización a la resistencia al suero entre el gonococo y el meningococo no está por el momento muy clara, pero podría deberse a diferencias en la expresión de la sialiltransferasa (Packiam et al., 2006) o a condiciones de crecimiento de la bacteria (Exley et al., 2005).

Se ha visto que alteraciones estructurales en la molécula del LPS, debidas a mutaciones en el gen *galE*, convierte a la bacteria en más sensible a la acción del complemento incluso en presencia de cápsula (Estabrook et al., 1997; Vogel et al., 1997a). Aunque el mecanismo por el que esto ocurre no está muy claro, podría deberse a cambios en las cargas de la superficie bacteriana o a una alteración en la unión covalente del C4b al LPS (Figura 8). Deficiencias en la isoforma de esta convertasa de C3, generan mayor predisposición a padecer infecciones por microorganismos encapsulados (Bishof et al., 1990).

La cápsula es un factor de virulencia esencial para el meningococo, la mayoría de los aislamientos a partir de sangre y LCR de pacientes con EM presentan cápsula mientras que entre un 30 y un 70% de las cepas aisladas de portadores no son capsuladas (Ala'Aldeen et al., 2000; van Deuren et al., 2000). Se desconoce el motivo por el que determinados serogrupos producen enfermedad mientras que otros se asocian más frecuentemente con estados de portador. Podría ser debido a que las cápsulas de aquellas cepas que causan enfermedad posean propiedades inherentes que les confieran supervivencia en la circulación sistémica. Es interesante remarcar que los polisacáridos capsulares de los principales serogrupos causantes de enfermedad, a excepción del serogrupo A, están compuestos por ácido siálico. El ácido siálico está presente en las células endoteliales humanas y en los eritrocitos e inhibe la cascada del complemento en el compartimento vascular. Se ha demostrado que aquellas cápsulas que contienen ácido siálico en la superficie del meningococo intervienen en la regulación negativa de la vía alternativa del complemento, reduciendo en consecuencia la amplificación del depósito de C3b, y previniendo la inserción del MAC en la membrana externa de la bacteria (Jarvis and Vedros, 1987; Ram et al., 1999) (Figura 8). Diversos estudios en animales de experimentación con cepas del serogrupo B y C, confirman que la encapsulación es crucial para evadir al sistema del complemento durante la infección sistémica y que la pérdida de expresión de la cápsula como consecuencia de la inactivación del gen *siaD*, origina mutantes más sensibles a la acción del complemento (Frosch et al., 1990; Mackinnon et al., 1993).

El polisacárido capsular de los serogrupos A, C, W-135 e Y puede ser modificado mediante O-acetilación, pero hasta el momento se desconoce el efecto que produce esta modificación sobre la sensibilidad al suero de las cepas.

La capacidad para producir cápsula y LPS es fundamental para la supervivencia del meningococo frente a la acción del sistema inmune innato. El estado nutricional del meningococo, con una adecuada disponibilidad de sustratos, afecta a la expresión de los factores de virulencia y demuestra la estrecha asociación entre el metabolismo de la bacteria y la resistencia a la lisis mediada por el complemento. Se ha visto que la sialización aumenta en presencia de lactato exógeno, que es una fuente energética de carbono que está presente en sitios ocupados por la bacteria durante la infección (Smith et al., 2001). La adquisición de lactato por *N. meningitidis* también contribuye a la protección frente al complemento, a través de la biosíntesis del ácido siálico necesario para la síntesis de la cápsula y para la sialización endógena del LPS (Exley et al., 2005).

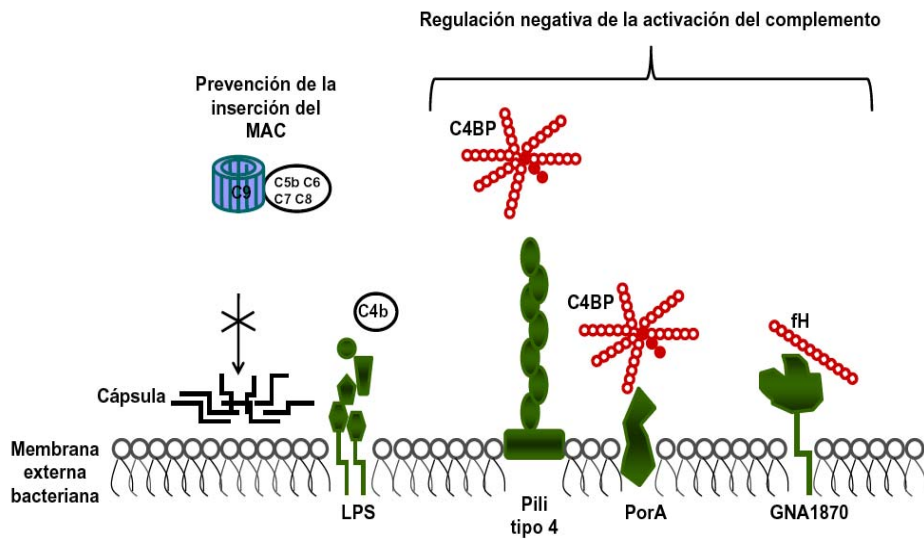
*N. meningitidis*, al igual que otros patógenos, presenta la capacidad de reclutar y de unirse a reguladores negativos del complemento que promueven su supervivencia *in vivo*.

La unión del regulador negativo de la vía clásica C4BP a PorA, se ha sugerido como otro posible mecanismo de resistencia al suero en *N. gonorrhoeae* (Ram et al., 2001). En el caso de *N. meningitidis*, también se ha observado que C4BP es capaz de unirse a PorA afectando a la activación del complemento (Figura 8). Cepas deficientes en PorA son más sensibles al suero y unen hasta un 76% C4BP menos que la cepa salvaje (Jarva et al., 2005).

La unión al fH, es de especial interés ya que recientemente se ha descrito que este regulador de la vía alternativa del complemento es capaz de unirse a la lipoproteína de superficie de *N. meningitidis*, GNA 1870, permitiendo al meningococo incrementar su capacidad para sobrevivir en presencia de suero humano (Madico et al., 2006; Schneider et al., 2006) (Figura 8). Esta unión es de gran relevancia ya que esta lipoproteína está presente en todas las cepas de meningococo analizadas y podría utilizarse como candidata a vacuna.

La Figura 8 describe los principales mecanismos utilizados por el meningococo para regular la activación del complemento: el polisacárido capsular que previene la inserción del MAC, la expresión del LPS, la unión de los reguladores C4BP y fH a las proteínas PorA y GNA 1870, respectivamente. Todos ellos contribuyen a la una mayor supervivencia de la bacteria en el suero.

**Figura 8. Mecanismos que contribuyen a la resistencia de *N. meningitidis* frente a la lisis mediada por el complemento**



Adaptado de (Schneider et al., 2007).

## 4 Profilaxis de la infección meningocócica

Ante la aparición de un caso de EM se aplican medidas basadas en la quimioprofilaxis para prevenir la aparición de casos secundarios. El desarrollo e implantación de vacunas eficaces frente a los serogrupos implicados en clínica constituye la clave para el control efectivo de la enfermedad.

### 4.1 Quimioprofilaxis

La quimioprofilaxis se basa en el empleo de antibióticos para romper la cadena de transmisión, evitando la difusión de cepas virulentas desde portadores sanos a población susceptible, y para impedir la adquisición del microorganismo por parte de individuos en contacto estrecho con un caso.

Los primeros antibióticos empleados fueron las sulfamidas, cuyas ventajas eran su elevada eficacia, facilidad de administración y bajo coste. La aparición de resistencias motivó la búsqueda de otros fármacos que pudieran sustituirlas.

La penicilina se ha ensayado sin éxito por varias razones: las preparaciones de acción prolongada no erradican el estado de portador y, si bien a dosis elevadas puede eliminar al meningococo de nasofaringe, el estado de portador recidiva después de suspender el fármaco (Artenstein et al., 1967). Así, es importante tener en cuenta que aquellos pacientes con EM que sólo han recibido tratamiento con penicilina, pueden seguir siendo portadores de la cepa patógena y por ello, deben ser objeto de quimioprofilaxis para evitar la transmisión posterior (Saez-Nieto et al., 1982).

En 1970 Devine y colaboradores, utilizaron por primera vez la rifampicina, observándose una elevada eficacia en la eliminación del estado de portador de *N. meningitidis*. La rifampicina sigue siendo el antibiótico de elección en la profilaxis antimeningocócica (600 mg/12horas durante 2 días en adultos y 10 mg/12 horas durante 2 días en niños). Entre las limitaciones de su uso cabe destacar la rápida aparición de resistencias y su contraindicación en el embarazo debido a su potencial carácter teratógico (Riedo et al., 1995).

El ciprofloxacino y la ceftriaxona son otros antibióticos adecuados para la reducción de la tasa de portadores de meningococo.

El ciprofloxacino reduce la tasa de portador en más de un 90% (500 mg en dosis única en adultos), pero está contraindicado en niños y en embarazadas (Dworzack et al., 1988) y además se han descrito algunos aislados con sensibilidad disminuida (CMI 0,06 µg/ml) y otros resistentes (CMI  $\geq$  0,12 µg/ml). Los principales mecanismos de resistencia se deben a mutaciones puntuales en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDRs) y particularmente a cambios en la proteína GyrA (Enriquez et al., 2008).

La administración de ceftriaxona en dosis única (250 mg en adultos y 125 mg en niños) muestra una alta eficacia para eliminar el estado de portador con la ventaja añadida de que puede ser utilizada tanto en gestantes como en población pediátrica (Judson and Ehret, 1984).

Ante la notificación de un caso de EM, se debe intervenir de forma precoz mediante una adecuada quimioprofilaxis para reducir el riesgo de que los contactos estrechos desarrollen enfermedad. Éstos, presentan un riesgo hasta 800 veces mayor que el resto de la población, especialmente los siete primeros días tras la aparición del caso índice. El personal hospitalario, en general, no debe recibir quimioprofilaxis, exceptuando al personal médico que haya tenido una exposición íntima como por ejemplo, maniobras de reanimación.

## **4.2 Inmunoprofilaxis: vacunas frente a *N. meningitidis***

Las primeras experiencias de inmunoprofilaxis frente a *N. meningitidis* se llevaron a cabo a principios del siglo XX con el uso de vacunas de microorganismos muertos o agentes químicos, aunque no tuvieron aceptación debido a su escasa eficacia, elevada toxicidad y al éxito logrado con el empleo de las sulfamidas. El objetivo de la vacunación antimeningocócica se reanudaría al desarrollarse mecanismos de resistencia a dichos antibióticos. En los últimos 80 años se ha trabajado con el fin de desarrollar vacunas efectivas frente al meningococo, basadas en las principales estructuras de superficie de la bacteria que generan respuesta inmune. Se han desarrollado vacunas diseñadas con

polisacárido capsular purificado, polisacárido conjugado a proteínas, proteínas de membrana externa, y la reciente metodología denominada vacunología inversa (Harrison, 2006).

#### **4.2.1 Parámetros subrogados de protección**

Los parámetros subrogados de protección son parámetros séricos que pueden predecir de forma consistente la inmunidad y que han sido utilizados en los estudios previos a la comercialización de vacunas, siendo esenciales para evaluar la eficacia de las mismas.

Hasta el momento, la actividad de los anticuerpos bactericidas del suero (SBA) ha resultado ser el mejor parámetro subrogado de protección para todos los serogrupos de *N. meningitidis*. La medida del título de SBA se lleva a cabo en ensayos en los cuales, diluciones seriadas de suero humano se incuban con la bacteria en presencia de complemento. Los anticuerpos específicos frente al meningococo se unen a la superficie del mismo mientras que el componente C1q del complemento se une a la fracción Fc de los anticuerpos. Todo ello produce la activación de la vía clásica del complemento, que resulta en la lisis de la bacteria (Borrow et al., 2005).

Los estudios llevados a cabo en militares en EEUU en 1969 por Goldschneider y colaboradores mostraron que la presencia o ausencia de SBA frente a cepas del serogrupo C predecía el riesgo de EM, demostrando una relación inversa entre el porcentaje de individuos con títulos de SBA  $\geq 4$  y la incidencia de EM causada por el serogrupo C. En base a ello, el título de SBA quedó establecido como un marcador subrogado de inmunidad (Goldschneider et al., 1969a, b). Estos estudios fueron realizados utilizando complemento humano como fuente de complemento exógeno en los ensayos de SBA. Debido a la dificultad para obtener complemento humano y la difícil estandarización entre laboratorios, actualmente, el uso de complemento de cría de conejo es el recomendado para llevar a cabo los ensayos de SBA. Un título de SBA  $\geq 4$  ó  $\geq 8$  está aceptado como correlación de protección frente a cepas del serogrupo C, utilizando complemento humano o de cría de conejo, respectivamente. Para el

serogrupo B, un aumento  $\geq 4$  en el título de SBA de la pre a la post-vacunación ha sido correlacionado con eficacia clínica en ensayos realizados con las vacunas constituidas por OMVs realizados en Cuba, Brasil y Noruega (Borrow et al., 2005).

El método alternativo para evaluar la respuesta inmune, es la medida de los anticuerpos totales frente a los antígenos capsulares meningocócicos mediante ELISA. En este caso, el nivel ampliamente considerado como protector es una concentración de anticuerpos  $>2 \mu\text{g/ml}$  (Peltola et al., 1977). Los métodos estándar de ELISA detectan anticuerpos tanto de baja como de alta avidéz de modo que, para aquellas vacunas que sólo originen respuestas de anticuerpos de baja avidéz, aunque la concentración de anticuerpos sea elevada, ésta no se correlacionaría con buena eficacia por presentar un título bajo de anticuerpos bactericidas (Mitchell et al., 1996). Esto ha llevado a la modificación de los métodos de ELISA convencionales para lograr la detección de anticuerpos específicos de alta avidéz con capacidad bactericida (Granoff et al., 1998).

#### **4.2.2 Respuesta inmunológica frente a los antígenos meningocócicos**

Existen diferencias importantes en la respuesta inmunológica dependiendo de si los antígenos son timo-dependientes (TD) o timo-independientes (TI).

Los antígenos TD consisten en proteínas solubles o células completas, virus o parásitos. Para que estos antígenos desarrollen una respuesta inmunológica es necesaria la presencia de linfocitos T maduros (que han sido procesados previamente por el timo), al igual que la presencia de células presentadoras de antígenos. Una característica esencial que acompaña a la respuesta inmunológica frente a un antígeno TD es el desarrollo de células de memoria. Estas células B de memoria son estimuladas por los antígenos TD y responden rápidamente a una segunda dosis de antígeno lo que conlleva una respuesta de anticuerpos secundaria que sucede mucho antes que la respuesta

primaria y cuya magnitud es mucho mayor (hasta 10 veces más elevada) (Stein, 1992).

Los antígenos TI no necesitan la presencia del timo o de linfocitos T maduros para estimular una respuesta inmunológica, aunque esto no significa que la respuesta no pueda verse afectada por la presencia de linfocitos T o citoquinas producidas por estas células T (Mongini et al., 1981). Los antígenos TI se clasifican en antígenos TI de tipo 1 como son el lipopolisacárido o el mitógeno hidrosoluble de *Nocardia* y en antígenos TI de tipo 2 como son los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis*. El principal problema de los antígenos TI es que, al no estimular la respuesta de células T, la respuesta de anticuerpos que producen es principalmente de tipo IgM e IgA, la maduración de las células T no ocurre y por tanto no se producen células B de memoria (Stein, 1992). La activación del sistema del complemento por el polisacárido capsular actúa como una señal co-estimuladora a través del receptor CR2 de las células B. En niños menores de 2 años, la expresión de CR2 es baja y como consecuencia de ello, la activación de las células B por los antígenos polisacáridicos es muy baja o prácticamente inexistente. Este mecanismo podría explicar parcialmente por qué los niños responden de forma ineficaz a los antígenos TI de tipo 2 como son los polisacáridos capsulares (Griffioen et al., 1993).

El polisacárido capsular de meningococo ha sido la principal diana para el desarrollo de vacunas antimeningocócicas ya que al ser la principal estructura bacteriana externa con capacidad inmunogénica, puede inducir el desarrollo de anticuerpos protectores. De hecho, los anticuerpos específicos frente a los polisacáridos capsulares son los únicos que han mostrado eficacia protectora frente a enfermedad invasiva producida por bacterias encapsuladas (Stein, 1992). El hecho de que los niños menores de 2 años (que son el principal grupo de riesgo de EM), no respondan al polisacárido capsular de meningococo por ser un antígeno TI, ha permitido el desarrollo de vacunas conjugadas que consisten en que el polisacárido capsular se conjuga a una proteína por lo que la respuesta inmunológica frente al polisacárido capsular pasa de ser de tipo TI a TD y de este

modo sí que se induce la producción de anticuerpos protectores y memoria inmunológica en niños.

### **4.2.3 Vacunas frente a los serogrupos A, C, W135 e Y**

#### **4.2.3.1 Vacunas de polisacárido capsular**

Los trabajos desarrollados por Gotschlich y colaboradores en la década de los 60 pusieron de manifiesto que la actividad bactericida del suero obtenido de voluntarios sanos, quedaba suprimida cuando anticuerpos específicos frente al polisacárido capsular eran eliminados del suero al añadir cápsula purificada. Esto sugeriría que la respuesta inmune generada frente a la cápsula polisacáridica confería protección. A partir de entonces, se desarrollaron las primeras vacunas de polisacárido capsular frente a los serogrupos A y C (Gotschlich et al., 1969). Numerosos ensayos clínicos demostraron la seguridad y efectividad de dichas vacunas que sirvieron para prevenir la EM causada por el serogrupo C entre los reclutas militares en EEUU (Artenstein et al., 1970), así como para controlar epidemias originadas por el serogrupo A en África (Greenwood and Wali, 1980). En las siguientes décadas, se desarrollaron varias combinaciones de vacunas formuladas con polisacárido capsular, tales como: vacunas bivalentes (A, C) y tetravalentes (A, C, W-135, Y) que se implantaron para el control de brotes de EM (Vodopija et al., 1983). La intervención en España con vacuna A+C a raíz del brote epidémico por serogrupo C durante el año 1997, tuvo un claro efecto en la reducción de casos durante el año 1998, inmediatamente después de realizarla (Vazquez, 2002). Recientemente, se ha aprobado una vacuna trivalente (A, C, W135) en respuesta a la emergencia del serogrupo W135 como causante de casos en países del cinturón africano de la meningitis (Mueller et al., 2006).

A pesar del beneficio obtenido en el control de brotes de EM, estas vacunas presentan importantes limitaciones que condicionan su implantación en el esquema de vacunación rutinaria. Son vacunas que se han demostrado poco inmunógenas y sin efectividad en niños menores de 2 años, quienes presentan

un mayor riesgo de padecer EM. Además, la adquisición de niveles de anticuerpos y de actividad funcional bactericida es edad dependiente, con más baja persistencia e inmunidad protectora cuanto menor es la edad (Reingold et al., 1985). Esta deficiente respuesta se explica porque los polisacáridos capsulares que componen la vacuna producen una estimulación TI, que no induce memoria inmunológica, por lo que es necesaria la revacunación a los 3 o 5 años de la primera dosis (Muller and Apicella, 1988). Debido a ello, se puede producir un fenómeno de tolerancia inmunológica, de manera que en las sucesivas vacunaciones se produce un menor estímulo antigénico que en la primera vacunación (Granoff et al., 1988; Richmond et al., 2000). De manera adicional, se suma como limitación el hecho de que la inmunización con vacunas polisacáridicas no impide el estado de portador por lo que no interrumpe la cadena de transmisión y no produce efecto de inmunidad de grupo. Por tanto, es necesaria la administración de quimioprofilaxis cuando se produce un nuevo caso de meningitis, a pesar de que el niño esté vacunado (Riedo et al., 1995).

El uso de estas vacunas está indicado en adultos y niños mayores de 2 años como medida de protección frente a la EM causada por los serogrupos A y C en grupos y en situaciones de alto riesgo como son el control de brotes epidémicos, epidemias por meningococo de serogrupo A y para los contactos en casos de enfermedad por serogrupo A.

Actualmente, existen en España dos presentaciones farmacéuticas de vacunas bivalentes de polisacáridos capsulares bacterianos purificados, no conjugados, de los serogrupos A y C de *N. meningitidis*. Una de ellas comercializada por los laboratorios GSK (Mencevax A-C®) y la otra por Sanofi Pasteur MSD (Antimeningocócica A+C®). La vacuna tetravalente de polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y no se comercializa en España aunque está disponible y puede solicitarse como medicamento extranjero para casos específicos en los que exista riesgo de infección por los serotipos W135 e Y.

#### 4.2.3.2 Vacunas conjugadas de polisacárido capsular

Las vacunas conjugadas utilizan como antígeno un oligosacárido o polisacárido capsular, al que se une de forma covalente una fracción proteica (proteína transportadora) para aumentar su capacidad inmunógena. Esta unión transforma el comportamiento TI del polisacárido en TD, que induce una respuesta inmune a partir de los dos meses de vida y una memoria inmune permanente (Lesinski and Westerink, 2001).

La introducción de la vacuna conjugada frente a *H. influenzae* tipo b erradicó con éxito la enfermedad causada por este microorganismo en los países desarrollados. Este hecho llevó a utilizar la misma estrategia para los polisacáridos capsulares en *N. meningitidis* para formular vacunas monovalentes, bivalentes y tetravalentes (Pace and Pollard, 2007).

La primera vacuna conjugada frente a meningococo se desarrolló en la década de los 80, se trataba de una vacuna bivalente frente a los serogrupos A y C con resultados favorables en los ensayos clínicos (Costantino et al., 1992). Sin embargo, ante la emergencia y la dispersión mundial del clon hipervirulento ST11 CC y la baja prevalencia del serogrupo A en los países desarrollados, se desarrolló una vacuna conjugada monovalente específica frente al serogrupo C.

Esta vacuna conjugada frente al serogrupo C: protege en niños pequeños (menores de 18 meses), induce inmunidad a nivel de mucosas, con lo cual disminuye el número de portadores sanos, hecho de capital importancia para la eliminación de la enfermedad y además no produce tolerancia inmunológica como ocurre con la vacuna de polisacáridos (Maiden and Stuart, 2002).

Debido al dramático incremento de la enfermedad invasora por serogrupo C en la década de los años 90 en muchos países europeos, Reino Unido fue el primer país en inmunizar rutinariamente con vacuna conjugada a finales del año 1999. Este hecho marcó un hito en la historia de la prevención de la EM por el serogrupo C. Esta vacuna resultó muy efectiva originando un descenso en la incidencia de la EM causada por este serogrupo en un 90% en todos los grupos etarios y una reducción en la tasa de portadores del 66%.

Además, redujo la incidencia de la enfermedad en población no vacunada en un 67% debido al fenómeno de inmunidad de grupo (Balmer et al., 2002; Ramsay et al., 2003). Tras el éxito obtenido en Reino Unido, la vacuna conjugada frente a serogrupo C fue aprobada en diferentes países, entre ellos España.

En España, la vacuna se introdujo en el calendario ordinario de vacunación en régimen de 2, 4 y 6 meses en el otoño del año 2000 en los menores de 6 años y en los años posteriores se llevaron a cabo campañas de vacunación en adolescentes, extendiéndolas hasta los 20 años. Actualmente, el régimen se ha cambiado por dos dosis antes de los 6 meses de edad y una tercera después del año, variando entre las distintas Comunidades Autónomas. La farmacopea actual dispone de cuatro vacunas antimeningocócicas conjugadas monovalentes frente a *N. meningitidis* serogrupo C. En tres de ellas, el polisacárido capsular se conjuga con proteína diftérica CRM<sub>197</sub> (Meningitec<sup>®</sup>, Menjugate<sup>®</sup> y Meninvact<sup>®</sup>) fabricadas por los laboratorios Wyeth, Esteve y Sanofi Pasteur MSD, respectivamente, y en la cuarta (NeisVac-C<sup>®</sup>) comercializada por Baxter, se conjuga a toxoide tetánico. En las tres primeras, el polisacárido capsular se compone de formas O-acetiladas, mientras que en la conjugada a toxoide tetánico se constituye por ácido siálico sin grupos O-acetilo, lo que podría conferirle mayor inmunogenicidad (Pollabauer et al., 2005). La vacuna monovalente conjugada frente a serogrupo C además de estar indicada en la población infantil sana, se recomienda en grupos de pacientes inmunodeprimidos con riesgo elevado de EM, así como en los contactos íntimos de los casos de meningitis por serogrupo C.

En el año 2005 se aprobó en EEUU una vacuna conjugada tetravalente con polisacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135 e Y unidos a toxoide diftérico (Menactra<sup>®</sup>, Sanofi Pasteur MSD), para su uso entre los 11-55 años de edad (Bilukha and Rosenstein, 2005). La misma vacuna está aprobada desde el año 2006 en Canadá para la inmunización de niños entre 2-10 años de edad. Otras compañías están trabajando en el desarrollo de nuevas vacunas multivalentes, entre ellas la vacuna tetravalente de polisacáridos A, C, W135 e Y conjugados a proteína CRM197 (Novartis) que se aprobará en un futuro próximo.

La OMS y la organización *Meningitis Vaccine Project* trabajan en el desarrollo de una vacuna más barata y efectiva frente al serogrupo A que pueda prevenir la enfermedad epidémica en el cinturón africano de la meningitis (Jodar et al., 2003).

#### **4.2.4 Vacunas frente a serogrupo B**

Después de 25 años de trabajo, el desarrollo e implantación de una vacuna eficaz frente a *N. meningitidis* serogrupo B, continúa siendo un reto en el control de la EM producida por este serogrupo. La reciente secuenciación del genoma completo del serogrupo B y el uso de nuevas tecnologías, han permitido conocer nuevos antígenos protectores potencialmente utilizables como inmunizantes, lo que ha abierto el camino para la erradicación de la enfermedad producida por el serogrupo B.

##### **4.2.4.1 Vacunas de polisacárido capsular**

La pobre inmunogenicidad atribuida a la cápsula del serogrupo B se debe a la gran similitud entre el polímero capsular de NANA  $\alpha(2\rightarrow8)$  y la envoltura exterior de células neuronales embrionarias humanas, lo que potencialmente podría producir un fenómeno de tolerancia inmune (Finne et al., 1983; Finne et al., 1987). En un intento de desarrollo de una vacuna polisacárida conjugada frente al serogrupo B, se sustituyeron los residuos N-acetil del ácido siálico por grupos N-propionil que se conjugaron a una proteína transportadora (Jennings et al., 1986). La vacuna resultante, mostró una elevada inmunogenicidad en animales pero no inducía una buena respuesta bactericida (Bruge et al., 2004).

##### **4.2.4.2 Vacunas constituídas por vesículas de membrana externa**

Las OMVs son esferas que contienen OMPs, LPS y proteínas periplásmicas que son liberadas por *N. meningitidis* y por otras bacterias gramnegativas. Estas OMVs están constituidas por diferentes OMPs (fundamentalmente PorA) y una pequeña porción de LPS. Las vacunas de OMVs

frente a serogrupo B han sido utilizadas con éxito, pero su empleo está limitado al control de brotes producidos por un solo tipo de cepa, debido a la gran variabilidad de los antígenos empleados, especialmente la proteína PorA.

Utilizando esta estrategia se han desarrollado 2 vacunas, una en Cuba y otra en Noruega. La vacuna aprobada en Cuba en 1998 para los serogrupos B y C (comercializada como VA-MENGOC-BC® por el Instituto Finlay y GSK), consiste en OMVs deplecionadas de LPS a partir de la cepa B:4:P1.19,15 y un polímero de polisacárido capsular del serogrupo C. Se administra en dos dosis, obteniéndose una eficacia del 83%, pero con variabilidad de protección dependiendo de la edad, con baja cobertura en niños menores de 4 años (de Moraes et al., 1992). La vacuna noruega frente al serogrupo B, se desarrolló a partir de OMVs libres de LPS de una cepa B:15:P1.7,16 y mostró una eficacia del 57% en un ensayo llevado a cabo en adolescentes (Bjune et al., 1991). En Nueva Zelanda, se introdujo en el año 2004 la vacuna para el serogrupo B compuesta por OMVs conteniendo las proteínas PorA y PorB y LPS de la cepa B:4:P1.7b,4 (O'Hallahan et al., 2004). Esta vacuna redujo la incidencia de la enfermedad, obteniéndose anticuerpos bactericidas en el 70% de los niños de más de 6 meses y el 90% de los adolescentes (Oster et al., 2005).

La proteína PorA, es la más abundante en las OMVs y es capaz de generar anticuerpos bactericidas a partir del estado de portador nasofaríngeo, enfermedad invasiva y después de la inmunización con OMVs de serogrupo B (Rosenqvist et al., 1995). Sin embargo, los anticuerpos bactericidas van dirigidos frente a zonas variables de la proteína, por lo que la inmunidad protectora generada es específica para cada serosubtipo (Idanpaan-Heikkila et al., 1995). Por ello, las vacunas basadas en la proteína PorA de una sola cepa, solamente son eficaces en casos de brotes asociados a esa cepa y no en casos de enfermedad esporádica. Para afrontar esta limitación, se desarrolló en Holanda una vacuna compuesta por proteína PorA de seis cepas diferentes prevalentes de serogrupo B que cubría el 80% de las cepas que causaban enfermedad en Reino Unido (Cartwright et al., 1999). Esta vacuna hexavalente presenta limitaciones al originar respuestas muy heterogéneas entre los distintos

serosubtipos, con diferencias en los títulos de SBA obtenidos (Longworth et al., 2002a). Así, la efectividad de las vacunas basadas en la proteína PorA está limitada por la elevada variación antigénica de esta proteína entre la población meningocócica sometida a presión selectiva y por la posible emergencia de cepas de meningococo deficientes en PorA (Cartwright et al., 1999; van der Ende et al., 2003).

#### **4.2.4.3 Vacunas basadas en proteínas minoritarias de membrana y en otras especies de *Neisseria***

Adicionalmente a las porinas, numerosas OMPs están siendo investigadas como candidatas para el desarrollo de vacunas. Entre ellas cabe citar a las proteínas de clase 5, la proteína de superficie de *Neisseria* (NspA), la proteína reguladora de hierro (FrpB) y las proteínas fijadoras de transferrina (Tbp B) (Ala'Aldeen et al., 1994; Martin et al., 1997; Rokbi et al., 1997). La inmunización con proteína recombinante NspA fue capaz de producir anticuerpos bactericidas frente a cepas del serogrupo B, aunque solamente eliminó al 50% de las cepas con diversidad genética (Moe et al., 2001). La aparición de anticuerpos bactericidas tras inmunización con Tbp es contradictoria, con algunos estudios sugiriendo que son protectores y otros mostrando que no presentan actividad bactericida (Ala'Aldeen and Borriello, 1996; Jodar et al., 2002).

La reactividad cruzada de respuesta inmune entre especies no patogénicas del género *Neisseria* y *N. meningitidis* genera otra propuesta para el desarrollo de vacunas. En el caso de *N. lactamica*, las tasas de portadores son más elevadas en niños pequeños y descienden con la edad, de manera contraria a lo que ocurre con *N. meningitidis* (Gold et al., 1978). Por ello, el estado de portador de cepas de *N. lactamica* se considera importante para el desarrollo de inmunidad natural. La inmunización con cepas vivas de *N. lactamica* genera títulos elevados de anticuerpos bactericidas y protege a ratones frente a *N. meningitidis* (Li et al., 2006). Se han encontrado diferencias frente a distintas cepas de *N. lactamica* en su habilidad para inducir respuesta inmune protectora

sugiriendo la necesidad de identificar antígenos específicos de superficie responsables de inmunidad cruzada.

#### 4.2.4.4 Vacunología inversa

La estrategia más novedosa en el desarrollo de vacunas frente al serogrupo B se basa en la utilización de la secuencia del genoma de *N. meningitidis* para identificar, mediante programas informáticos, genes que codifiquen antígenos potencialmente utilizables como inmunógenos. Al disponer de la secuencia completa del genoma de los principales serogrupos de meningococo causantes de enfermedad, todas las proteínas podrían ser probadas como candidatas a vacunas sin ninguna selección previa basada en su expresión *in vivo* o en su papel en virulencia (Tettelin et al., 2000). Este método para identificar posibles candidatos a vacunas, basado en el análisis de la secuencia completa del genoma, ha sido denominado vacunología inversa (Pizza et al., 2000; Rappuoli, 2001).

En el genoma de la cepa MC58 perteneciente al serogrupo B, existen aproximadamente 2.158 genes, prediciendo que 570 de los mismos codifican proteínas de superficie que podrían ser dianas inmunológicas debido a su accesibilidad para los anticuerpos. Utilizando la tecnología de ADN recombinante, los genes que codifican 334 proteínas candidatas se clonaron con éxito en *E. coli*, expresando y purificando las proteínas solubles (Pizza et al., 2000), identificándose 91 nuevas OMPs. Tras la inmunización en animales, se realizaron ensayos de SBA y se observó que un total de 28 proteínas recombinantes fueron capaces de inducir respuesta inmune protectora. Los antígenos más prometedores para producir títulos de anticuerpos bactericidas se evaluaron para averiguar si estaban conservados en un gran número de cepas de meningococo de diferente diversidad genética y geográfica (Tettelin et al., 2000).

Se seleccionaron cinco antígenos: GNA 2132, GNA 1870 (fHBP), NMB1994 (NadA), GNA 1030 y GNA 2091. Todos ellos se formularon en una vacuna denominada 5CVMB (vacuna de 5 componentes frente a meningococo

serogrupo B) que será comercializada por Novartis. Esta vacuna, en fase última de experimentación, parece inducir anticuerpos bactericidas en ratones frente a un 78% y a un 90% (dependiendo de los adyuvantes empleados) de las cepas de serogrupo B probadas, con gran diversidad genética. Dos de estas 5 proteínas, GNA 1030 y GNA 2091, son consideradas proteínas accesorias debido a que generan peor respuesta obteniéndose títulos más bajos de SBA (Giuliani et al., 2006). De las tres subfamilias descritas de GNA 1870, la subfamilia 1, se ha visto que está presente en el 60% de los aislamientos causantes de EM en el serogrupo B y es la única incluida en la vacuna 5CVMB.

Existe otra vacuna en desarrollo formulada por Wyeth, que también incluye como antígeno principal a la proteína GNA 1870 (denominada LP2086) pero en este caso contiene un representante de 2 subfamilias diferentes (Feavers and Pizza, 2009).



## **OBJETIVOS**



El tratamiento con antibióticos ha reducido de forma notable la mortalidad de la enfermedad meningocócica, sin embargo su rápida evolución y las posibles graves secuelas, entre otras causas, hacen de la vacunación el mejor instrumento para combatirla. En la actualidad existen vacunas efectivas frente a cuatro de los principales serogrupos implicados más frecuentemente en el desarrollo de EM, los serogrupos A, C, W-135 e Y. Hasta el momento no existe ninguna vacuna universal frente al serogrupo B, el más prevalente en los países desarrollados. El uso de nuevas tecnologías para el desarrollo de vacunas que emplean nuevos antígenos protectores, puede suponer un gran avance para erradicar la enfermedad producida por el serogrupo B.

La vacuna conjugada frente a serogrupo C se introdujo inicialmente en Reino Unido en el año 1999 en respuesta a la elevada incidencia de EM por este serogrupo, causada predominantemente por una única cepa aislada originalmente en Canadá en la década de los años 80 y perteneciente al ST-11 CC. Este complejo clonal se dispersó mundialmente, siendo responsable de numerosos brotes por toda Europa. El éxito obtenido con la campaña de vacunación, que consiguió disminuir drásticamente la incidencia de EM por serogrupo C, llevó a la implantación de la vacuna en otros países europeos y en Canadá con beneficios similares. En España, la vacuna conjugada frente a serogrupo C se incluyó en el calendario vacunal a finales del año 2000.

Una preocupación que pone en peligro el éxito a largo plazo de todas las vacunas, es la emergencia de cepas resistentes a la respuesta inmune conferida por la vacunación. Este riesgo es especialmente importante cuando se trata de vacunas basadas en un único antígeno, ya que si existe una alteración o pérdida de ese antígeno por parte del patógeno, puede provocar la emergencia de aislados clínicos resistentes a la vacuna. Esta situación ha ocurrido recientemente tras la introducción de vacunas conjugadas frente a *S. pneumoniae* dirigidas frente a determinados serotipos. Se ha observado un dramático incremento en la incidencia por serotipos no incluidos en la vacuna, con algunos aislados que evaden la acción protectora conferida con la inmunización mediante recombinación genética de sus genes capsulares.

Se han identificado casos de EM causados por serogrupo C en individuos vacunados y, aunque en la mayoría de los casos el fallo vacunal se atribuya a una disminución en la respuesta del título de anticuerpos tras la dosis final de la vacuna, también podría deberse a que las cepas responsables hayan desarrollado mecanismos de resistencia a la acción del suero inmune. La identificación de estos mecanismos que pueden inducir resistencia a la vacuna y por tanto potenciar el desarrollo de enfermedad en individuos inmunizados, podría ser una herramienta precisa para la detección precoz de cepas hipervirulentas susceptibles de producir procesos epidémicos. El análisis de los mecanismos de interacción de estos aislados resistentes con el sistema inmune podría ser de gran ayuda en la identificación de población susceptible frente a meningococo C y que por tanto necesite un especial control por los centros asociados al Sistema Nacional de Salud pertinentes. La caracterización molecular de los mecanismos responsables de que estos aislados presenten un alto nivel de resistencia a la vacuna, sería muy útil en la identificación de nuevas dianas para el desarrollo de antimicrobianos y vacunas eficaces que faciliten el control de la EM.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, los objetivos de la presente Tesis Doctoral se centraron en los siguientes aspectos:

1. Identificar aislados clínicos de *N. meningitidis* pertenecientes al serogrupo C resistentes a la acción bactericida de sueros procedentes de individuos inmunizados con vacuna conjugada frente a serogrupo C.
2. Caracterizar los mecanismos moleculares por los que las cepas han desarrollado una mayor resistencia al suero, en presencia de anticuerpos específicos frente al polisacárido capsular, prestando especial interés a los principales determinantes antigénicos de virulencia del meningococo como son el LPS y la cápsula.

3. Analizar la interacción de los aislados resistentes con la inmunidad mediada por el sistema del complemento, determinando el depósito del componente C3 y la inserción del MAC en la superficie bacteriana, en comparación con cepas sensibles control.
4. Desarrollar y aplicar un método que permita detectar la presencia de fenómenos de resistencia en grandes poblaciones de aislados para poder conocer el alcance de este fenómeno, comenzando por el análisis de aislados clínicos relacionados con procesos de fallo vacunal.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



# 1 Material de estudio

## 1.1 Cepas

### 1.1.1 Origen y características de las cepas de *N. meningitidis* seleccionadas para la identificación de aislados resistentes a la actividad bactericida del suero

Se analizaron un total de 109 aislados de *N. meningitidis* serogrupo C de la colección de cepas del Laboratorio de Referencia de Neisserias. Se eligieron, al azar, cepas con expresión antigénica C:2a:P1.5 relacionadas con brotes epidémicos en España, siendo en la actualidad las mayoritarias dentro del serogrupo C en nuestro país. Todas ellas habían sido aisladas de individuos con EM y fueron enviadas al Laboratorio de Referencia de Neisserias, entre 1999 y 2003, procedentes de diferentes Comunidades Autónomas para confirmar su identificación y posterior caracterización antigénica.

En la Tabla 1 aparece detallado el origen (clínico y geográfico) y el año de aislamiento de las 109 cepas analizadas.

### 1.1.2 Origen y características de las cepas de meningococo asociadas a fallos vacunales

Se analizaron 34 cepas de *N. meningitidis* serogrupo C causantes de EM en niños y adolescentes que habían sido inmunizados con vacuna conjugada frente a serogrupo C. Estas cepas fueron enviadas al Laboratorio de Referencia de Neisserias, entre 2003 y 2008, procedentes de diferentes Comunidades Autónomas para su confirmación como productoras de fallos vacunales.

La Tabla 2 describe la caracterización fenotípica, el año de aislamiento, el origen geográfico y la muestra clínica de donde fueron aisladas las 34 cepas relacionadas con fallos vacunales.

**Tabla 1. Origen y año de aislamiento de las 109 cepas de *N. meningitidis* C:2a:P1.5 analizadas mediante ensayos de SBA**

ORIGEN GEOGRÁFICO	Nº DE AISLADOS	AÑO DE AISLAMIENTO	ORÍGEN CLÍNICO		
			SANGRE	LCR	SANGRE Y LCR
Andalucía	27	1999, 2001, 2002, 2003	12	14	1
Baleares	2	2001, 2003	1	1	0
Canarias	9	2001, 2002	5	4	0
Cantabria	1	2000	1	0	0
Castilla la Mancha	9	2001, 2002, 2003	4	3	2
Castilla y León	2	2003	1	1	0
Cataluña	13	2001, 2002, 2003	6	4	3
Comunidad Valenciana	8	2001, 2002, 2003	5	2	1
Galicia	7	2000, 2002, 2003	5	2	0
La Rioja	2	2003	2	0	0
Navarra	2	2002, 2003	1	0	1
Madrid	19	1999, 2001, 2002, 2003	5	10	4
Murcia	4	2003	1	3	0
País Vasco	4	2000, 2002, 2003	2	2	0

**Tabla 2. Fenotipo, origen y año de aislamiento de las 34 cepas de *N. meningitidis* asociadas a fallos vacunales**

AISLADO	FENOTIPO	ORIGEN GEOGRÁFICO	AÑO DE AISLAMIENTO	ORIGEN CLÍNICO
15497	C:2b:P1.2	Comunidad Valenciana	2003	Sangre
15859	C:2a:P1.5	País Vasco	2003	Sangre
16162	C:2a:P1.5	Madrid	2003	Desconocido
16220	C:2a:P1.5	Madrid	2004	Sangre
16267	C:2a:P1.5	Madrid	2004	Sangre
16268	C:2a:P1.5	Madrid	2004	LCR
16373	C:2a:P1.5	Madrid	2004	Sangre
16428	C:2a:P1.5	Andalucía	2004	Sangre
16531	C:2a:P1.5	Madrid	2004	Sangre
16723	C:2a:P1.5	Málaga	2004	Desconocido
16754	C:2b:P1.2,5	Andalucía	2004	Sangre
16840	C:2a:P1.5	Galicia	2005	Sangre
16875	C:2a:P1.5	Galicia	2005	Desconocido
17037	C:2b:NST	Andalucía	2005	LCR
17213	C:2a:P1.5	País Vasco	2005	Sangre
17351	C: NT:P1.5	Andalucía	2005	LCR
17441	C:2a:P1.5	Galicia	2005	Desconocido
17523	C:2a:P1.5	Madrid	2005	Desconocido
17799	C:2a:P1.5	Navarra	2006	LCR
17804	C:2a:P1.5	Comunidad Valenciana	2006	Sangre

NT: No tipable; NST: No subtipable

**Tabla 2 (cont.). Fenotipo, origen y año de aislamiento de las 34 cepas de *N. meningitidis* asociadas a fallos vacunales**

AISLADO	FENOTIPO	ORIGEN GEOGRÁFICO	AÑO DE AISLAMIENTO	ORIGEN CLÍNICO
17909	C:2a:P1.5	Andalucía	2006	Sangre
18009	C:2a:P1.5	Comunidad Valenciana	2006	Sangre
18146	C:2a:NST	Andalucía	2006	Sangre
18163	C:2a:P1.5	Castilla-León	2007	Sangre
18193	C:2a:P1.5	Castilla-León	2007	Sangre
18240	C:2a:P1.5	Galicia	2007	Sangre
18298	C:2a:NST	Galicia	2007	LCR y Sangre
18443	C:2a:P1.5	Comunidad Valenciana	2007	LCR
18453	C:NT:P1.2,5	Castilla-León	2007	Sangre
18475	C:2a:P1.5	Andalucía	2007	LCR
18524	C:2b:P1.2	Comunidad Valenciana	2007	Sangre
18560	C:2b:P1.2	Extremadura	2007	Sangre
18637	C:2a:P1.5	Galicia	2007	LCR
18775	C:2a:P1.5	Andalucía	2008	Sangre

NT: No tipable, NST: No subtipable

### 1.1.3 Condiciones de cultivo y conservación

Las cepas de meningococo se cultivaron en caldo de infusión cerebro corazón (BHI) (BHI, Oxoid, 37 g disueltos en 1 L de H<sub>2</sub>O destilada con 1 g de almidón, BDH, Merck), en agar BHI (medio BHI al que se añadió agar bacteriológico, 15 g en 1 L) suplementado al 5% con base de Levanthal (500 ml de sangre de caballo desfibrinada, 1 L de caldo BHI autoclavado con 1 g de NAD, Sigma, U.K.) o en agar Muller-Hinton suplementado con sangre de caballo. El medio de cultivo se inoculó con la bacteria y se incubó a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 18-24 horas.

Las cepas bacterianas se conservaron en viales eppendorf con leche descremada estéril al 10% o en caldo BHI con glicerol al 20%, donde se mantuvieron a -80°C. Los inóculos de trabajo se prepararon a partir de los mismos tras descongelación a temperatura ambiente.

## 1.2 Sueros

### 1.2.1 Obtención de sueros de individuos vacunados

Para los ensayos de SBA se utilizaron sueros obtenidos de 11 individuos vacunados con una de las vacunas comerciales disponibles frente a *N. meningitidis* serogrupo C (Meningitec<sup>®</sup>, Wyeth).

Se extrajo sangre que se dejó coagular durante 1 hora a temperatura ambiente y, tras unas 6-12 horas a 4°C para retraer el coágulo, se retiró el suero y se centrifugó a 2000 × g a 4°C durante 10 minutos. Los sueros se distribuyeron en alícuotas y se congelaron a -80°C.

### 1.2.2 Obtención de sueros de ratón

Se generaron sueros murinos inmunes frente a las cepas S3, SR y R3, al inocular a los animales con cada una de las cepas.

Para preparar las bacterias a inocular, se partió de un cultivo de 18 horas en agar BHI. Se preparó una suspensión de la bacteria en PBS que se centrifugó a 5000 × g durante 2 minutos y el precipitado se resuspendió de nuevo

en PBS. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó por medida de la densidad óptica (D.O.) de la suspensión bacteriana a una dilución 1:50, en tampón de lisis P2 (SDS al 10%, NaOH 0,1 M, Qiagen) medido a 260 nm de absorbancia ( $A_{260}$ ).

Se utilizaron grupos de ratones BABL/c de 8 semanas a los que se les inocularon  $10^7$  UFC de las tres cepas, en 250  $\mu$ l de caldo BHI por vía intraperitoneal, en tres ocasiones en los días 0, 14 y 21. Se extrajo sangre de los animales inmunizados al día 28 y los sueros se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.2.1. Las alícuotas se conservaron a -80°C.

Se utilizó el mismo esquema para producir suero policlonal frente al polisacárido capsular al inmunizar a los animales por vía subcutánea con 0,1 ml de vacuna conjugada frente a serogrupo C (Meningitec<sup>®</sup>, Wyeth). Los sueros se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.2.1 y las alícuotas se conservaron a -80°C.

## **2 Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas**

Los aislados de *N. meningitidis* que se seleccionaron para el estudio fueron caracterizados en el Laboratorio de Referencia de Neisserias, fenotípicamente por la expresión de sus antígenos de superficie y genotípicamente mediante métodos moleculares.

### **2.1 Determinación del serogrupo**

La determinación del serogrupo, en base al polisacárido capsular, se llevó a cabo mediante aglutinación frente a sueros serogrupo-específicos producidos en el Laboratorio de Referencia de Neisserias siguiendo el esquema descrito por Vedrós (Vedros, 1978).

A partir de un cultivo de 18-24 horas se realizó una suspensión de la bacteria en PBS y se enfrentó una gota con los sueros serogrupo-específicos, observándose la aglutinación con alguno de los mismos. Aquellas cepas que presentaron aglutinación directamente con PBS, las que aglutinaron con varios sueros y las que no mostraron aglutinación con ninguno de los sueros de referencia fueron analizadas por PCR para determinar el genogrupo, y aquellas en las que se obtuvo un resultado de PCR negativo se englobaron bajo el término no grupables (NG).

### **2.2 Determinación del serotipo y serosubtipo**

El serotipo y el serosubtipo de las cepas se determinó mediante ELISA utilizando Acms suministrados por el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Hertfordshire, UK). Los Acms empleados se indican en la Tabla 3.

**Tabla 3. Anticuerpos monoclonales empleados para la determinación del serotipo y serosubtipo de cepas de *N. meningitidis***

<b>Acm</b>	<b>Serotipo</b>	<b>Acm</b>	<b>Serosubtipo</b>
MN3C6B	1	MN14C2.3	P1.1
5D4-5	2a	MN16C13F4	P1.2
MN2C3B	2b	5G8B2F9	P1.3
5DC4C8G8	4	MN20B9.34	P1.4
MN5C8C	14	MN22A9.19	P1.5
8B5-5G9	15	MN19D6.13	P1.6
6B11F2B5	21	MN14C11.6	P1.7
		MN5A10.7	P1.9
		MN20F4.17	P1.10
		MN20A7.10	P1.12
		MN25H10.75	P1.13
		MN21G3.17	P1.14
		MN3C5C	P1.15
		MN5C11G	P1.16

En una placa de microtitulación estéril de fondo plano se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de la suspensión bacteriana a estudio ( $10^9$  UFC/ml), previamente inactivada a 56°C durante 30 minutos. La placa se incubó a 37°C durante 48 horas. Después de hacer 3 lavados con solución de lavado ( $H_2O$  destilada con Tween-80 al 0,1%, Merck), se añadieron 100  $\mu$ l de una solución de Acms diluidos en PBS con seroalbúmina bovina al 0,1% (Merck) y Tween-80 al 0,1%. Tras incubación a 37°C durante 1 hora, la placa se lavó tres veces con la solución de lavado. Se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de una solución de proteína A-peroxidasa (Sigma) diluida 1:500 en PBS con seroalbúmina bovina al 0,5% y con Tween 80 al 0,01%. Se incubó durante 1 hora a 37°C, se realizaron tres lavados y se añadieron 100  $\mu$ l a cada pocillo de una solución de tetrametilbencidina (TMB,

Sigma). Después de una incubación a T<sup>a</sup> ambiente durante 10 minutos se paró la reacción añadiendo 100 µl por pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M (Sigma).

La lectura de las placas se realizó de manera visual. Las cepas que no mostraron reacción con ninguno de los Acms de serotipo y de serosubtipo fueron consideradas como no serotipables (NT) y/o no serosubtipables (NST), respectivamente.

### **2.3 Caracterización genética mediante MLST**

La tipificación molecular mediante MLST se realizó en los tres aislados resistentes (R1, R2 y R3) y en cinco cepas sensibles tomadas como controles (S1-S5). Tal y como describe el método, se amplificaron y posteriormente se secuenciaron fragmentos internos de 7 genes *housekeeping*: *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm* (Maiden et al., 1998).

Las secuencias resultantes para cada uno de los genes fueron alineadas y comparadas con las posibles variantes descritas, a las cuales se puede acceder vía Internet ([www.neisseria.org](http://www.neisseria.org)). La combinación alélica obtenida para los 7 genes estudiados permitió asignar a cada cepa un determinado ST y así definir el complejo clonal al cual pertenecían.

En la Tabla 4 aparecen las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los 7 genes. Los reactivos y las condiciones empleadas para el proceso de amplificación se describen en las Tablas 5 y 6, respectivamente (Maiden et al., 1998).

**Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar los genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm***

Cebador	Secuencia del cebador
AbcZ-P1C	5' - TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC - 3'
AbcZ-P2C	5' - TCCCCGTCGTAAAAACAATC - 3'
Adk-P1B	5' - CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAACC - 3'
Adk-P2B	5' - TGCCCAATGCGCCCAATAC - 3'
AroE-P1B	5' - TTTGAAACAGGCGGTTGCGG - 3'
AroE-P2B	5' - CAGCGGTAATCCAGTGCGAC - 3'
FumC-P1B	5' - TCCCCGCCGTAAAAGCCCTG - 3'
FumC-P2B	5' - GCCCGTCAGCAAGCCCAAC - 3'
Gdh-P1B	5' - CTGCCCCCGGGGTTTTTCATCT - 3'
Gdh-P2B	5' - TGTTGCGCGTTATTTCAAAGAAGG - 3'
PdhC-P1B	5' - CCGGCCGTACGACGCTGAAC - 3'
PdhC-P2B	5' - GATGTCGGAATGGGGCAAACA - 3'
Pgm-P1	5' - CTTCAAAGCCTACGACATCCG - 3'
Pgm-P2	5' - CGGATTGCTTTCGATGACGGC - 3'

(Maiden et al., 1998)

**Tabla 5. Reactivos empleados para amplificar los genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm***

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón de PCR 10 $\times$	10	1 $\times$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	2	0,2 mM cada dNTP
Cebador F* (50 $\mu$ M)	2	1 $\mu$ M
Cebador R** (50 $\mu$ M)	2	1 $\mu$ M
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0,5	2,5 U
ADN problema	8	2 ng/ $\mu$ l
Agua desionizada estéril	Hasta 100 $\mu$ l	---

F\*: forward; R\*\*: reverse

**Tabla 6. Condiciones empleadas en la PCR de los genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm***

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	94°C	5 minutos	1
<b>Amplificación</b>			
Desnaturalización	94°C	30 segundos	25
Hibridación	57°C*	30 segundos	
Extensión	72°C	2 minuto	
<b>Extensión final</b>	72°C	10 minutos	1

\*La temperatura de hibridación fue de 57°C, excepto para los genes *abcZ* y *fumC* que fue de 52°C.

Los productos obtenidos por PCR se purificaron, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.3, y posteriormente se secuenciaron.

En las Tablas 7, 8 y 9 aparecen las secuencias de los cebadores, los reactivos y las condiciones empleadas, respectivamente, para la secuenciación (Maiden et al., 1998).

**Tabla 7. Cebadores utilizados para secuenciar los genes *abc*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm***

Cebador	Secuencia del cebador
AbcZ-S1	5' - AATCGTTTATGTACCGCAGG - 3'
AbcZ-S2	5' - GAGAACGAGCCGGGATAGGA - 3'
Adk-S1	5' - AGGCTGGCACGCCCTTGG - 3'
Adk-S2	5' - CAATACTTCGGCTTTCACGG - 3'
AroE-S1	5' - GCGGTCAAYACGCTGATT - 3'
AroE-S2	5' - ATGATGTTGCCGTACACATA - 3'
Fum-S1	5' - TCCGGCTTGCCGTTTGTCAG - 3'
Fum-S2	5' - TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC - 3'
Gdh-S1	5' - CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC - 3'
Gdh-S2	5' - GCGCACGGATTCATATGG - 3'
Pdhc-S1	5' - TCTACTACATCACCTGATG - 3'
Pdhc-S2	5' - ATCGGCTTTGATGCCGTATTT - 3'
Pgm-S1	5' - CGGCGATGCCGACCGCTTGG - 3'
Pgm-S2	5' - GGTGATGATTTCCGGTYGCRCC - 3'

(Maiden et al., 1998)

**Tabla 8. Reactivos empleados en la secuenciación de los genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm***

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)
Premix (Big Dye)	3
Cebador S (5 $\mu$ M)	1
Producto de PCR	3-6
Agua desionizada estéril	Hasta 10 $\mu$ l

**Tabla 9. Condiciones empleadas en la secuenciación de los genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm***

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	3 minutos	1
Desnaturalización	96°C	10 segundos	25
Hibridación	50°C	5 segundos	
Extensión	60°C	4 minutos	

## 2.4 Identificación de la variante ET-15 dentro del complejo clonal ST-11 CC

La variante ET-15, incluida en el complejo clonal ST-11 CC, presenta una mutación en el gen de la fumarasa. Esta modificación está localizada fuera del fragmento que se secuencia por MLST para determinar el ST (Murphy et al., 2003). Se amplificó y secuenció el fragmento donde ocurre dicha mutación en los tres aislados resistentes (R1, R2 y R3) y las cinco cepas sensibles tomadas como controles (S1-S5).

Se siguieron las mismas condiciones de amplificación y secuenciación descritas para el MLST, utilizando los cebadores FumC-P1B y FumC-P2B cuyas secuencias aparecen en la Tabla 4.

### 3 Ensayo de actividad de anticuerpos bactericidas del suero

Los ensayos de SBA se emplearon para: la identificación de aislados resistentes, el estudio de la sensibilidad al suero de los mutantes en los genes *lst*, *oatC* y *siaD*, estudiar la sensibilidad de los transformantes generados al transferir el fenotipo resistente y del aislado SR generado al transferir la RIG modificada desde la cepa R3 a la cepa S3, el análisis estructural de la cápsula y para conocer la actividad bactericida de las cepas a anticuerpos dirigidos frente a la proteína PorA.

La metodología empleada siguió el protocolo estándar del CDC (Maslanka et al., 1998), para determinar la sensibilidad al suero de las diferentes cepas en estudio mediada por la acción del sistema del complemento. Como fuente de complemento se trabajó con complemento de cría de conejo y las cepas se enfrentaron a la acción de sueros inmunes procedentes de individuos vacunados con vacuna conjugada frente a serogrupo C. En la selección de aislados resistentes se utilizó como control a la cepa de serogrupo C denominada C11. Para el análisis antigénico de la cápsula, los ensayos de SBA se realizaron con suero obtenido de ratones inmunizados con las cepas en estudio. En todos los ensayos de SBA, se consideró como título protector todo aquel  $\geq 8$  (Goldschneider et al., 1969a, b).

Las cepas de meningococo en estudio se cultivaron en agar BHI durante toda la noche y se subcultivaron en agar BHI durante 4-5 horas. Partiendo de  $10^9$  UFC/ml se prepararon diluciones en tampón SBA (PBS Dulbecco's pH 7,2 (Gibco) con glucosa al 0,1% (Sigma) hasta una concentración de  $2 \times 10^4$  UFC/ml que se mezcló, en volúmenes iguales, con complemento de cría de conejo de 3-4 semanas (Pel-Freez CS) previamente diluido 1:2 en tampón SBA.

Los sueros se incubaron a 56°C durante 30 minutos para inactivar la fuente de complemento humano y partiendo de una dilución 1:4 en tampón SBA, se prepararon diluciones seriadas de los mismos en una placa de microtitulación estéril.

En la misma placa de microtitulación, se mezclaron 25  $\mu$ l de la suspensión bacteriana con el complemento (suspensión de trabajo) junto con las diluciones de los sueros. En cada ensayo se incluyó un control del complemento y un control del suero. Una vez añadidos todos los componentes, se sembraron 10  $\mu$ l de los pocillos del control del complemento en agar BHI, para determinar el número de bacterias a tiempo 0 ( $T_0$ ). La placa se incubó a 37°C, en agitación (20 rpm) y en atmósfera sin CO<sub>2</sub> durante una hora. Para determinar la proporción de bacteria que sobrevivió se sembraron 10  $\mu$ l de cada pocillo por triplicado, en agar BHI que se incubó a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante toda la noche.

El recuento de colonias se realizó a las 18-24 horas. El título de SBA se dio como la inversa de la dilución más alta del suero que producía más del 50% de muerte que los controles (control de suero y control de complemento).

Para analizar la sensibilidad de las cepas a anticuerpos dirigidos frente a la proteína PorA, se empleó el Acm P1.5 (hibridoma 4023; NIBSC, UK) que se combinó con fuente de complemento de cría de conejo y con complemento humano obtenido de un paciente con agammaglobulinemia antes de que recibiera terapia de reemplazo. El ensayo de SBA se realizó en las mismas condiciones anteriormente descritas.

Todos los ensayos de SBA se realizaron al menos en tres ocasiones independientes, partiendo de bacteria aislada en días diferentes.

## 4 Ensayo de actividad del suero utilizando fuente de complemento humano

Para los ensayos del suero en los cuales se utilizó fuente de complemento humano, se partió de una suspensión bacteriana de  $10^9$  UFC/ml a partir de la cual, se prepararon diluciones en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM + glutaMAX™, Invitrogen) hasta una concentración de  $10^5$  UFC/ml.

El ensayo se realizó en una placa de microdilución, donde la bacteria se incubó con suero procedente de individuos vacunados con vacuna conjugada frente a serogrupo C, sin inactivar en este caso la fuente de complemento endógena. Se añadieron 100  $\mu$ l de suero al primer pocillo de cada fila (por triplicado) desde donde se realizaron diluciones dobles (1:2, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) en medio DMEM glutaMAX™. Se añadieron 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana en cada pocillo que se mezclaron con las diluciones del suero. Tras incubar la placa a 37°C durante 1 hora, se sembraron en agar BHI alícuotas de 10  $\mu$ l de cada pocillo por triplicado, del cultivo sin diluir y a diluciones 1:5 y 1:25 en medio DMEM glutaMAX™. Después de incubación durante toda la noche, se determinó la proporción de bacteria que sobrevivió en cada una de las diluciones.

El ensayo se realizó por triplicado a partir de cultivos obtenidos en días diferentes. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba t de Student.

## 5 Western-blot

El análisis del grado de sialización del LPS y de la expresión de la proteína PorA se realizaron mediante Western-blot.

### 5.1 Preparación de los extractos celulares

Se preparó una suspensión de  $10^9$  UFC/ml de bacteria que tras centrifugación, se resuspendió en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada añadiendo el mismo volumen de tampón de muestra, dodecil-sulfato sódico para electroforesis en geles de poliacrilamida (tampón SDS-PAGE 2 $\times$ ): Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS al 4%, glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0,2% y  $\beta$ -mercaptoetanol 200 mM. La mezcla se calentó a 90°C durante 10 minutos. Los extractos celulares quedaron listos para su uso y se almacenaron a -20°C.

Para el análisis del LPS, los extractos celulares se resuspendieron en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada y en 50  $\mu$ l de tampón de muestra, LPS 2 $\times$  (SDS al 6%, 2-mercaptoetanol, ditioreitol (DDT) 10 mM, glicerol al 46%, Tris HCl 60 mM, pH 8 y azul de bromofenol al 0,1%) y después de incubarse a 90°C durante 10 minutos fueron tratados con 1  $\mu$ l de proteinasa K (Qiagen) a 37°C durante toda la noche y a 55°C durante tres horas adicionales. Los extractos celulares quedaron listos para su uso y se almacenaron a -20°C.

### 5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles verticales de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico SDS de acuerdo con el método descrito por Sambrook (Sambrook et al., 1989).

Para el desarrollo de la técnica se utilizaron geles concentradores y separadores. El gel concentrador estaba compuesto por poliacrilamida al 4% y SDS al 0,1% en tampón Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8. El gel separador se utilizó al 12% de poliacrilamida en tampón Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 con SDS al 0,1%. En

ambos geles se empleó como sistema catalizador de la polimerización el persulfato amónico (APS) al 0,1% y la tetrametiletildiamina (TEMED).

Para el análisis del LPS, el gel concentrador se preparó con poliacrilamida al 4% y SDS al 0,3% en tampón Tris-HCl 3 M, pH 8,45, SDS al 0,3% y urea al 25%. El gel separador y la polimerización con APS y TEMED se utilizó tal y como se ha descrito en el párrafo anterior.

Los extractos celulares, antes de ser cargados en el gel se hirvieron durante 5 minutos y tras una centrifugación rápida, 10  $\mu$ l de los mismos y 5  $\mu$ l del marcador de peso molecular preteñido (Precision Plus All Blue Protein Standards, 6.4-250 kDa , Bio-Rad) se analizaron mediante SDS-PAGE. La electroforesis se realizó en una cubeta Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad) con tampón SDS (glicina 200 mM, Tris-HCl 248 mM y SDS 34 mM) a 150 voltios durante 1 hora y media.

Para el análisis del LPS se utilizaron dos tampones específicos de electroforesis: tampón del ánodo (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9) y tampón del cátodo (Tris-HCl 0,1 M, Tricina al 0,1% y SDS al 0,1%, pH 8,25). La electroforesis se comenzó a 30 voltios hasta que todas las muestras entraron en el gel separador, continuando después a 105 voltios durante 1 hora y media aproximadamente.

Una vez realizada la electroforesis, los geles de poliacrilamida se tiñeron para visualizar los extractos proteicos separados. En otras ocasiones los geles se emplearon para realizar la transferencia a membranas mediante electroforesis.

### **5.3 Tinción de los geles de SDS-PAGE**

Los geles se tiñeron con solución colorante de azul de Coomassie (Coomassie Blue R-250 al 0,2% (BioRad), etanol al 40%, ácido acético glacial al 10% y H<sub>2</sub>O destilada al 50%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, los geles se mantuvieron durante 10 minutos en solución decolorante I (metanol al 40%, ácido acético glacial a 10% y H<sub>2</sub>O destilada al 50%). La solución decolorante I se reemplazó por solución decolorante II (ácido acético glacial al 10%, glicerol al 4% y H<sub>2</sub>O destilada al 86%) donde los geles permanecieron durante toda la noche.

## 5.4 Transferencia a membranas

Las proteínas previamente sometidas a SDS-PAGE se transfirieron a membranas de difluoro de polivinilideno (PVDF) Immobilon P (Millipore) utilizando el sistema comercial Mini Trans-Blot® (Bio-Rad).

Se utilizó por cada gel, una membrana de PVDF y dos piezas de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño que el gel separador. La membrana de PVDF se equilibró en metanol durante 15 segundos y el papel Whatman, junto con las almohadillas de fibra suministradas, se equilibraron en tampón de transferencia (Tris 48 mM y glicina 39 mM, pH 8,3) durante 15 minutos. Estos componentes se colocaron en el soporte de electrotransferencia a modo de “sándwich”: las almohadillas y el papel Whatman se situaron en la parte exterior y en el interior quedaron en contacto el gel y la membrana de PVDF. Todo el sistema se colocó en el recipiente de transferencia junto con un bloque de hielo. La transferencia se realizó mediante electroforesis a 70 voltios durante 1 hora empleando el tampón de transferencia.

## 5.5 Incubación con los anticuerpos

Una vez terminada la transferencia, las membranas de PVDF se bloquearon cubriéndolas con leche al 5% en PBS, a 4°C durante toda la noche y en agitación constante (20 rpm).

En un paso previo a la incubación con los anticuerpos se realizaron tres lavados de las membranas con solución de bloqueo (PBS con Tween-20 al 0,05% y leche al 0,5%) durante 10 minutos en agitación (20 rpm) a Tª ambiente.

Para el estudio de la sialización del LPS, las membranas se incubaron durante cinco horas con el anticuerpo primario (Ac 1ª<sup>rio</sup>), el Acm 3F11 (cedido por M. Apicella, University of Iowa, Iowa City, IA), que reconoce LPS no sializado (Exley et al, 2005). Se realizaron 3 lavados y las membranas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario (Ac 2ª<sup>rio</sup>), inmunoglobulina anti-murina conjugada a peroxidasa HRP (Ig-antimurina-HRP) (DakoCytomation). El exceso de anticuerpo fue retirado con tres lavados siguiendo el procedimiento anterior.

En el caso del análisis de expresión de la proteína PorA, las membranas se incubaron durante 2 horas con el Ac 1<sup>añio</sup>, Acm P1.5 y con Ig-antimurina-HRP siguiendo las condiciones anteriormente descritas.

Todas las incubaciones se realizaron a T<sup>a</sup> ambiente y en agitación (20 rpm). Para los lavados y para diluir los anticuerpos se empleó solución de bloqueo.

En la Tabla 10 se resumen los procesos de incubación con los anticuerpos empleados.

**Tabla 10. Anticuerpos y condiciones empleadas en el análisis de la sialización del LPS y de la expresión de PorA mediante Western-blot**

Proceso	Ac1 <sup>añio</sup>	Dilución	Incubación	Ac 2 <sup>añio</sup>	Dilución	Incubación
<b>Sialización del LPS</b>	Acm	1:100	T <sup>a</sup> amb	Ig- antimurina- HRP	1:1000	T <sup>a</sup> amb
	3F11		5 horas			1 hora
<b>Expresión de PorA</b>	Acm	1:2000	T <sup>a</sup> amb	Ig- antimurina- HRP	1:1000	T <sup>a</sup> amb
	P1.5		2 horas			1 hora

## 5.6 Detección de los antígenos analizados

Para la detección se utilizó el sistema comercial ECL (Amersham Biosciences) basado en una reacción de quimioluminiscencia.

Las soluciones 1 y 2 se mezclaron en partes iguales, cubriendo cada membrana con 3ml de la mezcla durante 1 minuto tras el cual, se eliminó la solución sobrante en papel Whatman. Las membranas se colocaron en el cassette de detección y sobre ellas una película fotográfica (Hyperfilm-ECL, Amersham Biosciences). Los tiempos de exposición de las películas fueron de 10 minutos para el análisis de la sialización del LPS y de 1 minuto para el análisis de la expresión de la proteína PorA.

## 6 Citometría de flujo: *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)

Mediante FACS se llevó a cabo el análisis del grado de acetilación de la cápsula, la cuantificación del polisacárido capsular, la detección del depósito del los factores del complemento y la detección de la proteína PorA.

### 6.1 Preparación de las bacterias

Se preparó una suspensión de  $10^9$  bacterias en 10 ml de BHI líquido que se incubó a 37°C en agitación (150 rpm) hasta alcanzar la fase semilogarítmica con una D.O. de 0,5, medida a  $A_{600}$ . Se prepararon alícuotas de 1ml que se centrifugaron a  $10.000 \times g$  durante 2 minutos, para fijar la bacteria con 1ml de paraformaldehído (PFA) al 3% durante toda la noche a 4°C. Una vez fijadas en PFA, las bacterias se centrifugaron a  $10.000 \times g$  durante 10 minutos, se lavaron con PBS y finalmente se resuspendieron en 850  $\mu$ l de PBS y 150  $\mu$ l de glicerol al 80%, quedando listas para su uso o se almacenaron a -80°C.

Para conocer el número de bacterias por ml, se sembraron 10  $\mu$ l de varias diluciones seriadas ( $1:10^2$  a  $1:10^6$ ) del cultivo en medio líquido en agar BHI que se incubó a 37°C durante 18 horas.

### 6.2 Incubación con los anticuerpos

Previamente a la incubación con los anticuerpos, las células bacterianas conservadas en glicerol se lavaron dos veces, añadiendo PBS que contenía Tween-20 al 0,1% (PBS-T) y centrifugándose a  $10.000 \times g$  durante 10 minutos.

Para el análisis de la acetilación de la cápsula, la bacteria ( $2 \times 10^7$  células) se incubó con el Ac 1<sup>ario</sup>, Acm 1125 (cedido por H. Claus, University of Würzburg, Würzburg, Alemania), a 37°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS-T y se incubaron en hielo y en oscuridad durante 30 minutos con el Ac 2<sup>ario</sup>, anticuerpo policlonal anti-murino conjugado con el fluorocromo FITC (AcP-antimurino-FITC) (Jackson Immuno-Research Laboratories).

Para detectar la cantidad de cápsula expresada por las cepas en estudio,  $2 \times 10^7$  bacterias se incubaron con suero anti-capsular (obtenido tras la inmunización de ratones con vacuna conjugada comercial) a  $4^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Después de dos lavados, las células se resuspendieron en PBS-T conteniendo el AcP-antimurino-FITC, incubándose en hielo y en oscuridad durante 30 minutos.

Para detectar la unión de los factores del complemento,  $2 \times 10^7$  bacterias se incubaron con suero inmune (mezcla de 10 sueros de individuos vacunados) a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos y se hicieron dos lavados con PBS-T. Para determinar el depósito del componente C3, las células se resuspendieron en PBS-T conteniendo el anticuerpo policlonal anti-C3 humano conjugado con FITC (Ac-antiC3-FITC) (MP Biomedicals), que se incubó en hielo y en oscuridad durante 30 minutos. Para la analizar la fijación del MAC, las bacterias se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante toda la noche con anticuerpo anti-C5b-9 humano (EMD Biosciences). Tras dos lavados con PBS, se resuspendieron en el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor (Invitrogen) y se incubó en hielo y en oscuridad durante 30 minutos. La actividad de la vía clásica y de la vía de lectinas se inhibió al añadir al suero  $\text{MgCl}_2$  (4 mM) y EGTA (10 mM) (Jongorius et al., 2007). Para la detección del depósito de C3 y de la fijación del MAC en ausencia de ambas vías, se utilizaron los mismos anticuerpos y se siguió el mismo protocolo anteriormente descrito.

Para la detección de la proteína PorA, la bacteria ( $2 \times 10^7$  células) se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos con el Acm P1.5. Tras dos lavados, se incubó en hielo y en oscuridad durante 30 minutos con AcP-antimurino-FITC.

Tras la incubación con los anticuerpos, las bacterias se lavaron dos veces con PBS-T y se resuspendieron en PBS quedando preparadas para realizar la detección en el citómetro.

En la Tabla 11 se resumen los procesos de incubación con todos los anticuerpos empleados.

**Tabla 11. Anticuerpos y condiciones empleadas para la detección mediante FACS de la acetilación capsular, de la cantidad de cápsula expresada, de la fijación de los factores del complemento y de la proteína PorA**

Proceso	Ac1 <sup>afio</sup>	Dilución	Incubación	Ac2 <sup>afio</sup>	Dilución	Incubación
<b>Acetilación capsular</b>	Acm	1:500	37°C	AcP-	1:200	Hielo
	1125		30 minutos	antimurino-FITC		Oscuridad 30 minutos
<b>Cuantif. de la cápsula</b>	Suero	1:10	4°C	AcP-	1:200	Hielo
	inmune murino		Noche	antimurino-FITC		Oscuridad 30 minutos
<b>Depósito de C3*</b>	Ac-antiC3-FITC	1:300	Hielo Oscuridad 30 minutos			
<b>Inserción del MAC*</b>	Ac-	1:200	4°C	Ac-	1:200	Hielo
	antic5-9		Noche	anticonejo-FITC		Oscuridad 30 minutos
<b>Detección de PorA</b>	Acm P1.5	1:200	37°C 30 minutos	AcP- antimurino-FITC	1:200	Hielo Oscuridad 30 minutos

\*Para la detección de los factores del complemento, en un paso previo a la incubación con los anticuerpos, la bacteria se incubó con una mezcla de 10 sueros humanos inmunes. Para el C3 se requirió incubación con un único anticuerpo.

### 6.3 Detección

La detección se realizó mediante la medida de la fluorescencia de la población bacteriana, ajustada en función de su tamaño y complejidad, utilizando un citómetro de flujo (FACS Calibur; Becton Dickson). El tamaño de la población adquirida fue de al menos  $10^3$  células por muestra. Como control negativo se utilizó la bacteria incubada en PBS y en los mismos anticuerpos requeridos para cada experimento. Los resultados se expresaron como Índice Relativo de Fluorescencia (IRF), calculado como la media geométrica de la fluorescencia

multiplicada por el número de células positivas, respecto a una de las cepas control.

Cada experimento se realizó por triplicado con tres repeticiones por experimento, partiendo de cultivos obtenidos en ocasiones diferentes. Las diferencias significativas se determinaron mediante a prueba t de Student.

## 7 Métodos moleculares

### 7.1 Aislamiento de ADN cromosómico y plasmídico

Para la extracción de ADN cromosómico, la bacteria se cultivó en agar BHI durante toda la noche, se recogió medio asa de siembra y se resuspendió en 560  $\mu$ l de tampón TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM, pH 7,6), 30  $\mu$ l de SDS al 10% y en 3  $\mu$ l de proteinasa K (20  $\mu$ g/ml, Sigma, UK). Después de incubar la mezcla a 37°C durante una hora, se añadieron 100  $\mu$ l de NaCl 5 M y 80  $\mu$ l de bromuro de cetil trimetil amonio-NaCl (CTAB al 10%, Sigma; NaCl 0,7 M, BDH), la solución se mezcló y se incubó a 65°C durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf y se extrajo mediante adición de 700  $\mu$ l de fenol (BDH), 700  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (Merck) e isopropanol (0,7 $\times$  volumen), realizando centrifugaciones a 10.000  $\times$  g durante 5 minutos. Para precipitar el ADN se añadió 1 ml de etanol al 70% y se volvió a centrifugar. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó a 37°C durante 15 minutos. Finalmente, el ADN extraído se resuspendió en tampón TE, se añadió 1 $\mu$ l de ARNasa (100  $\mu$ g/ml) incubándose a 37°C durante 15 minutos.

Para el aislamiento de ADN plasmídico, se utilizó el sistema comercial QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones proporcionadas el fabricante. Dicho protocolo está diseñado para la purificación de hasta 20  $\mu$ g de ADN plasmídico a partir de un cultivo de *E. coli* en medio líquido durante toda la noche. Se comenzó centrifugando a 10.000  $\times$  g durante 5 minutos, 2,5 ml de cultivo bacteriano en medio líquido Luria-Bertani (LB) (8g de caldo LB (Oxoid) en

400 ml H<sub>2</sub>O destilada) que se resuspendió en 250 µl de tampón P1. Se añadieron 250 µl de tampón P2 y 350 µl de tampón N3, mezclando suavemente la solución. Se centrifugó durante 10 minutos a  $17.900 \times g$  y el sobrenadante se transfirió a una de las columnas suministradas (QIAprep spin column). A continuación, se centrifugó durante 1 minuto y se decantó el eluido. Se añadieron 750 µl de tampón PE, se centrifugó en dos ocasiones durante 1 minuto y se decantó el eluido. Para obtener el ADN plasmídico, la columna se pasó a un tubo limpio y se añadieron sobre el centro de la columna 30 µl de tampón EB (Tris-Cl 10 mM, pH 8,5) que se mantuvo durante 1 minuto antes de centrifugar durante otro minuto.

## 7.2 Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR se utilizó para amplificar el gen *oatC*, para la amplificación del operón capsular, para amplificar la RIG *siaA-ctrA* y en la amplificación de la secuencia de inserción IS1301.

Todos los cebadores empleados (suministrados por Sigma-Aldrich) se diseñaron utilizando la página [www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer](http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer) y los dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) utilizados se prepararon en el laboratorio, en una solución de 100 Mm que contenía 25 mM de cada uno de ellos. Se utilizaron los sistemas comerciales Expand High Fidelity PCR System (Roche) y Expand Long Template PCR System (Roche) que contenían la enzima polimerasa y los tampones de reacción específicos. En todos los ensayos se empleó agua desionizada estéril libre de proteasas y nucleasas (Sigma-Aldrich). La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó en un termociclador MyCycler™ versión 1.06 (BioRad Laboratories).

Las condiciones óptimas de las reacciones de PCR (temperaturas y concentración de reactivos) se determinaron utilizando un control positivo (todos los reactivos de la mezcla y ADN problema) y un control negativo (todos los reactivos de la mezcla sin ADN).

En los siguientes apartados se indican los cebadores utilizados, los reactivos empleados y las condiciones de PCR para la amplificación de todos los genes en estudio.

### 7.2.1 Amplificación del gen *oatC*

En la Tabla 12 aparecen las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar el gen *oatC*. Los reactivos y las condiciones empleadas para el proceso de amplificación se describen en las Tablas 13 y 14, respectivamente.

**Tabla 12. Cebadores utilizados en la PCR para amplificar el gen *oatC***

Cebador	Secuencia del cebador	Producto amplificado
NG541 (F)	5' - ATGTCAATCAATACGTTTG - 3'	<i>oatC</i> (2,2 Kb)
NG542 (R)	5' - GCATGATTTTAGAATTGCAGAG - 3'	<i>oatC</i> (2,2 Kb)

**Tabla 13. Reactivos empleados en la PCR para amplificar el gen *oatC***

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón 10× Expand High Fidelity	5	1×
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1	1 mM
Mezcla de dNTPs (100 mM)	0,4	0,2 mM cada dNTP
Cebador NG541 (50 $\mu$ M)	1	1 $\mu$ M
Cebador NG542 (50 $\mu$ M)	1	1 $\mu$ M
Enzima Expand High Fidelity	0,5	2,5 U
ADN problema	1	---
H <sub>2</sub> O desionizada estéril	Hasta 50 $\mu$ l	---

**Tabla 14. Condiciones empleadas en la PCR para amplificar el gen *oatC***

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	94°C	5 minutos	1
<b>Amplificación</b>			
Desnaturalización	94°C	30 segundos	2
Hibridación	70°C a 64°C*	30 segundos	
Extensión	72°C	2 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Hibridación	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	2 minutos	
<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos	1

\*Las temperaturas de hibridación descendieron en rampas de 1,5°C cada 2 ciclos.

### 7.2.2 Amplificación del operón capsular

Se diseñaron cebadores para amplificar 6 regiones solapadas (con tamaños comprendidos entre 3 kb y 5 Kb) para completar las 25 Kb que componen el operón *cps*.

En la Tabla 15 aparecen las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar el operón capsular. Los reactivos y las condiciones empleadas para el proceso de amplificación se describen en las Tablas 16 y 17, respectivamente.

**Tabla 15. Cebadores utilizados en la PCR para amplificar el operón capsular *cps***

Cebador	Secuencia del cebador	Producto amplificado
NG634 (F)	5' - AAAGTTGCCCTGCCCGTCCTT - 3'	Región 1(4.980 pb)
NG635 (R)	5' - TCTGCAACCCTTAGCAAAATAG - 3'	Región 1(4.980 pb)
NG636 (F))	5' - TCCAAATTTTCGCCATGCTTC - 3	Región 2(5.037 pb)
NG637 (R)	5' - TCATCCACTAAAAACCCTGCTTC - 3	Región 2(5.037 pb)
NG638 (F)	5' - CGTTGTTGTTTTGCATTTAGC - 3	Región 3(5.019 pb)
NG639 (R)	5' - ACATCGCTGCCAAAATATCC - 3	Región 3(5.019 pb)
NG640 (F)	5' - TTGCGATTGGCTGGATTGA - 3	Región 4(5.024 pb)
NG641 (R)	5' - TTATTCGGGATGCCGTTTG - 3	Región 4(5.024 pb)
NG642 (F)	5' - CGTAAAAATATAGGGAAACTGGA - 3	Región 5(4.122 pb)
NG643 (R)	5' - GCCAGTTGGGTCAGATAGCTT - 3	Región 5(4.122 pb)
NG670 (F)	5' - TCGTCCAAACCGTGCAAAA - 3	Región 6(3.284 pb)
NG671 (R)	5' - TCGCCAAGTTAGGTTGTTGGT - 3	Región 6(3.284 pb)

**Tabla 16. Reactivos empleados en la PCR para amplificar el operón capsular *cps***

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón 10× Expand Long Template	5	1×
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1	1 mM
Mezcla de dNTPs (100 mM)	1,2	0,6 mM cada dNTP
Cebador F (50 $\mu$ M)	1	1 $\mu$ M
Cebador R (50 $\mu$ M)	1	1 $\mu$ M
Enzima Expand Long Template	0,5	2,5 U
ADN problema	1	---
Agua desionizada estéril	Hasta 50 $\mu$ l	---

**Tabla 17. Condiciones empleadas en la PCR para amplificar el operón capsular *cps***

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	94°C	5 minutos	1
<b>Amplificación</b>			
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Hibridación	57°C*	30 segundos	
Extensión	68°C	5 minutos	
<b>Extensión final</b>	68°C	7 minutos	1

\*La temperaturas de hibridación fueron de 57°C, excepto para amplificar las regiones 1 y 2 que fueron de 63°C y 60°C, respectivamente.

Para la amplificación de 6 fragmentos internos de la región 3 (amplificada por los cebadores NG638-NG639), se diseñaron 6 nuevas parejas de cebadores (Tabla 18). Los reactivos y las condiciones de PCR empleadas, se muestran en las Tablas 19 y 20, respectivamente.

**Tabla 18. Cebadores utilizados en la PCR para amplificar 5 fragmentos internos de la región 3 del *cps***

Cebador	Secuencia del cebador	Región amplificada
NG678 (F)	5' - GATTCAAATCGATAAAACG - 3'	Fragmento 1 (808 pb)
NG688 (R)	5' - GCAGCTGTAGGTGCATTA - 3'	Fragmento 1 (808 pb)
NG679 (F))	5' - ACCAAGTGGATATGAGAA - 3	Fragmento 2 (819 pb)
NG687 (R)	5' - GCCGAAGCATAACCATCG - 3	Fragmento 2 (819 pb)
NG680 (F)	5' - TCTGAAGTTCAAATTCCT - 3	Fragmento 3 (812 pb)
NG686 (R)	5' - GCCGGCAATTCCACCAAT - 3	Fragmento 3 (812 pb)
NG681 (F)	5' - GAGGCTTATCGCTTTCTG - 3	Fragmento 4 (820 pb)
NG685 (R)	5' - AAATTGATCATCACCTGA - 3	Fragmento 4 (820 pb)
NG682 (F)	5' - CCGGTGCGTGAGTTTTAT - 3	Fragmento 5 (809 pb)
NG684 (R)	5' - ATGCTCACGAATGCTGGC - 3	Fragmento 5 (809 pb)

**Tabla 19. Reactivos empleados en la PCR para amplificar 5 fragmentos internos de la región 3 del *cps***

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón 10 $\times$ Expand High Fidelity	5	1 $\times$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1	1 mM
Mezcla de dNTPs (100 mM)	0,4	0,2 mM cada dNTP
Cebador F (50 $\mu$ M)	1	1 $\mu$ M
Cebador R (50 $\mu$ M)	1	1 $\mu$ M
Enzima Expand High Fidelity	0,5	2,5 U
ADN problema	1	---
Agua desionizada estéril	Hasta 50 $\mu$ l	---

**Tabla 20. Condiciones empleadas en la PCR para amplificar 5 fragmentos internos de la región 3 del *cps***

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	94°C	5 minutos	1
<b>Amplificación</b>			
Desnaturalización	94°C	30 segundos	2
Hibridación	70°C-64°C*	30 segundos	
Extensión	72°C	2 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Hibridación	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	2 minutos	
<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos	1

\*Las temperaturas de hibridación descendieron en rampas de 1,5°C cada 2 ciclos.

### 7.2.3 Amplificación de la región intergénica entre los genes *siaA* y *ctrA*

En las siguientes tablas se muestran los cebadores (Tabla 21), los reactivos (Tabla 22) y las condiciones de reacción empleados (Tabla 23) para amplificar una secuencia parcial de los genes *siaA* y *ctrA* y la RIG comprendida entre ambos.

**Tabla 21. Cebadores utilizados en la PCR para amplificar la RIG *siaA-ctrA***

Cebador	Secuencia del cebador	Producto amplificado
NG732 (F)	5' - GCTCTGGTACCTGTAATGCAA - 3'	<i>siaA</i> -RIG- <i>ctrA</i> (276 pb)
NG733 (R)	5' - ATTTTTTTTGCCTGGGG - 3'	<i>siaA</i> -RIG- <i>ctrA</i> (276 pb)

**Tabla 22. Reactivos empleados en la PCR para amplificar la RIG *siaA-ctrA***

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón 10 $\times$ Expand High Fidelity	5	1 $\times$
Mezcla de dNTPs (100 mM)	0,4	0,2 mM cada dNTP
Cebador F (5 $\mu$ M)	2	0,2 $\mu$ M
Cebador R (5 $\mu$ M)	2	0,2 $\mu$ M
Enzima Expand High Fidelity	0,5	2,5 U
ADN problema	1	---
Agua desionizada estéril	Hasta 50 $\mu$ l	---

**Tabla 23. Condiciones empleadas en la PCR para amplificar la RIG *siaA-ctrA***

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	94°C	5 minutos	1
<b>Amplificación</b>			
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Hibridación	55	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
<b>Extensión final</b>	72°C	7 minutos	1

#### 7.2.4 Amplificación de la secuencia de inserción IS1301

En la Tabla 24 aparecen las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar el operón capsular. Los reactivos y las condiciones empleadas para el proceso de amplificación se describen en las Tablas 25 y 26, respectivamente.

**Tabla 24. Cebadores utilizados en la PCR para amplificar la secuencia IS1301**

Cebador	Secuencia del cebador	Producto amplificado
NG742 (F)	5' - GGCGTGTCCCTAATTTGAAT - 3'	IS1301 (844 pb)
NG743 (R)	5' - GGCGTGTCTCAATTTAACT - 3'	IS1301 (844 pb)

**Tabla 25. Reactivos empleados en la PCR para amplificar la secuencia IS1301**

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón 10 $\times$ Expand High Fidelity	5	1 $\times$
Mezcla de dNTPs (100 mM)	0,4	0,2 mM cada dNTP
Cebador F (50 $\mu$ M)	1	1 $\mu$ M
Cebador R (50 $\mu$ M)	1	1 $\mu$ M
Enzima Expand High Fidelity	0,5	2,5 U
ADN problema	1	---
Agua desionizada estéril	Hasta 50 $\mu$ l	---

**Tabla 26. Condiciones empleadas en la PCR para amplificar la secuencia IS1301**

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	94°C	5 minutos	1
<b>Amplificación</b>			
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Hibridación	53°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos	1

### 7.3 Electroforesis en geles de agarosa y purificación del ADN

Los productos obtenidos por PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa. Para ello, el ADN se combinó con tampón de carga (azul de bromofenol al 0,25%, xileno cianol FF, glicerol al 30%) y se analizó en geles de agarosa al 0,8%, mediante electroforesis en tampón TAE (Tris 0,4 M, EDTA-Na 0,01 M, ácido acético 12,01 g/L 0,2 M). El ADN se visualizó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (UVP).

Los productos de la reacción de amplificación se purificaron para eliminar los componentes que pudiesen interferir en reacciones posteriores.

Cuando se obtuvieron productos específicos en la reacción de PCR, se utilizó el sistema comercial QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen). Se siguió el protocolo establecido por el fabricante: se añadieron 5 volúmenes de tampón PB al producto de PCR, se pasaron por una columna (QIAquick column) mediante centrifugación y se decantó el eluido. A continuación, se añadieron a la columna 750 µl de tampón PE y se realizaron dos centrifugaciones sucesivas y se pasó la columna a un nuevo tubo. Para eluir el ADN fijado a la columna, se añadieron 30 µl de tampón EB o de H<sub>2</sub>O destilada al centro de la membrana, se mantuvo 1 minuto a T<sup>a</sup> ambiente y se centrifugó. Todas las centrifugaciones se realizaron a 17.900 × g durante 1 minuto.

El sistema QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) se utilizó cuando fue necesario purificar el fragmento de interés a partir del gel. En estos casos, el producto se extrajo de la zona del fragmento deseado, añadiendo 3 volúmenes de tampón QC por volumen de gel e incubándose a 50°C durante 10 minutos hasta solubilizar la agarosa. Posteriormente, se adicionó un volumen de isopropanol y se pasó por una columna (QIA spin column), mediante centrifugación, para unir el ADN. A continuación, se añadieron a la columna 500 µl de tampón QG y 750 µl de tampón PE, con una centrifugación intermedia. Después de dos centrifugaciones sucesivas para retirar los restos de etanol, el ADN unido a la columna se eluyó mediante la adición de 30 µl de tampón EB o

de H<sub>2</sub>O destilada al centro de la membrana centrifugándose posteriormente. Todas las centrifugaciones se realizaron a  $17.900 \times g$  durante 1 minuto.

#### 7.4 Secuenciación

Las reacciones de secuencia se prepararon con 20 ng/ $\mu$ l del producto de PCR purificado añadiendo 1  $\mu$ l de cada cebador (3,2 pmol/ $\mu$ l) y H<sub>2</sub>O destilada hasta completar un volumen final de 10  $\mu$ l.

La secuenciación de los productos de amplificación purificados se realizó de manera automática en el Departamento de Bioquímica de Imperial College, Hammersmith Campus.

Para secuenciar un fragmento del gen *oatC* se utilizaron los cebadores NG541 (secuencia en Tabla 12) y NG560 (CCGTTGCATACGAATTCTGA). En la secuenciación de la RIG *siaA-ctrA* se emplearon los mismos cebadores que para su amplificación (NG732 y NG733, Tabla 21).

#### 7.5 Aislamiento y purificación de ARN

La bacteria se cultivó en 10 ml de BHI líquido y se incubó a 37°C en agitación constante hasta alcanzar la fase semilogarítmica con una D.O. de 0,6, medida a A<sub>600</sub>.

Para la extracción y purificación del ARN se empleó un proceso de lisis enzimática y digestión con proteinasa K, utilizando el sistema comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen) junto con el RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen).

Siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, se añadió 1 volumen de cultivo bacteriano ( $10^9$  bacterias) a 2 volúmenes del reactivo RNAprotect Bacteria Reagent y se incubó a T<sup>a</sup> ambiente durante 5 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a  $5.000 \times g$  y el precipitado se resuspendió con 200  $\mu$ l de tampón de lisis (Tris-Cl 30 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 conteniendo 15 mg/ml de lisozima (Sigma) y 15  $\mu$ l de proteinasa K, Qiagen). La bacteria se incubó con el tampón de lisis a T<sup>a</sup> ambiente durante 15-30 minutos, mezclando vigorosamente cada 5 minutos. A continuación se añadieron 700  $\mu$ l de tampón

RLT (suministrado en el sistema), que contenía 14,3 M  $\beta$ -mercaptoetanol, y una vez mezclado se añadieron 500  $\mu$ l de etanol al 96%.

Para la purificación del ARN total a partir del lisado bacteriano se utilizó el sistema RNeasy Mini Kit. Se transfirieron 700  $\mu$ l del lisado a una de las columnas suministradas que se centrifugó durante 30 segundos. Para lavar la membrana se añadieron 350  $\mu$ l de tampón RW1 (suministrado en el sistema) y se centrifugó durante 30 segundos. Para eliminar el ADN cromosómico se trató con DNase (Qiagen) que se añadió a la membrana, realizándose 2 incubaciones a T<sup>a</sup> ambiente durante 20 minutos, con lavados con el tampón RW1. Tras la digestión, la columna se colocó en un nuevo tubo y se realizaron dos lavados con 500  $\mu$ l de tampón RPE (suministrado en el sistema), con centrifugaciones de 30 segundos y de 2 minutos para eliminar todo el exceso de etanol. Finalmente, se añadieron 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O (RNase free-water) y se centrifugó para obtener el ARN eluido. Por cada 20  $\mu$ l de eluido se añadieron 1  $\mu$ l de RNase inhibitor (Ambion) con el fin de preservar la integridad del ARN obtenido. Todas las centrifugaciones realizadas para la purificación del ARN fueron a 10.000  $\times$  g.

El ARN obtenido se cuantificó por la medida de la D.O. a A<sub>260-280</sub> y se analizó por electroforesis en gel de agarosa. Para ello, 5  $\mu$ l de ARN se combinaron con 15  $\mu$ l de Formaldehyde Load Dye (Ambion) que se incubaron en un baño de H<sub>2</sub>O a 65°C durante 15 minutos. La mezcla se analizó en un gel de agarosa al 0,8% mediante electroforesis en tampón TAE. El ARN se visualizó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (UVP).

## 7.6 Reacción de transcripción inversa

La reacción de retrotranscripción de ARN a ADNc se llevó a cabo con el sistema comercial SuperScript™ III First-Strand Synthesis (Invitrogen).

Se preparó una mezcla de 500 ng de ARN con 50 ng de *random hexamers primers* y 1  $\mu$ l de dNTPs (10 mM) hasta un volumen final de 10  $\mu$ l. Se incubó a 65°C durante 5 minutos y se mantuvo en hielo durante al menos 1 minuto. A esta mezcla se añadieron 10  $\mu$ l de solución de síntesis de ADNc compuesta por: 2  $\mu$ l de RT buffer 10 $\times$ , 4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2  $\mu$ l de DTT 0,1 M, 1

μl de RNase OUT™ y 1 μl de SuperScript™ III RT (transcriptasa inversa). La reacción se incubó a 25°C durante 10 minutos, seguido de una incubación a 50°C durante 50 minutos, para la síntesis del ADNc, finalizando a 85°C durante 5 minutos. Para eliminar restos de ARN se añadió al producto de síntesis 1 μl de RNase H y se incubó a 37°C durante 20 minutos.

### 7.7 PCR cuantitativa a tiempo real

Los niveles de transcripción de los genes *siaA* y *ctrA* se midieron mediante PCR cuantitativa a tiempo real con transcripción inversa (qrRT-PCR) usando el sistema comercial SensiMix con detección mediante SYBR® Green (Quantace) en un termociclador (Rotor-Gene 3000; Corbett Research).

Los resultados para la transcripción de los genes *siaA* y *ctrA* fueron normalizados según los niveles obtenidos para el gen *gdh* utilizado como control. Los controles de la reacción incluyeron reacciones en las que no se añadió ADNc y muestras de ARN que no habían sido tratadas con la transcriptasa inversa.

Los datos fueron analizados utilizando el método cuantitativo de cuantificación del programa de Rotor Gene (versión 6.0; Corbett Research). La qrRT-PCR se realizó por triplicado en muestras de ADNc obtenidas después de realizar tres cultivos diferentes y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba t de Student.

En la Tabla 27 aparecen las secuencias de los cebadores utilizados para realizar la qrRT-PCR. Los reactivos y las condiciones empleadas para el proceso se describen en las Tablas 28 y 29, respectivamente.

Tabla 27. Cebadores utilizados en la qrRT-PCR de los genes *siaA* y *ctrA*

Cebador	Secuencia	Producto amplificado
NG770 (F)	5' - CGACTTCGGCAAGCTAAAA - 3'	<i>siaA</i> (221pb)
NG771 (R)	5' - GACGAGAGATAAACGTAATGG - 3'	<i>siaA</i> (221pb)
NG772 (F)	5' - TGTGTGGAAGTTTAATTGTAGG - 3'	<i>ctrA</i> (194pb)
NG773 (R)	5' - ATAACCATCGCCAAACTGAG - 3'	<i>ctrA</i> (194pb)
NG886 (F)	5' - AGTTTTACGACATTACCGGCG - 3'	<i>gdh</i> (235pb)
NG887 (R)	5' - TCAAGATAGCCGTTTCATGCCT - 3'	<i>gdh</i> (235pb)

Tabla 28. Reactivos empleados en la qrRT-PCR de los genes *siaA* y *ctrA*

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
SensiMix 2 $\times$	12,5	1 $\times$
SYBR <sup>®</sup> Green solución 50 $\times$	0,5	1 $\times$
Cebador F (5 $\mu$ M)	1	200 nM
Cebador R (5 $\mu$ M)	1	200 nM
ADNc problema	1	---
Agua desionizada estéril	Hasta 25 $\mu$ l	---

Tabla 29. Condiciones empleadas en la qrRT-PCR de los genes *siaA* y *ctrA*

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	95°C	10 minutos	1
<b>Amplificación</b>			
Desnaturalización	95°C	20 segundos	40
Hibridación	60°C	15 segundos	
Extensión	72°C	20 segundos	

## **7.8 Obtención de las cepas mutantes en los genes *oatC*, *Ist* y *siaD***

### **7.8.1 Obtención de los mutantes en *oatC***

#### **7.8.1.1 Inactivación del gen *oatC*. Construcción del vector PMJ1**

Se amplificó un fragmento de 2,2 Kb que contenía el gen *oatC*, en una de las cepas sensibles, utilizando los cebadores NG541 y NG542 y siguiendo las condiciones descritas en el apartado 7.2.1.

El producto de PCR se ligó en el vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen), de 3,9 Kb, que contiene dos genes que codifican resistencia a kanamicina y a ampicilina. Para la reacción de clonación (Tabla 30) se empleó el sistema comercial TOPO TA Cloning System (Invitrogen). La reacción se incubó a T<sup>a</sup> ambiente durante 15 minutos y se mantuvo en hielo antes de proceder a la reacción de transformación. Se añadieron 3 µl del producto clonado a un vial que contenía células químicamente competentes, *E. coli* TOPO 10. Se incubó en hielo durante 30 minutos, tras un choque térmico a 42°C durante 1 minuto, se enfrió en hielo y se añadieron 500 µl de medio SOC (20 g de bacto-triptona, Gibco, BRL; 5 g de bacto-levadura, Gibco, BRL y 0.5 g NaCl, BDH en 950 ml de H<sub>2</sub>O agua destilada y 10 ml of KCl 250 mM, BDH hasta un volumen de 1 L, añadiendo 5 ml de una solución estéril de MgCl<sub>2</sub> 2 M). La reacción se mantuvo en agitación (200 rpm) a 37°C durante una hora. Para seleccionar los transformantes se sembraron 100 µl de la reacción en placas de agar Luria-Bertani (8 g de caldo LB (Oxoid) y 6 g de agar bacteriológico en 400 ml H<sub>2</sub>O destilada) con 50 µg/ml de carbenicilina (agar LB Carb 50) que se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se obtuvo ADN plasmídico de los transformantes positivos analizados mediante PCR. El producto de digestión con *EcoRI* (NEB) (Tabla 33), se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para comprobar que gen *oatC* se había incluido dentro del vector que presentó un tamaño de 6,1 Kb.

Para eliminar del plásmido pCR 2.1 TOPO el gen que codifica la resistencia a kanamicina, se llevó a cabo la reacción de digestión con *SphI* (NEB) (Tabla 33). El producto de digestión purificado se sometió a una reacción de autoligación (Tabla 31) a T<sup>a</sup> ambiente durante 1 hora y media. Un volumen de 7  $\mu$ l de ADN plasmídico procedente de la reacción se transformó en células químicamente competentes *E. coli* TOPO 10. Se sembraron 150  $\mu$ l en agar LB Carb 50 y en agar LB con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina (LB Kan 50) para seleccionar los transformantes sensibles a kanamicina y resistentes a carbenicilina (Carb R /Kan S). Las colonias seleccionadas se inocularon en 5 ml de medio líquido LB (8 g de caldo LB en 400 ml de H<sub>2</sub>O) con 50  $\mu$ g/ml de carbenicilina incubándose en agitación continua (200 rpm) a 37°C durante toda la noche, para obtener ADN plasmídico al día siguiente. El producto de digestión con *SphI* se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para comprobar si el gen de resistencia a kanamicina había sido eficazmente eliminado.

El plásmido resultante (4,6 Kb) se sometió a mutagénesis *in vitro* con el transposón EZ-Tn5 (EPICENTRE), que contiene un gen de resistencia a kanamicina, durante 2 horas a 37°C y 10 minutos a 70°C (Tabla 32). Un volumen de 5  $\mu$ l del producto resultante se transformó en células químicamente competentes *E. coli* TOPO 10. Los transformantes resistentes a kanamicina se inocularon en 5 ml de medio líquido LB Kan 50 incubándose a 37°C en agitación (200 rpm) durante toda la noche, para obtener ADN plasmídico. El producto de digestión con *SphI* se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para comprobar que la inserción del Tn5 había sido eficaz. Los sitios de inserción del transposón se localizaron mediante secuenciación utilizando los cebadores suministrados en el sistema comercial pCR 2.1 TOPO (Invitrogen).

El plásmido PMJ1 (5,8 Kb) que contenía el Tn5 en el nucleótido 1.084 del *open reading frame* (ORF) del gen *oatC* se utilizó para la transformación en *N. meningitidis*.

**Tabla 30. Reactivos empleados en la reacción de clonación del gen *oatC* en el vector pCR 2.1 TOPO**

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)
Producto de PCR purificado	2
Solución salina	1
Vector pCR 2.1TOPO	1
Agua desionizada estéril	Hasta 6 $\mu$ l

**Tabla 31. Reactivos empleados en la reacción de autoligación del vector pCR 2.1 TOPO**

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)
AND plasmídico purificado	5
T4 DNA ligasa (NEB)	1
Tampón 5 $\times$ T4 DNA ligasa	5
Agua desionizada estéril	Hasta 25 $\mu$ l

**Tabla 32. Reactivos empleados en la reacción de mutagénesis con el transposón EZ-Tn5**

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)
Tampón 10 $\times$ EZ:TN	1
ADN plasmídico	1,5 (0,2 $\mu$ g)
KAN-2 Transposon	1
Enzima Transposasa	1
Agua desionizada estéril	Hasta 10 $\mu$ l

### 7.8.1.2 Transformación en *N. meningitidis*

Para la obtención de las cepas de meningococo mutantes en *oatC*, la cepa salvaje se transformó con el producto de la digestión del plásmido PMJ1 con *KpnI* y *EcoRV* (NEB) (Tabla 33).

En una placa de agar BHI se inocularon 10  $\mu$ l de una suspensión de bacteria en PBS, tras 10 minutos se añadieron 10  $\mu$ l de ADN plasmídico purificado y la mezcla se incubó a 37°C durante 3 horas. El producto de la transformación se subcultivó en agar BHI con 75  $\mu$ g/ml de kanamicina (BHI Kan 75) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Como control de la transformación se cultivó, en las mismas condiciones, bacteria a la que no se le había añadido ADN plasmídico. Se obtuvo ADN cromosómico de los transformantes seleccionados para ser utilizado en una segunda transformación en la cepa salvaje, con el objetivo de evitar los procesos de variación de fase frecuentes en *N. meningitidis*. Las cepas mutantes en *oatC* resultantes se conservaron en caldo BHI con glicerol al 20% a -80°C.

### 7.8.2 Obtención de los mutantes en *Ist*

Para generar las cepas mutantes en el gen *Ist*, se utilizó el vector pST-Blue (Novagen) en el cual se había clonado un fragmento del gen NMB0922, que codifica la enzima  $\alpha$ -2,3 LPS sialil transferasa, junto con un fragmento de resistencia a tetraciclina (*teM* cassette) (Exley et al., 2005).

El producto de digestión con *PvuII* (NEB) (Tabla 33) se utilizó para transformar las cepas salvajes, según se describe en el apartado anterior, y los mutantes en *Ist* se seleccionaron en agar BHI con 2,5  $\mu$ g/ml de tetraciclina.

### 7.8.3 Obtención de los mutantes en *siaD*

Los mutantes que no expresaban cápsula se obtuvieron transformando las cepas de *N. meningitidis* con el vector pIP10 (Virji et al., 1995), el cual contiene una delección interna del gen *siaD* (que codifica la enzima  $\alpha$ -2,8 polisialil transferasa) que ha sido sustituida por un fragmento de resistencia a eritromicina

(*erythromycin-resistance cassette*). Los mutantes en *siaD* se seleccionaron en agar BHI con 2 µg/ml de eritromicina.

**Tabla 33. Reactivos y condiciones empleadas en las reacciones de digestión con las enzimas *EcoRI*, *SphI*, *KpnI*, *EcoRV* y *PvuI***

Proceso	Enzima	Reactivos	Condiciones
<b>Clonación gen <i>oatC</i></b>	<i>EcoRI</i>	ADN plásmido (2µl)	2 horas
		Enzima <i>EcoRI</i> (1µl)	37°C
		<i>EcoRI</i> tampón 10× (1µl)	
		H <sub>2</sub> O (hasta 20 µl)	
<b>Eliminación gen kanamicina</b>	<i>SphI</i>	ADN plásmido (10 µl)	3 horas
		Enzima <i>SphI</i> (3 µl)	37°C
		<i>SphI</i> tampón 10× (10 µl)	
		H <sub>2</sub> O (hasta 100 µl)	
<b>Digestión plásmido PMJ1</b>	<i>KpnI</i> y <i>EcoRV</i>	ADN plásmido (20 µl)	2 horas
		Enzimas <i>EcoRV</i> (3 µl) y <i>KpnI</i> (3 µl)	37°C
		Tampón 2 5× (20 µl)	
		H <sub>2</sub> O (hasta 200 µl)	
<b>Digestión vector pST-Blue</b>	<i>PvuI</i>	ADN plásmido (20 µl)	4 horas
		Enzima <i>PvuI</i> (3 µl)	37°C
		<i>PvuI</i> tampón 10× (20 µl)	
		H <sub>2</sub> O (hasta 200 µl)	

## 7.9 Transferencia del fenotipo resistente

La cepa sensible S3 se transformó con ADN cromosómico de la cepa resistente R3 mutante en *oatC* (R3::*oatC*), que albergaba un gen de resistencia a kanamicina lo que permitía seleccionar a los transformantes, según el protocolo descrito en el apartado 7.8.1.2.

Para poder seleccionar a los transformantes resistentes al suero se realizaron ensayos de SBA realizando algunas modificaciones sobre el protocolo descrito en el apartado 3. Se resuspendió toda la bacteria aislada en agar BHI Kan 75, en 5ml de medio BHI líquido, se tomaron 250  $\mu$ l que se subcultivaron en agar BHI durante 4 horas. El inóculo bacteriano ( $2 \times 10^4$  UFC/ml) se mezcló en partes iguales con el complemento diluido 1:2, para obtener la suspensión de trabajo. Las diluciones de los sueros (que se mezclaron con la suspensión de trabajo) se prepararon en una placa de 96 pocillos, cada uno de ellos con capacidad para 1 ml. Se trabajó con volúmenes 10 veces mayores que los utilizados en el protocolo estándar de SBA: 250  $\mu$ l de cada dilución de suero se mezclaron con 250  $\mu$ l de suspensión de trabajo. Se realizaron 4 réplicas por cada cepa. Tras incubación en las mismas condiciones descritas, se sembró la totalidad de la bacteria (2 ml) incubada con el suero en presencia de complemento, en agar BHI.

Se seleccionaron todas las colonias aisladas a partir de incubaciones con diluciones del suero de 1:256 y 1:128 para ser estudiadas de nuevo en ensayos de SBA y así poder seleccionar a los transformantes resistentes con títulos de SBA < 8.

## 7.10 Transferencia de la región intergénica

La secuencia de inserción IS1301 en la RIG *siaA-ctrA*, se modificó con un marcador de resistencia a kanamicina antes de realizar la transferencia.

Se amplificó un fragmento de 1,6 Kb, que incluía la RIG con la secuencia IS1301 y una secuencia parcial de los genes *siaA* y *ctrA*, a partir de ADN cromosómico de la cepa R3. Se emplearon los cebadores NG679 y NG687 (Tabla 18) y las condiciones descritas (Tablas 19 y 20). Siguiendo el protocolo

utilizado para la construcción del vector PMJ1 (apartado 7.8.1.1), el producto de PCR de 1,6 Kb se ligó dentro del vector pCR 2.1 TOPO y tras eliminar el gen de resistencia a kanamicina, el plásmido derivado se sometió a mutagénesis *in vitro* con el transposón EZ-Tn5. Se obtuvo un plásmido de 5,2 Kb, que contenía el Tn en la IS1301, cuyo ADN se utilizó para la transformación de la cepa R3.

### **7.10.1 Transformación en el aislado R3**

El ADN plasmídico se sometió a una doble digestión con los enzimas *KpnI* y *EcoRV* siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 33. Para la transformación se utilizaron 10  $\mu$ l del producto purificado de la digestión enzimática. Se obtuvo ADN cromosómico de los transformantes seleccionados en agar BHI Kan 75, y mediante PCR; se comprobó la presencia de la IS1301 en la RIG *siaA-ctrA*.

### **7.10.2 Transformación en el aislado S3**

La transformación en el la cepa S3 se llevó a cabo utilizando el fragmento amplificado por los cebadores NG679 y NG687 a partir de uno transformantes obtenidos de la cepa R3. Del mismo modo que con el aislado R3, los cebadores NG732 y NG733 se utilizaron para comprobar la presencia de la IS1301 en el único transformante obtenido.

## **8 Purificación del polisacárido capsular para el análisis mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)**

El análisis de la estructura de la cápsula se realizó mediante espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN en colaboración con la Dra Barbara Mulloy del NIBSC (Hertfordshire, UK).

Para la extracción del polisacárido capsular se siguió el protocolo descrito por Gotschlich y colaboradores (Gotschlich et al., 1969). La bacteria aislada a partir de un cultivo en agar BHI, se subcultivó en 200 ml de medio BHI líquido a 37°C, en agitación (150 rpm), durante toda la noche. Se añadió detergente catiónico Cetavlon (Sigma-Aldrich) a una concentración final del 1% para producir la lisis de la bacteria y precipitar el polisacárido. La mezcla se centrifugó a  $11.000 \times g$  durante 15 minutos y el precipitado se resuspendió en 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se añadieron 10 ml de  $\text{CaCl}_2$  y la mezcla se mantuvo en agitación durante 2 horas, para disociar el polisacárido del detergente. Los ácidos nucleicos de la solución se eliminaron por precipitación con etanol. Para ello, se añadieron 5 ml de etanol absoluto a una concentración final del 25 % y se incubó a  $T^a$  ambiente durante 2 horas. Se centrifugó a  $25.000 \times g$  durante 20 minutos conservando el sobrenadante al que se añadió etanol absoluto a una concentración final del 80%. Se centrifugó a  $2.000 \times g$  durante 10 minutos y el precipitado, que contenía al polisacárido capsular, se lavó tres veces con alcohol absoluto (para eliminar el  $\text{CaCl}_2$  y el Cetavlon) con centrifugaciones a  $13.000 \times g$  entre cada lavado. Se eliminó todo el etanol, dejando secar el precipitado durante 30 minutos. Para purificar el polisacárido capsular obtenido, se comenzó resuspendiendo el precipitado en 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y añadiendo una solución con proteinasa K 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  disuelta en tampón que contenía Tris 10 mM y  $\text{MgSO}_4$ . Se incubó a 37°C durante 4 horas en agitación. A continuación la solución se dializó inicialmente contra  $\text{H}_2\text{O}$  destilada durante 24 horas, posteriormente contra el tampón C-tab. (10 g de NaCl, 1,8 g Tris base y 400 ml de etanol en 4 L de  $\text{H}_2\text{O}$ )

durante 2 días cambiando la solución cada 24 horas y finalmente contra H<sub>2</sub>O purificada (sistema Millipore) durante 2 días más.

Los espectros de RMN (500MHz a 60°C en D<sub>2</sub>O) se registraron en un espectrofotómetro (INOVA 500; Varían) usando pulsos de secuencias proporcionadas por el fabricante (Lemercinier and Jones, 1996; Jones and Lemercinier, 2002).

## 9 Microscopía electrónica

Para visualizar el contenido en cápsula en la superficie de las cepas se utilizó la técnica de crio-microscopía electrónica de transmisión (crio-TEM) en colaboración con el Dr Roland Fleck del NIBSC (Hertfordshire, UK).

A partir de un cultivo bacteriano en agar BHI durante toda la noche, se preparó una suspensión en PBS precalentado a 37°C. La bacteria se marcó con ferritina catiónica (F7879; Sigma-Aldrich), compuesto denso a los electrones, que se une a las cargas negativas de la cápsula bacteriana (Anderson, 1998). Para ello, una alícuota de la suspensión bacteriana se mezcló con ferritina catiónica precalentada a una concentración final de 0,5 mg/ml. Como soporte se utilizaron unas rejillas hidrofílicas (Quantifoil<sup>®</sup>, S143-8; Agar Scientific Ltd) que se incubaron con la muestra a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. Tras la incubación con ferritina, la bacteria se fijó mediante congelación rápida con el fin de observar la cápsula bacteriana mediante TEM sin la necesidad de realizar ningún corte. Para ello, se retiró el exceso de fluido y las muestras se trataron con etano líquido (CPC; Leica) antes de ser transferidas a un contenedor de nitrógeno líquido (modelo 626; Gatan).

Para tomar las imágenes, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión asociado a un dispositivo que contenía una cámara con una resolución de 4.048 × 4.048 pixels. La dosis acumulada de electrones se mantuvo por debajo de 55 electrones/Å<sup>2</sup>.



## **RESULTADOS**



# **1 Identificación de aislados clínicos de *N. meningitidis* serogrupo C resistentes a la actividad bactericida del suero**

## **1.1 Identificación de aislados resistentes mediante ensayos de anticuerpos bactericidas del suero**

Mediante ensayos de SBA, se analizaron 109 aislados clínicos de meningococo pertenecientes al serogrupo C causantes de enfermedad invasiva, que se enfrentaron a la acción de tres sueros procedentes de individuos inmunizados con vacuna conjugada frente a serogrupo C.

La Tabla 34 muestra los títulos de SBA obtenidos para los tres sueros al ser incubados con la cepa control C11 y con los 109 aislados en estudio en presencia de complemento. Los sueros 1RO, 3C y 4MJ presentaron títulos de SBA de 512, 256 y 1024, respectivamente, frente a la cepa control C11. Al comparar estos títulos con los obtenidos para cada uno de los 109 aislados clínicos, se identificaron tres cepas con elevada resistencia a la actividad de SBA, designadas como R1, R2 y R3. Los títulos de SBA de los tres sueros frente a los aislados R1, R2 y R3 diferían en 4 ó más diluciones respecto a los obtenidos para la cepa control, mostrando así estas cepas, una clara resistencia al suero en la lisis de la bacteria mediada por el sistema de complemento. Además, se identificaron 6 cepas (en negrita) que generaban en los tres sueros inmunes una diferencia en 3 ó en 4 diluciones en el título de SBA respecto al obtenido con la cepa control.

Las tres cepas, R1, R2 y R3, fueron enfrentadas a la acción de 7 nuevos sueros procedentes de individuos inmunizados con la misma vacuna conjugada.

En la Tabla 35 aparecen los títulos de SBA de los 10 sueros estudiados frente a los aislados R1, R2 y R3. De nuevo, el título de cada suero se comparó con el obtenido para la cepa control, C11. Las cepas R1 y R2 mostraron un fenotipo de resistencia similar. Aquellos sueros, con títulos de SBA de  $\geq 1024$

frente a la cepa control, presentaron una disminución en el título de al menos 3 diluciones al enfrentarse a las cepas R1 y R2, mientras que frente a sueros con títulos de SBA de  $\leq 512$  el título pasó a ser de  $< 8$ , dejando de ser protector. El aislado R3 presentó una elevada resistencia. Todos los sueros probados presentaron un título de SBA de  $< 8$  frente a la cepa R3, independientemente del título de éstos con la cepa control. De esta manera, los sueros 9S y 10H con títulos de SBA de 4096 y de 16384, respectivamente, perdieron su elevada capacidad protectora al enfrentarse a la cepa R3.

**Tabla 34. Títulos de SBA de 3 sueros inmunes frente a la cepa control C11 y frente a los 109 aislados clínicos de *N. meningitidis* serogrupo C**

AISLADO	SUERO		
	1RO	3C	4MJ
<b>C11<sup>a</sup></b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>1024</b>
<b>13213(S1)<sup>b</sup></b>	<b>512</b>	<b>128</b>	<b>1024</b>
13315	256	256	1024
13331	256	256	1024
13596	512	256	1024
13790	512	256	1024
14123	512	256	1024
14131	1024	256	1024
14141	512	256	1024
14349	256	256	2048
14391	512	256	1024
14402	512	128	512
14407	512	256	1024
14426	128	64	256
14434	64	32	1024
14439	512	256	1024
14530	256	512	1024
<b>14565<sup>c</sup></b>	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>
<b>14624(S2)<sup>b</sup></b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>1024</b>
14622	512	256	512
14627	4096	4096	4096

Tabla 34 (cont.). Títulos de SBA de 3 sueros inmunes frente a la cepa control C11 y frente a los 109 aislados clínicos de *N. meningitidis* serogrupo C

AISLADO	SUERO		
	1RO	3C	4MJ
<b>C11<sup>a</sup></b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>1024</b>
14633	128	32	512
14634	128	32	1024
14635	512	256	1024
14639	256	128	1024
14641	256	128	512
14648	128	128	512
<b>14654(R1)<sup>d</sup></b>	<b>&lt;8</b>	<b>&lt;8</b>	<b>64</b>
14675	512	256	1024
14678	256	256	512
14688	512	128	512
<b>14709(S3)<sup>b</sup></b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>1024</b>
14710	128	128	256
<b>14715(S4)<sup>b</sup></b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>1024</b>
14718	256	256	1024
14723	128	128	512
14731	128	256	512
14738	512	256	1024
14743	256	128	512
14744	512	256	512
14752	64	64	1024

Tabla 34 (cont.). Títulos de SBA de 3 sueros inmunes frente a la cepa control C11 y frente a los 109 aislados clínicos de *N. meningitidis* serogrupo C

AISLADO	SUERO		
	1RO	3C	4MJ
<b>C11<sup>a</sup></b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>1024</b>
14777	512	256	512
14783	512	256	1024
14784	512	512	1024
14789	512	256	1024
14801	1024	512	2048
14804	256	256	1024
<b>14810<sup>c</sup></b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>64</b>
14816	512	256	1024
<b>14828<sup>c</sup></b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>64</b>
14834	256	128	512
<b>14840(S5)<sup>b</sup></b>	<b>1024</b>	<b>256</b>	<b>1024</b>
14845	512	256	1024
14851	256	128	512
<b>14852<sup>c</sup></b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>64</b>
14853	256	128	512
<b>14868<sup>c</sup></b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>64</b>
14870	256	128	512
<b>14876<sup>c</sup></b>	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>128</b>
14878	256	128	512
14879	256	128	512

**Tabla 34 (cont.). Títulos de SBA de 3 sueros inmunes frente a la cepa control C11 y frente a los 109 aislados clínicos de *N. meningitidis* serogrupo C**

AISLADO	SUERO		
	1RO	3C	4MJ
<b>C11<sup>a</sup></b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>1024</b>
14883	512	256	1024
14885	256	128	512
14912	1024	512	2048
14930	512	256	1024
14956	512	128	512
14990	128	256	1024
15000	512	256	512
15015	512	128	512
15016	512	512	1024
15031	256	128	512
15055	512	128	1024
15062	256	128	512
15141	512	128	1024
15264	128	128	512
15329	256	128	1024
15331	512	256	1024
15339	512	256	1024
15341	1024	512	2048
15349	128	64	512
15402	512	128	1024

**Tabla 34 (cont.). Títulos de SBA de 3 sueros inmunes frente a la cepa control C11 y frente a los 109 aislados clínicos de *N. meningitidis* serogrupo C**

AISLADO	SUERO		
	1RO	3C	4MJ
<b>C11<sup>a</sup></b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>1024</b>
15586	256	128	512
15767	512	512	1024
15562	512	512	2048
15585	512	256	1024
15598	128	64	256
15654	512	256	1024
15674	512	256	1024
15682	1024	512	2048
15715	512	256	1024
15721	1024	256	1024
15726	256	256	1024
15738	512	256	1024
15764	512	256	1024
15779	64	32	256
15846	512	256	1024
15859	256	256	512
15876	128	128	512
15877	1024	512	1024
15926	512	128	1024
15963	512	128	1024

**Tabla 34 (cont.). Títulos de SBA de 3 sueros inmunes frente a la cepa control C11 y frente a los 109 aislados clínicos de *N. meningitidis* serogrupo C**

AISLADO	SUERO		
	1RO	3C	4MJ
<b>C11<sup>a</sup></b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>1024</b>
<b>15967(R3)<sup>d</sup></b>	<b>&lt;8</b>	<b>&lt;8</b>	<b>&lt;8</b>
15968	512	256	1024
<b>16015(R2)<sup>d</sup></b>	<b>&lt;8</b>	<b>&lt;8</b>	<b>64</b>
16034	512	512	2048
16038	512	256	1024
16060	1024	512	2048
16119	256	128	1024
16121	128	256	1024
16143	512	128	1024

<sup>a</sup> Cepa de *N. meningitidis* utilizada como control estándar para ensayos de SBA.

<sup>b</sup> Cepas sensibles frente a los SBA utilizadas como controles para posteriores experimentos: S1, S2, S3, S4 y S5.

<sup>c</sup> Cepas identificadas con resistencia intermedia frente a los SBA.

<sup>d</sup> Cepas identificadas con elevada resistencia a los SBA: R1, R2 y R3.

**Tabla 35. Títulos de SBA de 10 sueros inmunes frente a la cepa control C11 y frente a los aislados resistentes, R1, R2 y R3**

SUERO	AISLADO			
	C11	R1	R2	R3
1RO	512	<8	<8	<8
2R	512	<8	<8	<8
3C	256	<8	<8	<8
4MJ	1024	64	64	<8
5RC	4096	512	512	<8
6J	64	<8	<8	<8
7E	1024	<8	128	<8
8B	64	<8	<8	<8
9S	4096	<8	256	<8
10H	16384	1024	2048	<8

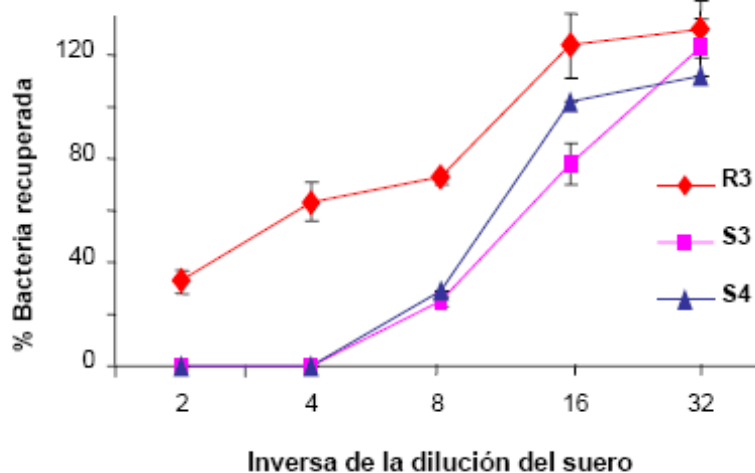
## **1.2 Ensayo de actividad del suero utilizando fuente de complemento humano**

El ensayo con complemento humano se realizó con el objetivo de confirmar la resistencia de la cepa R3 utilizando fuente de complemento humano. Para ello, el aislado resistente R3 y dos de las cepas sensibles, S3 y S4, se incubaron con diluciones dobles de suero inmune, sin inactivar en este caso la fuente de complemento endógena.

La Figura 9 muestra el porcentaje de bacteria recuperada tras una hora de incubación con suero inmune. La supervivencia del aislado resistente (R3) fue significativamente mayor comparada con la de las cepas sensibles ( $P < 0,001$ ) en las diluciones 1:2, 1:4 y 1:8 y en la dilución 1:16. Mientras que no hubo supervivencia de los aislados sensibles a altas concentraciones del suero (1:2 y 1:4) se recuperó hasta un 20% y más de un 60% de la cepa resistente en ambas diluciones, respectivamente. Esta diferencia en supervivencia entre el aislado resistente y las cepas sensibles se mantuvo incluso en diluciones más elevadas del suero.

Estos resultados demostraron que el fenotipo de resistencia al suero que presentaba el aislado resistente era independiente de la fuente de complemento utilizada.

**Figura 9. Supervivencia de las cepas R3, S3 y S4 tras la incubación con fuente endógena de complemento humano**



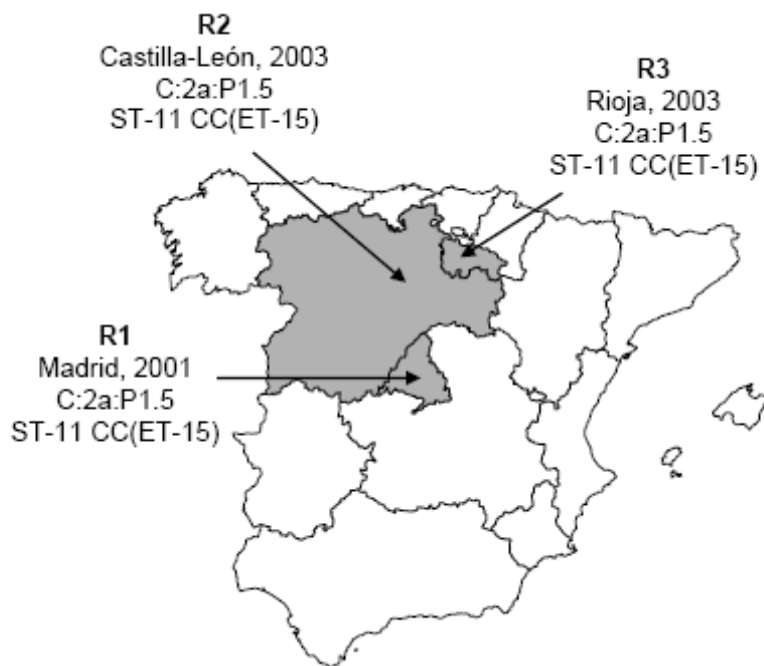
### 1.3 Descripción fenotípica y características clínicas de los aislados resistentes

La Figura 10 muestra el origen geográfico y el fenotipo de las cepas del estudio y en la Tabla 36 se detalla información relativa a los pacientes en los que se aislaron las cepas resistentes.

La cepa R1 fue aislada en Madrid en el año 2001 en una mujer de 37 años con sepsis meningocócica. La cepa R2 se aisló en el año 2003 en Valladolid, procedente de una paciente de 40 años de edad, que presentó sepsis y meningitis. La cepa designada como R3 se aisló en Logroño en el año 2003 en una mujer de 19 años con sepsis y meningitis. Los tres pacientes recibieron tratamiento adecuado, bien con cefotaxima o con ceftriaxona, y aunque uno de ellos falleció, los otros dos evolucionaron favorablemente.

Los tres aislados mostraron ser fenotípicamente idénticos, siendo todas las cepas C:2a:P1.5. El análisis mediante MLST y la secuencia del gen *fumC* permitió agrupar a las tres cepas resistentes dentro del complejo clonal ST-11 CC (ET-15).

**Figura 10. Distribución geográfica, fenotipo y complejo clonal de los 3 aislados resistentes**



**Tabla 36. Características clínicas de los 3 aislados resistentes**

CEPA	PACIENTE	EDAD	CUADRO CLÍNICO	TRATAMIENTO	EVOLUCIÓN
R1	Mujer	37 años	Sepsis	Ceftriaxona	Exitus
R2	Mujer	40 años	Sepsis y Meningitis	Cefotaxima	Favorable
R3	Mujer	19 años	Sepsis y Meningitis	Ceftriaxona	Favorable

Con la identificación de los aislados R1, R2 y R3, el objetivo del estudio se centró en caracterizar las bases moleculares de la resistencia al suero de estas cepas. De entre los 109 aislados clínicos, se seleccionaron cinco cepas con títulos que no diferían de los obtenidos para la cepa control C11. Estas cinco cepas sensibles designadas como S1-S5 (Tabla 34) se utilizaron como controles en posteriores experimentos. Todas ellas presentaban el mismo fenotipo (C:2a:P1.5) y pertenecían al mismo complejo clonal (ST-11 CC) que las cepas resistentes.

## 2 Análisis del grado de sialización del LPS y su implicación en la resistencia de las cepas a la acción de sueros inmunes

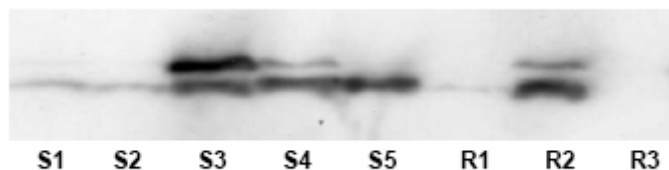
### 2.1 Grado de sialización del LPS

Para intentar describir las bases de la resistencia al suero de las cepas seleccionadas del estudio, se examinó el grado de sialización de los tres aislados resistentes (R1, R2 y R3) así como de las cinco cepas sensibles (S1-S5) elegidas como controles.

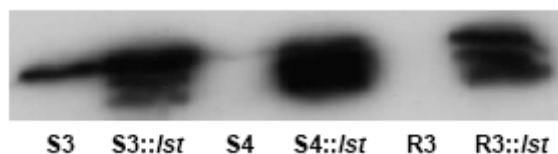
La Figura 11 muestra los resultados obtenidos. No se obtuvieron claras diferencias entre el nivel de sialización de los aislados resistentes y de las cepas sensibles (Figura 11A), lo que parecía descartar la relación entre el grado de sialización del LPS con la resistencia al suero. De hecho, no se observó unión del anticuerpo 3F11 en el aislado R3 lo que indicaba que el mismo estaba altamente sializado o bien que la cepa expresaba otro epítipo diferente que no era reconocido por el anticuerpo.

Con el fin de conocer la posible implicación de la sialización del LPS en la resistencia al suero se construyeron mutantes en el gen *lst*, que codifica la enzima implicada en la unión del ácido siálico. En la Figura 11B, se observa una elevada unión del anticuerpo en los mutantes en *lst* de las cepas sensibles, así como en el mutante R3::*lst*, lo que demostró que la cepa R3 estaba altamente sializada.

**Figura 11. Análisis del grado de sialización del LPS**



**Figura 11A. Grado de sialización de los aislados sensibles (S1-S5) y resistentes (R1, R2 y R3)**



**Figura 11B. Grado de sialización del LPS en las cepas S3, S4, R3 y en los mutantes S3::*/st*, S4::*/st*, R3::*/st***

## **2.2 Inactivación del gen */st*. Ensayo de SBA con los mutantes en */st***

Los resultados obtenidos mediante Western blot parecían excluir la relación entre el nivel de sialización del LPS con el grado de resistencia de las cepas. Para confirmarlo, se realizaron ensayos de SBA para comparar la sensibilidad de las cepas con sus respectivos mutantes en el gen */st*.

La Tabla 37 muestra los títulos de SBA de 8 sueros inmunes frente a las cepas R3, S3 y a los correspondientes mutantes en */st*. Mientras que el mutante S3::*/st* se mostró ligeramente más sensible a la acción bactericida del suero, no se produjo ningún cambio en la supervivencia del mutante R3::*/st* respecto a la

cepa R3, manteniendo su alto grado de resistencia al suero en todos los sueros evaluados.

Estos resultados demostraron que la resistencia al suero de las cepas era un fenómeno independiente a la sialización del LPS.

**Tabla 37. Títulos de SBA de 8 sueros inmunes frente a los aislados S3 y R3 y frente a los mutantes S3::*lst* y R3::*lst***

SUERO	AISLADO			
	S3	S3:: <i>lst</i>	R3	R3:: <i>lst</i>
1RO	512	1024	<8	<8
2R	1024	2048	<8	<8
3C	256	1024	<8	<8
5RC	2048	512	<8	<8
6J	128	1024	<8	<8
7E	2048	4096	<8	<8
9S	4096	4096	<8	<8
10H	16384	4096	<8	<8

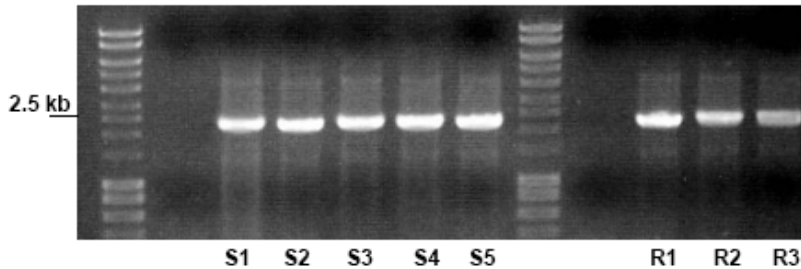
### **3 Análisis de la acetilación del polisacárido capsular**

#### **3.1 Determinación de la acetilación capsular**

Para saber si diferencias en el grado de acetilación del polisacárido capsular podían relacionarse con la resistencia al suero de las cepas, se determinó la acetilación capsular en los tres aislados resistentes, R1, R2 y R3, así como en las cinco cepas sensibles controles (S1-S5). Se amplificó un fragmento que incluía el gen *oatC* (codifica la acetiltransferasa responsable de la O-acetilación en el serogrupo C) y se secuenció la región del mismo donde se localizan los dos tractos homopoliméricos que controlan la acetilación a través de variaciones de fase.

En todas las cepas se obtuvo el mismo producto de amplificación, de aproximadamente 2,2Kb, que contenía el gen *oatC* (Figura 12A). Los resultados de las secuencias demostraron que la longitud de ambos tractos homopoliméricos (*poli*T y *poli*A) era exactamente la misma para todas las cepas (Figura 12B), lo que predecía que el gen responsable de la acetilación capsular parecía expresarse tanto en las cepas sensibles como en las resistentes y por tanto el grado de acetilación de la cápsula no parecía ser la causa de la diferencia en sensibilidad al suero de las cepas estudiadas.

**Figura 12. Determinación del estado de acetilación del polisacárido capsular**



**Figura 12A. Amplificación del gen *oatC* en los aislados sensibles (S1-S5) y resistentes (R1-R3)**

```

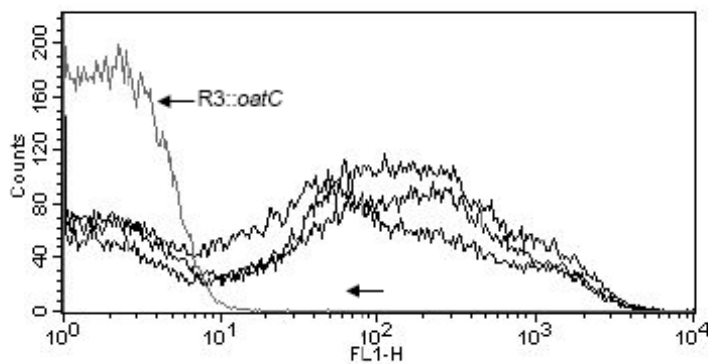
NG541
  |
  |oatC
  |→
  |ATGTC AATCAATACGTTTGAAACCTTTATTTACGAATTATACCAATCAACTAATTTTCGCAG
  |AAATTGCTCGCATTACGGATTTAGTAACCATAAAGCGCTAAACTTGGAAACCATCCGAAT
  |GAATTGCTCGCATTACGGATTTAGTAACCATAAAGCGCTAAACTTGGAAACCATCCGAAT
  |GATGGCAATTAGCTGCTTTAAACCAAAAACACCACAAAATGCATCGAGCTAAGTGAATA
  |TTTCAATGAAAAATCAGATATTAAGA TTTTTTATTTTTGAAATTTGGCTGAATGCTATTT
  |TCTGCAAAATGACCTTGTTAAATCTTTAGAGAACTATGAGAAAGCATTATTATTAATCCA
  |AAACTAATCTCAGCAAGATTTAAACATATGTGTCTCAAATATAGGCTTTTAAATGAAGTAG
  |ATAGTACTACTTTCTCAAATATGAAATTGAATCTCAACAAAAGAAAAAGATTTCAAACCTA
  |CGCATTATTGCCTATATCCAATTAAG AAAAAA GTATTTTAAGGCATATAATAACCTGA
  |AATTACTCATAGAGCTAAACAAATCTCCTTTCTATCCGATTATTTATCAATAATACACGCT
  |ATTGAAAATTTAGAGTATTCTAAACAATCCCAAATACTAAAAAAGAACTAACAGAATATAT
  |CAAATTTCCAAAGCAATTGCACTAAAATCAGAATTCGTATGCAACGG
  |
  |←
  |NG560
  
```

**Figura 12B. Secuencia parcial del gen *oatC*.** En rojo se indica el tracto poliT (nucleótido 210) y el tracto poliA (nucleótido 458).

Para confirmar estos resultados se analizó el grado de acetilación de las cepas mediante FACS, utilizando el Acm 1125 que reconoce específicamente grupos O-acetilo del polisacárido capsular en el serogrupo C.

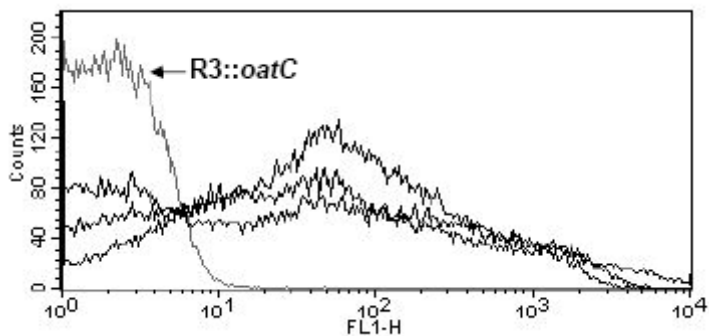
La Figura 13 refleja los resultados obtenidos tras la incubación del anticuerpo con tres cepas sensibles (Figura 13A) y con los aislados resistentes, R1, R2 y R3 (Figura 13B). Como control se empleó el mutante de la cepa resistente R3 en el gen *oatC* (R3::*oatC*). No se observaron diferencias significativas entre las cepas en cuanto al grado de unión del anticuerpo a la superficie bacteriana, lo que indicaba que el nivel de acetilación de la cápsula era similar en las cepas sensibles y en las resistentes.

**Figura 13. Análisis del grado de acetilación del polisacárido capsular mediante FACS**



**Figura 13A. Grado de acetilación capsular de tres cepas sensibles (S3, S4 y S5)**

**Figura 13. Análisis del grado de acetilación del polisacárido capsular mediante FACS**



**Figura 13B. Grado de acetilación capsular de las cepas resistentes R1, R2 y R3**

Los resultados obtenidos mediante secuenciación del gen *oatC* y el análisis por FACS parecían indicar que dicho gen se expresaba tanto en las cepas sensibles como en las resistentes y que el polisacárido capsular presentaba un grado de acetilación similar en todas las cepas analizadas. Esto parecía demostrar que el nivel de resistencia de las cepas no dependía de cambios en la acetilación del polisacárido capsular.

### **3.2 Inactivación del gen *oatC*. Ensayos de SBA con los mutantes en *oatC***

Si el gen *oatC* tuviera algún tipo de implicación en el fenómeno de resistencia, la inactivación del mismo en la cepa resistente produciría algún tipo de variación en los títulos de SBA.

Se construyeron mutantes en el gen *oatC* en la cepa R3 y en una de las cepas sensibles, S3. Mediante ensayos de SBA se incubaron las cepas R3, S3 y los correspondientes mutantes en *oatC* con sueros inmunes. El mutante R3::*oatC* mantuvo su nivel de resistencia en todos los sueros analizados mientras que el mutante S3::*oatC* conservó su sensibilidad a los sueros inmunes.

Los resultados que se presentan en la Tabla 38, junto con los obtenidos por PCR y FACS, excluyeron a la acetilación del polisacárido capsular como la causa de la diferencia en sensibilidad al suero entre las cepas sensibles y resistentes.

**Tabla 38. Títulos de SBA de 5 sueros inmunes frente a los aislados S3 y R3 y frente a los mutantes S3::*oatC* y R3::*oatC***

SUERO	AISLADO			
	S3	S3:: <i>oatC</i>	R3	R3:: <i>oatC</i>
1RO	1024	2048	<8	<8
2R	1024	1024	<8	<8
3C	256	256	<8	<8
4MJ	2048	2048	<8	<8
9S	4096	4096	<8	<8

## **4 Implicación de la cápsula en la resistencia al suero mediada por el sistema del complemento**

### **4.1 Inactivación del gen *siaD*. Ensayos de SBA con los mutantes en *siaD***

Para investigar el papel de la cápsula en relación con la resistencia al suero de las cepas identificadas como resistentes, se inactivó el gen *siaD*, que codifica la polisialiltransferasa necesaria para la polimerización del polisacárido capsular. El gen se inactivó en el aislado resistente R3 y en la cepa sensible S3 con el fin de evaluar mediante ensayos SBA la sensibilidad al suero de las cepas.

La Tabla 39 muestra los títulos SBA para cada uno de los sueros inmunes estudiados frente a las cepas R3, S3 y para los correspondientes mutantes en *siaD*. Notoriamente, mientras que la sensibilidad del mutante S3 $\Delta$ *siaD* no se vio apenas afectada por la pérdida de la cápsula, la supervivencia de la cepa resistente R3 se modificó de forma muy marcada, pasando de un título de SBA de <8 en todos los sueros, a títulos de SBA por encima de 512 frente al mutante R3 $\Delta$ *siaD*, obteniendo de este modo un patrón de sensibilidad al suero similar al observado en las cepas sensibles.

Estos resultados demostraron que la expresión de la cápsula era necesaria para la resistencia del aislado R3, lo que sugería que las cepas resistentes podían albergar cambios en el operón capsular *cps*, que podrían estar implicados en su elevada supervivencia en presencia de sueros inmunes.

**Tabla 39. Títulos de SBA de 9 sueros inmunes frente a los aislados S3 y R3 y frente a los mutantes S3 $\Delta$ siaD y R3 $\Delta$ siaD**

SUERO	AISLADO			
	S3	S3 $\Delta$ siaD	R3	R3 $\Delta$ siaD
1RO	1024	1024	<8	512
2R	512	512	<8	1024
3C	128	256	<8	128
4MJ	2048	2048	<8	1024
6J	128	128	<8	64
7E	512	1024	<8	2048
8B	64	64	<8	512
9S	4096	8192	<8	2048
10H	16384	16384	<8	2048

## 4.2 Transferencia del fenotipo resistente

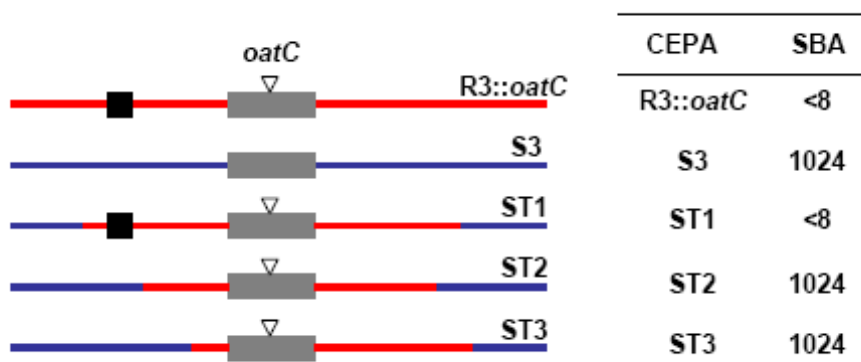
Los resultados de SBA obtenidos para la cepa mutante R3 $\Delta$ siaD permitían plantear la hipótesis de que la resistencia al suero en los aislados resistentes podía deberse a cambios en la expresión de la cápsula, a través de alguna modificación en el operón capsular. El aislado resistente R3 podría albergar una región en el operón *cps* que le conferiría el carácter resistente, y que no estaría presente en las cepas sensibles. Con el fin de estudiar esta posibilidad, se planteó transferir genéticamente la resistencia desde la cepa resistente R3 a una de las cepas sensibles (S3) y analizar la sensibilidad al suero de los transformantes.

### 4.2.1 Selección de los transformantes resistentes

Para transformar la cepa sensible S3 se utilizó ADN cromosómico procedente del aislado resistente R3::*oatC*, el cual albergaba en el *cps* un

marcador de resistencia a kanamicina. Los transformantes resistentes a kanamicina se analizaron mediante ensayos de SBA con sueros inmunes para seleccionar aquéllos resistentes al suero (apartado 7.9 Material y métodos). Dependiendo del punto o lugar de la recombinación, los transformantes seleccionados (ST2 y ST3) podían contener únicamente la mutación en el gen *oatC* que les confería sólo resistencia a kanamicina. Estos transformantes, permanecieron sensibles a la actividad bactericida del suero, manteniendo títulos de SBA iguales a la cepa S3. Sin embargo y según la hipótesis planteada, algunos de los transformantes (ST1) además de la mutación que les confería resistencia a kanamicina, recibieron ADN adicional responsable de la resistencia a la actividad bactericida del suero, convirtiéndose en resistentes y mostrando títulos de SBA de <8, igual que la cepa donante R3::*oatC* (Figura 14).

**Figura 14. Transferencia del fenotipo resistente a la cepa sensible S3**



**Figura 14.** Para transferir la resistencia entre los aislados R3 y S3, se utilizó ADN procedente del mutante R3::*oatC*, que se indica con una línea roja. La cepa sensible S3 se muestra con una línea azul. El gen *oatC*, con el marcador de resistencia a kanamicina, aparece indicado en ambas cepas y en los transformantes con un rectángulo gris. La región responsable de la resistencia localizada en el *cps* de la cepa R3 y en el transformante ST1, se muestra con un cuadrado negro. Aparecen detallados los títulos de SBA de la cepas R3::*oatC*, S3 y de los transformantes seleccionados (ST1, ST2 y ST3).

#### 4.2.2 Ensayos de SBA con los transformantes ST1 y ST2

Los transformantes seleccionados, ST1 y ST2 se enfrentaron a la acción de 9 sueros inmunes para comparar los títulos de SBA con los obtenidos frente a la cepa resistente R3::*oatC* y la cepa control S3. El transformante ST1, que parecía contener la región en el operón capsular responsable de la resistencia, originó títulos de SBA similares al aislado R3. Por el contrario, el transformante ST2 se mostró claramente sensible a la acción bactericida del suero, con títulos semejantes a la cepa S3 (Tabla 40).

**Tabla 40. Títulos de SBA de 9 sueros inmunes frente a los transformantes ST1 y ST2**

SUERO	AISLADO			
	R3:: <i>oatC</i>	S3	ST1	ST2
1RO	<8	1024	<8	1024
2R	<8	512	<8	512
3C	<8	128	<8	256
4MJ	<8	4096	256	2048
6J	<8	128	<8	128
7E	<8	512	<8	512
8B	<8	64	<8	64
11C	<8	256	<8	256
10H	<8	16384	1024	16384

### 4.3 Identificación de la región polimórfica en los aislados resistentes

#### 4.3.1 Amplificación del operón capsular

Los resultados obtenidos hasta el momento sugerían que la resistencia al suero de las cepas del estudio podría deberse a cambios en la expresión de la cápsula a través de alguna modificación genética en el operón capsular. Con el fin de evaluar esta hipótesis, el objetivo se centró en identificar dicha región o regiones del *cps* que podrían originar la resistencia de las cepas.

Se amplificó el operón capsular en el aislado resistente R3 y en dos de las cepas sensibles designadas como controles, S3 y S4. Se amplificaron 6 fragmentos solapados, con tamaños comprendidos entre 3 Kb y 5 Kb, hasta completar las 25 Kb de las que se compone el *cps*. Los resultados se indican en la Figura 15.

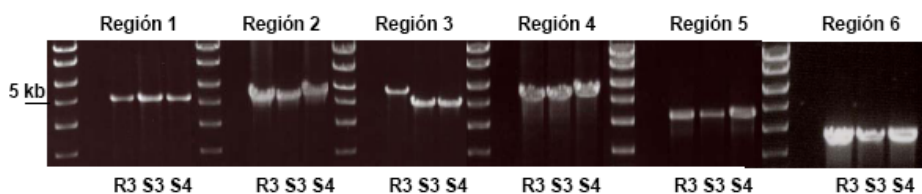
La Figura 15A muestra los productos de PCR obtenidos en las cepas R3, S3 y S4. El tamaño del producto de PCR para los tres aislados fue el mismo en cinco de las regiones amplificadas (regiones 1-2 y 4-6). Sin embargo se observaron diferencias en la región 3, donde el tamaño del producto de PCR obtenido para el aislado resistente, resultó ser significativamente mayor que el obtenido en las dos cepas sensibles S3 y S4.

Para poder relacionar la presencia de la región polimórfica encontrada en la cepa R3 con el comportamiento resistente frente a los sueros inmunes, se amplificó dicho fragmento en los otros dos aislados resistentes, R1 y R2, obteniéndose el mismo tamaño de banda para las tres cepas resistentes (Figura 15B). Así mismo, los transformantes ST1, ST2 y ST3 generados en el ensayo de transferencia de la resistencia de la cepa R3 a la cepa S3, también fueron analizados con el fin de conocer si dicho fragmento de ADN adicional, estaba presente en el transformante resistente (ST1) y ausente en los transformantes sensibles (ST2 y ST3). Se utilizaron como controles 4 cepas sensibles (S1-S4) y los aislados resistentes R3 y R3::*oatC*. La Figura 15C muestra los resultados obtenidos para todas las cepas analizadas. En todas las cepas sensibles, S1-S4,

y en los transformantes ST2 y ST3, el resultado fue el mismo, con un tamaño de producto de PCR aproximado de 5 Kb. Del mismo modo, para todos los aislados que mostraron alto grado de resistencia a la acción bactericida del suero (R3, R3::*oatC* y el transformante ST1) se obtuvo un producto de PCR de mayor tamaño. Así, se confirmaría la hipótesis planteada inicialmente en la que el comportamiento resistente de las cepas estaría relacionado con alguna modificación en el operón capsular.

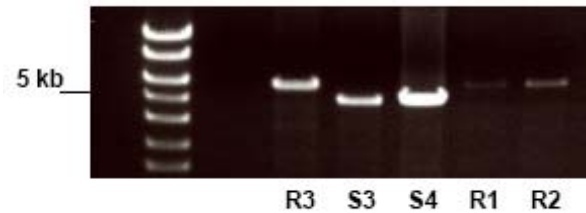
Con el fin de localizar dentro de la región 3, cuál era la región polimórfica responsable de la resistencia, se amplificaron 5 fragmentos con un tamaño aproximado de 800 pb. El tamaño de los productos de PCR obtenidos para las cepas S3 y R3 fue el mismo (fragmentos 1, 3-5), con la excepción del fragmento 2 que mostró tamaños aproximados de 800 pb y de 1.6 Kb en la cepa sensible S3 y en el aislado resistente R3, respectivamente (Figura 15D).

**Figura 15. Amplificación del operón capsular**

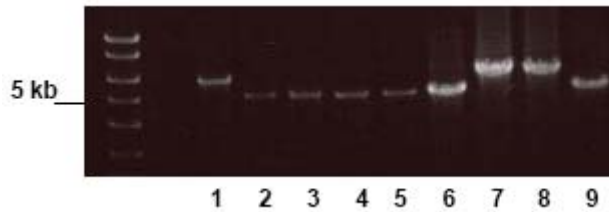


**Figura 15A. Productos de amplificación del operón capsular en las cepas R3, S3 y S4.** Los tamaños de los fragmentos amplificados en las cepas control fueron: región 1, 4980 pb; región 2, 5037 pb; región 3, 5019 pb; región 4, 5024 pb; región 5; 4122 pb y región 6; 3284 pb.

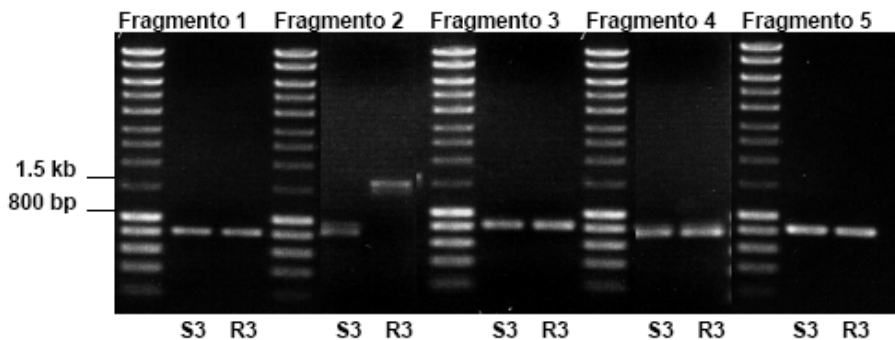
**Figura 15. Amplificación del operón capsular**



**Figura 15B. Productos de amplificación de la región 3 en los aislados resistentes R1, R2 y R3 y en dos cepas sensibles (S3 y S4)**



**Figura 15C. Productos de amplificación de la región 3 en los transformantes ST1, ST2 y ST3 y en las cepas utilizadas como controles (R3, R3::oatC, S1, S2, S3 y S4)**



**Figura 15D. Productos de PCR en las cepas S3 y R3 de los fragmentos de la región 3. Los tamaños de los fragmentos amplificados en las cepa control fueron: fragmento 1, 807 pb; fragmento 2, 818 pb; fragmento 3, 794 pb; fragmento 4, 819 pb y fragmento 5, 791pb.**

#### **4.3.2 Amplificación de la región intergénica entre los genes *siaA* y *ctrA***

Se analizó en la cepa sensible S3, la secuencia de nucleótidos del fragmento 2 incluido dentro en la región del *cps* designada como región 3. Se comprobó que dicho fragmento comprendía una secuencia parcial de los genes *siaA* y *ctrA*, junto con la RIG de 134 pb comprendida entre ambos.

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos al amplificar un fragmento que comprendía la RIG *siaA-ctrA*. Se observó una diferencia en el tamaño del producto amplificado entre las cepas R3 y S3 de aproximadamente 800 pb (Figura 16A). Se examinaron también los tamaños de los fragmentos obtenidos para las otras dos cepas resistentes, R2 y R3, para las 5 cepas sensibles controles (Figura 16B), así como en 27 cepas más pertenecientes al complejo clonal ST-11 CC, que mostraron ser sensibles al suero en los estudios previos de identificación de aislados resistentes (Figura 16C). Los tres aislados resistentes, R1, R2 y R3, presentaron un producto mayor, de aproximadamente 1.1 Kb, mientras que en todas las cepas sensibles fue de alrededor 300 pb.

Los resultados obtenidos demostraron que todas aquellas cepas que presentaban resistencia a la actividad de los anticuerpos bactericidas del suero, poseían un polimorfismo en la región comprendida entre los genes *siaA* y *ctrA* del operón capsular debido a la presencia de un fragmento de ADN con un tamaño aproximado de 800bp, que podría ser la causa del carácter resistente.

Figura 16. Amplificación de la región RIG entre los genes *siaA* y *ctrA*

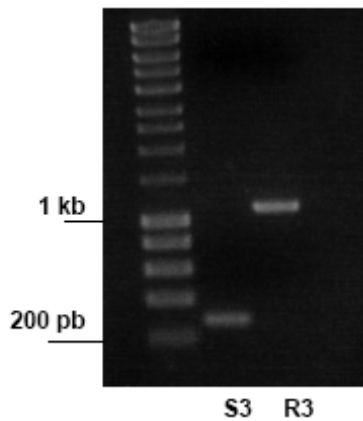


Figura 16A. Productos amplificación de las cepas S3 y R3

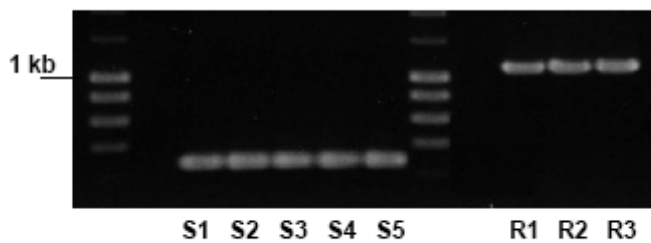


Figura 16B. Productos amplificación de 5 cepas sensibles (S1-S5) y de las cepas resistentes R1, R2 y R3

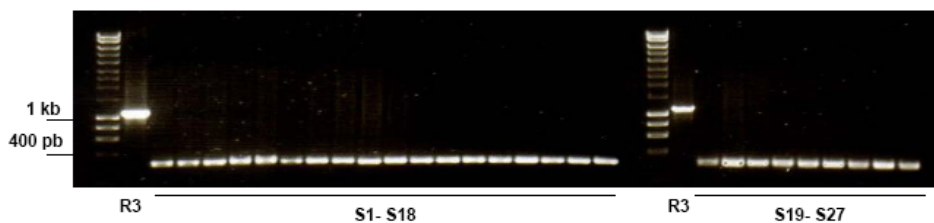


Figura 16C. Productos de amplificación de las 27 cepas sensibles pertenecientes al complejo clonal ST-11CC

## 5 Identificación de la secuencia de inserción IS1301 en el operón capsular

### 5.1 Secuenciación de la región intergénica entre los genes *siaA* y *ctrA*

Se analizaron de las secuencias obtenidas a partir del producto amplificado, que incluía una secuencia parcial de los genes *siaA* y *ctrA* junto con la RIG comprendida entre ambos, en las cepas sensibles y resistentes. Dicho análisis demostró que el polimorfismo hallado en el operón *cps* se debía a la presencia de una secuencia de inserción denominada IS1301. Este elemento se encontraba localizado en la RIG entre los genes *siaA* y *ctrA*, en los tres aislados identificados como resistentes. Ambos genes, implicados en la biosíntesis y en el transporte del polisacárido capsular, respectivamente, se transcriben a partir de promotores divergentes localizados en dicha RIG.

La Figura 17 detalla la secuencia de nucleótidos que incluía una secuencia parcial de los genes *siaA* y *ctrA* junto con la RIG de 134pb en la cepa sensible S3 (Figura 17A) y en el aislado resistente R3 (Figura 17B). En el aislado resistente R3 dicha RIG estaba modificada por la presencia de la secuencia de inserción IS1301. Dicho elemento, con un tamaño de 844 pb, estaba localizado en el mismo punto, 54 pb por delante del codón de inicio ATG del gen *siaA*, y en la misma orientación en los tres aislados resistentes R1, R2 y R3.

**Figura 17. Secuencia de la región intergénica entre los genes *siaA* y *ctrA***



**Figura 17A. Secuencia de la RIG en la cepa sensible S3.** La secuencia de nucleótidos amplificada por los cebadores NG732/NG733 (se indica su localización) incluía una parte de los genes *siaA* y *ctrA* (en negro) y la RIG comprendida entre ambos (en azul). El codón de inicio para cada gen aparece en negrita. En dicha RIG se localizan los promotores de ambos operones (en azul negrita) así como el punto divergente de inicio de la transcripción ( $t_i$ ).



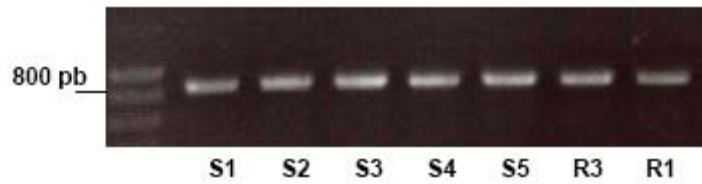
## 5.2 Identificación de la secuencia de inserción IS1301 en cepas sensibles

Los resultados obtenidos en el apartado 4.3.2 al amplificar la RIG *siaA-ctrA* en un grupo de 32 cepas sensibles, que incluía cinco cepas controles (S1-S5) y 27 cepas sensibles pertenecientes también al ST-11 CC, demostraron que en ninguna de las cepas sensibles se detectó en esa localización, ADN adicional correspondiente a la secuencia IS1301, como ocurrió en las cepas resistentes.

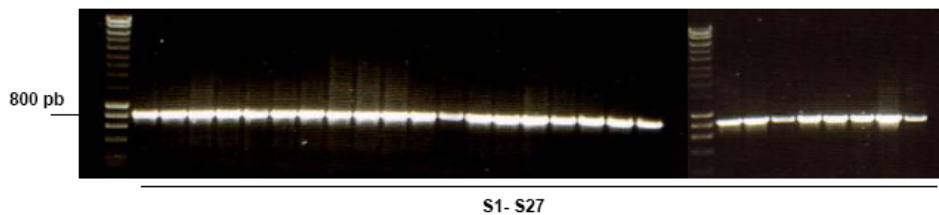
Debido a que la secuencia de inserción IS1301 es un elemento móvil que puede estar presente en múltiples copias en el genoma de algunas cepas de meningococo, el objetivo era conocer si dicha secuencia estaba presente en algún otro punto del genoma de las 32 cepas sensibles anteriormente estudiadas.

La Figura 18 (A y B) muestra el resultado obtenido mediante PCR para identificar la presencia de la secuencia de inserción IS1301 en las cepas sensibles. Los productos de amplificación obtenidos, con un tamaño aproximado de 840 pb, demostraron que las 32 cepas de meningococo que eran sensibles a la actividad bactericida del suero, contenían en su genoma la secuencia de inserción IS1301. Según probaron los resultados presentados en el apartado 4.3.2, en todas las cepas sensibles este elemento de inserción debía estar localizado fuera de la RIG *siaA-ctrA*.

**Figura 18. Identificación de la secuencia de inserción IS1301 en el genoma de las 32 cepas sensibles**



**Figura 18A. Productos de amplificación de la secuencia IS1301 en las cepas S1-S5**



**Figura 18B. Productos de amplificación de la secuencia IS1301 en las 27 cepas sensibles pertenecientes al complejo clonal ST-11 CC**

## 6 Transferencia de la región intergénica

### 6.1 Transformación en el aislado R3. Ensayo de SBA con los transformantes

Para conocer si el marcador de resistencia a kanamicina introducido en la secuencia IS1301 (que permitía seleccionar a los transformantes) podía modificar el carácter resistente del aislado R3, se transformó el mismo con ADN plasmídico que contenía la RIG con el marcador de resistencia a kanamicina en la secuencia IS1301 (apartado 7.10 Material y Métodos). Se seleccionaron las cepas transformantes y mediante ensayos de SBA se estudió su sensibilidad al suero.

La Tabla 41 muestra los títulos de SBA obtenidos para los tres sueros estudiados al enfrentarlos con cada uno de los seis transformantes R3::IS1301<sup>kan</sup> (T1-T6), utilizando como controles a los aislados R3 y S3. Todos los transformantes se mostraron resistentes a la acción bactericida del suero con títulos de SBA de <8, al igual que el aislado resistente R3. Estos resultados indicaron que el marcador de resistencia a kanamicina en la secuencia IS1301 no modificaba la resistencia del aislado R3.

**Tabla 41. Títulos de SBA de 3 sueros inmunes frente a las cepas S3, R3 y frente a los transformantes R3::IS1301<sup>kan</sup> (T1-T6)**

SUERO	S3	R3	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1R	512	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
2R	1024	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
4MJ	2048	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8

## 6.2 Transformación en el aislado S3. Ensayo de SBA con los transformantes

El objetivo era transferir la RIG modificada por la inserción de la secuencia IS1301 a una de las cepas sensibles, con el fin de conocer si ésta modificaba su sensibilidad a la acción de sueros inmunes. Al transformar la cepa sensible S3 con la RIG se generó un único transformante (apartado 7.10 Material y Métodos) que se analizó para su sensibilidad al suero mediante ensayos de SBA en los que se incluyeron a las cepas S3 y R3.

Como muestran los resultados de la Tabla 42, la transferencia de la RIG que contenía la secuencia de inserción IS1301 a la cepa S3, fue suficiente para modificar la supervivencia de la cepa isogénica generada (denominada SR) a la actividad bactericida de sueros inmunes. Los títulos de SBA de los 9 sueros inmunes probados frente a la cepa SR relacionaron el perfil de resistencia de la misma con el observado en los aislados resistentes R1 y R2.

**Tabla 42. Títulos de SBA de 9 sueros inmunes frente a las cepas R3, S3 y SR**

SUERO	AISLADO		
	R3	S3	SR
1RO	<8	512	<8
2R	<8	512	<8
3C	<8	128	<8
4MJ	<8	1024	64
5RC	<8	2048	512
6J	<8	64	<8
7E	<8	1024	64
9S	<8	1024	128
10H	<8	4096	512

## 7 Análisis de la estructura antigénica de la cápsula

### 7.1 Ensayos de SBA en sueros obtenidos tras inmunización en ratones

Se realizaron experimentos de inmunización en ratones con la cepa R3 y con las cepas isogénicas S3 y SR para obtener sueros inmunes frente a las mismas. Los sueros obtenidos tras dicha inmunización se enfrentaron a cada una de las cepas mediante ensayos de SBA.

La Tabla 43 muestra los títulos de SBA de los tres sueros para cada una de las cepas. Como era de esperar, el suero anti-S3 presentaba actividad bactericida frente a la cepa S3, pero no frente a las cepas resistentes R3 y SR, con títulos de SBA de <8. Los sueros anti-R3 y anti-SR presentaron títulos de SBA de 1024 frente a la cepa S3, lo que demostraba que el polisacárido capsular de las cepas R3 y SR mantenía su inmunogenicidad. Sin embargo, dichos sueros inmunes, frente a las cepas R3 y SR mostraron títulos de SBA de <8 siendo incapaces de producir la lisis de la bacteria mediada por el sistema de complemento en estas cepas.

Estos resultados sugerían que la resistencia de los aislados R3 y SR no estaba causada por cambios o alteraciones en la naturaleza de los antígenos expresados por ambas cepas.

**Tabla 43. Títulos de SBA de sueros de ratón inmunes frente a las cepas R3, S3 y SR**

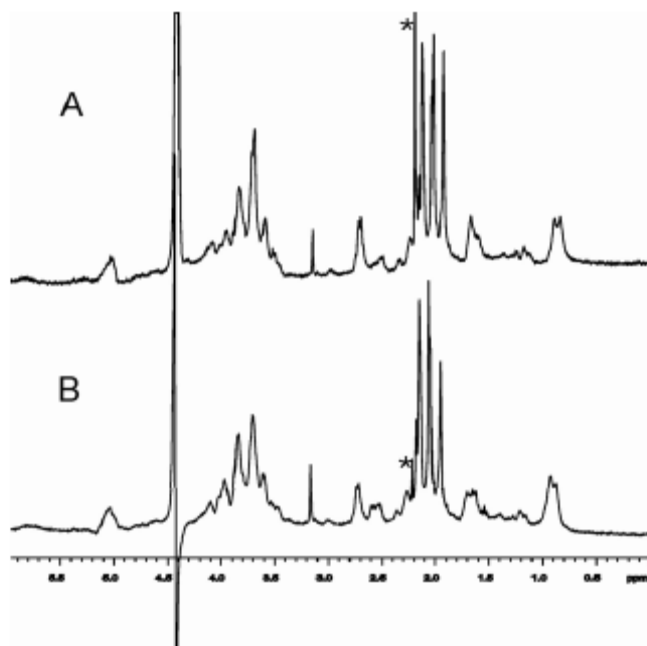
SUERO INMUNE FRENTE	S3	SR	R3
S3	1024	<8	<8
SR	1024	<8	<8
R3	1024	<8	<8

## **7.2 Análisis de la estructura del polisacárido capsular mediante espectroscopía de RMN**

Para conocer si había algún tipo de modificación en la estructura del polisacárido capsular de los aislados resistentes respecto a las cepas sensibles, se analizó la estructura del mismo mediante espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN en las cepas S3 y R3.

El espectro generado para la cápsula purificada de la cepa S3 (Figura 19A) fue similar al obtenido para la cepa R3 (Figura 19B). Esto demostró que ambas cepas, sensible y resistente, presentaban enlaces idénticos entre los monómeros de ácido siálico así como el mismo grado y distribución de residuos O-acetilados. Por tanto no se observó ningún cambio detectable en la composición de la cápsula del aislado resistente respecto a la cepa sensible.

Figura 19. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN del polisacárido capsular purificado de las cepas S3 (A) y R3 (B)



El asterisco denota el control interno (acetona) y los picos que aparecen aproximadamente a 4.8 partes por millón (ppm) en ambos espectros son originados por agua parcialmente deuterada.

Los títulos de SBA de los sueros obtenidos tras la inmunización en ratones con cada una de las cepas así como el análisis por espectroscopía, descartaron la relación entre la inserción de IS1301 en la RIG *siaA-ctrA* con cambios que pudieran afectar a la estructura antigénica del polisacárido capsular.

## 8 Estudio de cambios cuantitativos en la cápsula

### 8.1 Análisis del nivel de expresión de los genes *siaA* y *ctrA*

El siguiente paso se basó en investigar si la inserción de la secuencia IS1301 en la RIG entre los genes *siaA* y *ctrA* de las cepas resistentes, podría afectar a la transcripción de los mismos y, en consecuencia modificar la cantidad de cápsula producida.

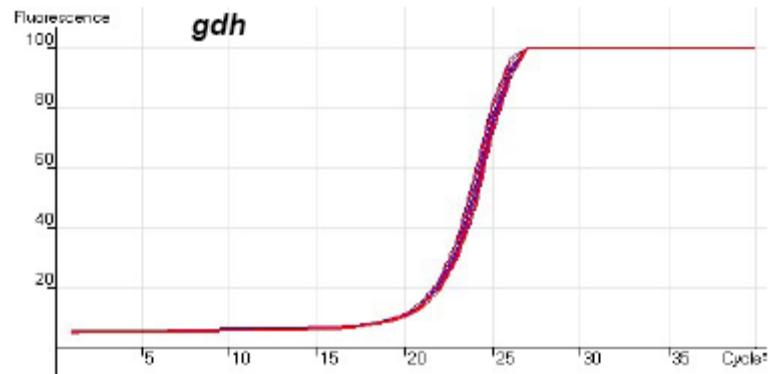
Se analizó el nivel de expresión de *siaA* y *ctrA* mediante qRT-PCR, con el fin de cuantificar el ARNm de los aislados resistentes R3 y SR y de la cepa sensible S3. En cada uno de los ensayos realizados se cuantificaron los transcritos del gen *gdh*, utilizado como control, para cada una de las tres cepas estudiadas.

En la Figura 20, el gráfico representa la medida de la fluorescencia producida al generarse el producto de amplificación del gen *gdh* en las cepas S3, SR y R3. El ciclo de amplificación fue el mismo para las tres cepas lo que ponía de manifiesto que el nivel de expresión del gen control era similar en todas ellas.

La Figura 21 muestra las diferencias en el nivel de expresión del gen *siaA* entre las cepas S3, SR y R3. Las curvas de amplificación para las cepas resistentes SR y R3 aparecieron en el mismo ciclo y antes que para la cepa sensible (Figura 21A). Esto se tradujo en un aumento de los niveles de transcripción (medidos de forma relativa) para ambas cepas resistentes, dos veces superior a la cepa S3 (Figura 21B), con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.005$ ).

En la Figura 22 se muestran las diferencias en el nivel de expresión del gen *ctrA* entre las cepas S3, SR y R3. También se apreció diferencia entre los aislados resistentes y la cepa sensible en las curvas de amplificación (Figura 22A). Del mismo modo que ocurría con el gen *siaA*, los niveles de transcripción del gen *ctrA* en las cepas SR y R3 fueron superiores a los de la cepa sensible, siendo en este caso hasta tres veces mayores (Figura 22B), con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.005$ ).

Figura 20. Curvas de amplificación del gen *gdh* en las cepas S3, SR y R3



Las curvas de amplificación para las cepas S3, SR y R3 se indican azul, morado y rojo (aparecen superpuestas), respectivamente.

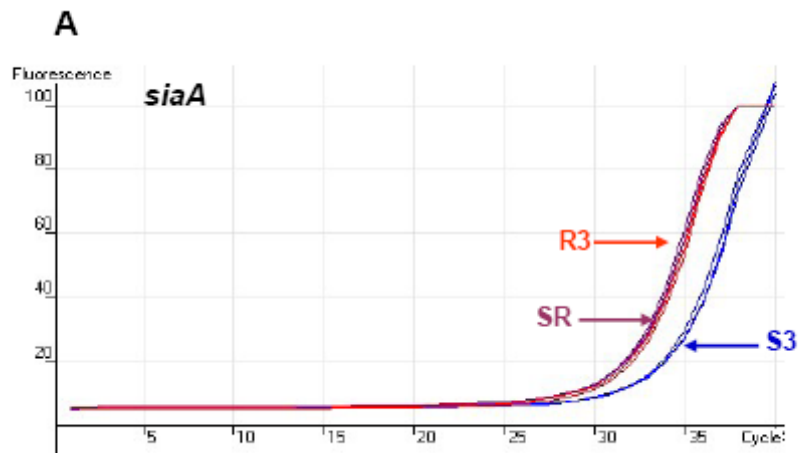
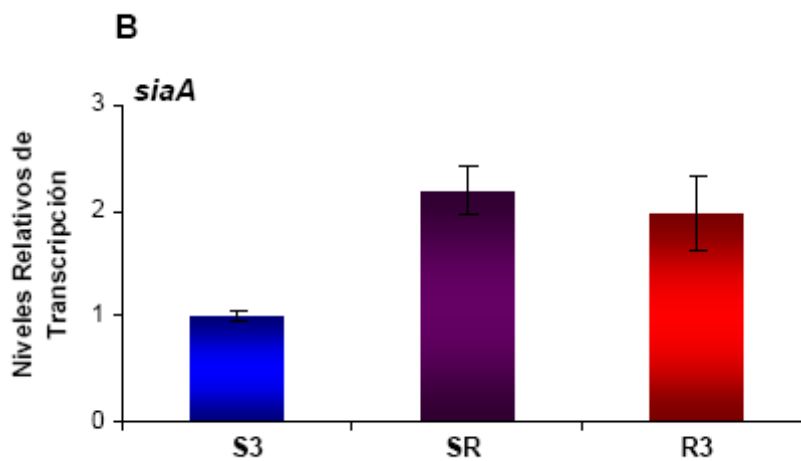
Figura 21. Nivel de expresión del gen *siaA* en las cepas S3, SR y R3Figura 21A. Curvas de amplificación del gen *siaA*. Aparecen indicadas en azul para la cepa S3, en morado para la cepa SR y en rojo para la cepa R3.Figura 21B. Niveles relativos de transcripción del gen *siaA* en las cepas S3, SR y R3

Figura 22. Nivel de expresión del gen *ctrA* en las cepas S3, SR y R3

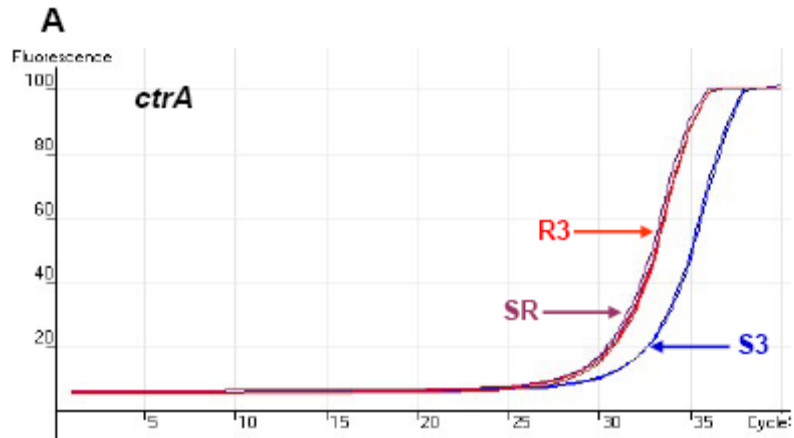


Figura 22A. Curvas de amplificación del gen *ctrA*. Aparecen indicadas en azul para la cepa S3, en morado para la cepa SR y en rojo para la cepa R3.

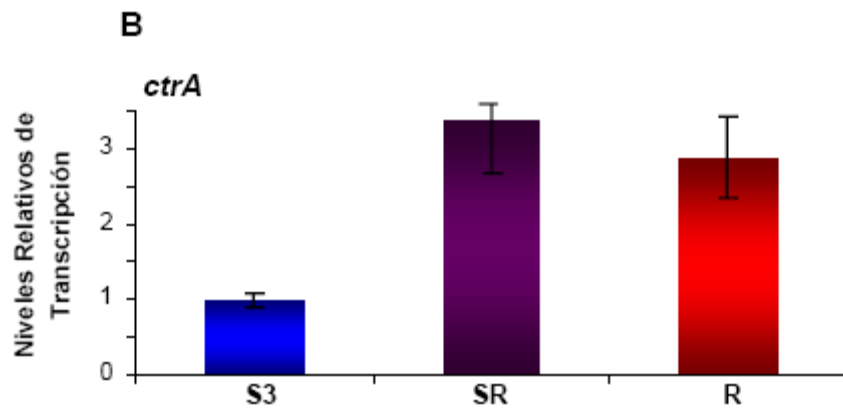


Figura 22B. Niveles relativos de transcripción del gen *ctrA* en las cepas S3, SR y R3

## 8.2 Cuantificación del polisacárido capsular

### 8.2.1 Cuantificación del polisacárido capsular mediante FACS

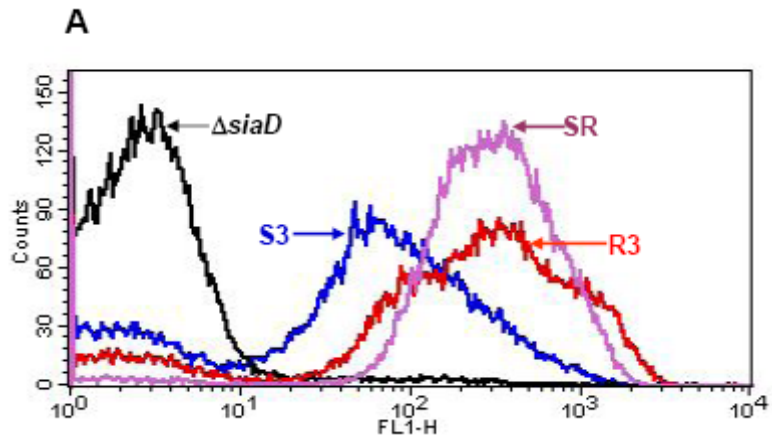
Para conocer si el aumento en la transcripción de los genes *siaA* y *ctrA* de las cepas resistentes originaba mayor producción de polisacárido capsular, se midió la cantidad de cápsula expresada en la superficie de la bacteria.

Se inmunizaron grupos de ratones con una de las vacunas conjugadas comerciales disponibles frente a *N. meningitidis* serogrupo C (Meningitec<sup>®</sup>, Wyeth) con el fin de obtener sueros inmunes con anticuerpos policlonales específicos frente a la cápsula y así poder cuantificar mediante FACS la unión de los mismos frente al polisacárido capsular de la bacteria.

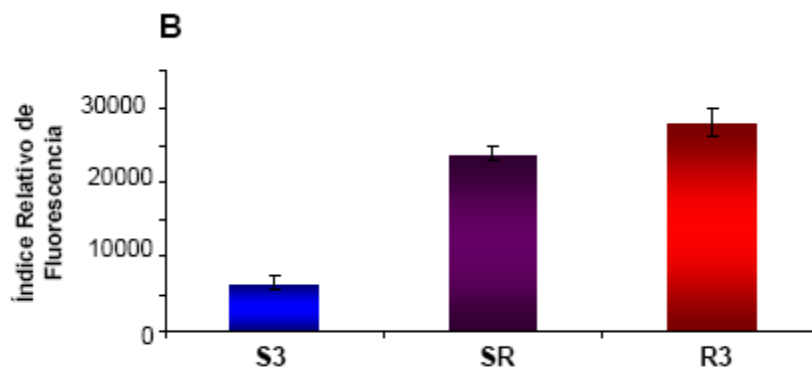
Se observaron diferencias en la fluorescencia generada al unirse los anticuerpos anticapsulares a la superficie de las cepas S3, SR y R3 (Figura 23A). Se apreciaron diferencias significativas entre las cepas resistentes y la cepa sensible en cuanto a la cantidad relativa de cápsula expresada ( $P < 0.005$ ), cuantificado como Índice Relativo de Fluorescencia (IRF). La medida del IRF fue aproximadamente tres veces superior en las cepas SR y R3 que en la cepa S3 (Figura 23B), lo que parecía indicar que la cantidad de cápsula producida por las cepas resistentes era mayor que en la cepa sensible.

El estudio se amplió a las otras dos cepas resistentes, R1 y R2. La Figura 24 muestra los resultados obtenidos por FACS al comparar la cantidad de cápsula expresada por las cuatro cepas resistentes, R1, R2, R3 y SR, con la expresada por tres de las cepas sensibles utilizadas como controles (S1, S2 y S4). Se observaron diferencias en la unión del anticuerpo a la superficie de la bacteria, lo que sugería que la cantidad de cápsula expresada por las cepas resistentes era relativamente mayor que en las cepas sensibles.

**Figura 23. Cuantificación del polisacárido capsular mediante FACS**

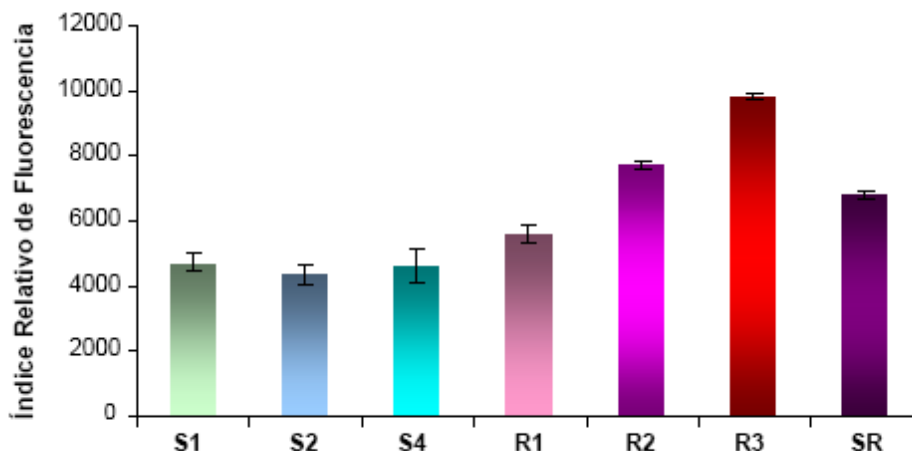


**Figura 23A. Unión del anticuerpo a la superficie de las cepas S3, SR y R3.** La fluorescencia generada por la unión del anticuerpo a la superficie de la bacteria se representa con líneas azul (S3), morada (SR) y roja (R3). No se observó ninguna unión en el mutante en cápsula utilizado como control (línea negra).



**Figura 23B. Cantidad relativa de cápsula expresada en las cepas S3, SR y R3.** El IRF se calculó como la media geométrica de la fluorescencia multiplicada por el número de células positivas, respecto a la cepa S3.

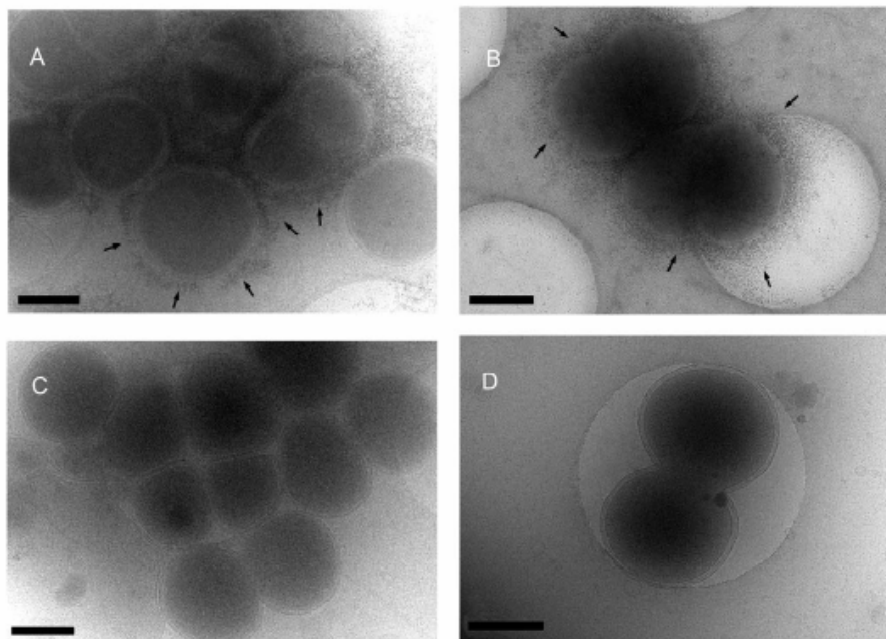
**Figura 24. Cuantificación del polisacárido capsular mediante FACS en las cepas resistentes y en tres cepas sensibles**



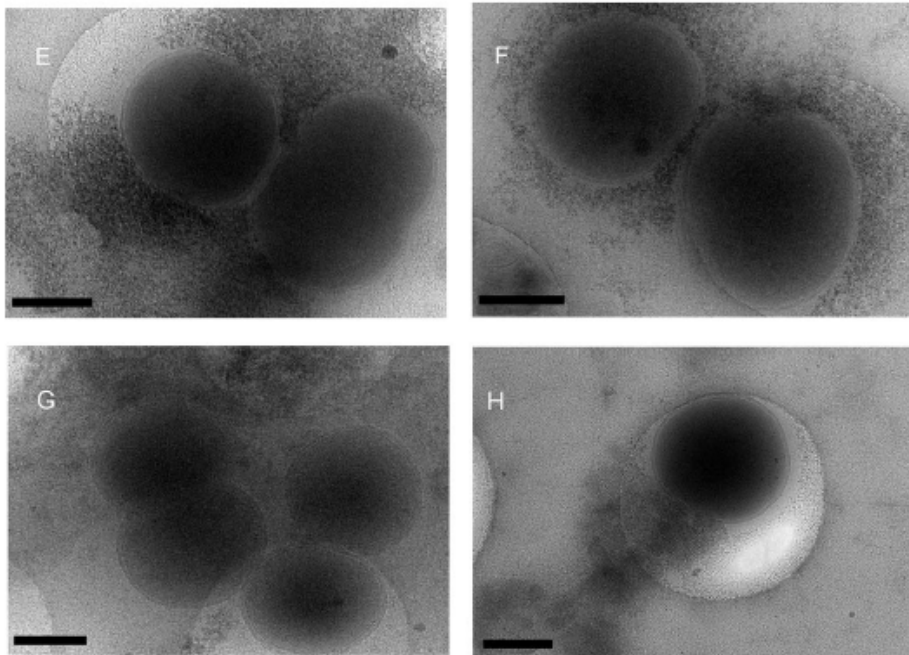
### 8.2.2 Detección del polisacárido capsular mediante criomicroscopía electrónica de transmisión

Las cepas S3, SR y R3 se examinaron por crio-TEM. Utilizando esta metodología, el polisacárido capsular se visualizó de forma clara alrededor de la cepa sensible S3 (Figura 25 A y B). En el mutante *siaD* (que no expresaba cápsula) no se detectó ningún resto de material capsular (Figura 25 C y D), lo que demostró la especificidad de la tinción con ferritina. Por el contrario, se detectó mucha mayor cantidad de cápsula alrededor de las cepas R3 (Figura 25 E y F) y SR (Figura 25 G y H), en comparación con la cepa S3. Las imágenes mostraron la presencia de material capsular que se extendía más allá de la superficie bacteriana formando ocasionalmente agregados de material extracelular. Las diferencias observadas entre las cepas fueron consistentes en tres ocasiones independientes.

**Figura 25. Detección del polisacárido capsular mediante crio-TEM**



**Figura 25 A-D. Detección del polisacárido capsular de las cepas S3 y el mutante *siaD* de *N. meningitidis*.** Se detectó material capsular alrededor de la superficie de la cepa sensible S3 (A y B indicado con flechas) pero no en el mutante en cápsula *siaD* (C y D). Las barras indican una distancia de 400nm.

**Figura 25. Detección del polisacárido capsular mediante crio-TEM**

**Figura 25 E-H. Detección del polisacárido capsular de las cepas R3 y SR.** Las cepas resistentes R3 (E y F) y SR (G y H) expresaron grandes cantidades de cápsula, formando en algunos puntos agregados extracelulares. Las barras indican una distancia de 400nm.

Los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica confirmaron que las cepas resistentes SR y R3 presentaban una mayor cantidad de cápsula en la envoltura bacteriana, lo que sugería que de algún modo podría estar relacionado con su mayor resistencia a la actividad bactericida del suero.

El siguiente paso era analizar la interacción de las cepas con diferentes factores del sistema del complemento para conocer la implicación en evasión de la inmunidad mediada por el mismo.

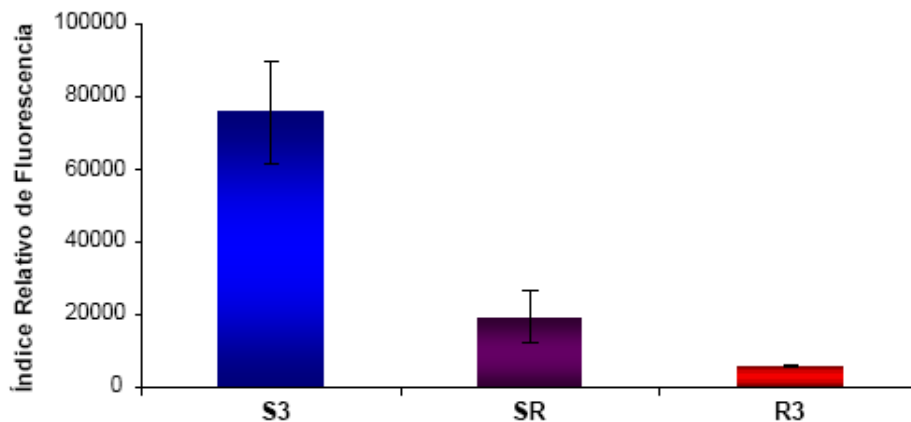
## 9 Interacción con el sistema del complemento

### 9.1 Depósito del componente C3b

Con el objetivo de entender las bases inmunológicas para la resistencia de las cepas, se comenzó determinado el depósito del componente C3b en la superficie de la bacteria mediante FACS.

Para ello, la cepa sensible S3 y las dos cepas resistentes SR y R3 se incubaron con suero inmune (se empleó una mezcla de 10 sueros procedentes de individuos vacunados con vacuna conjugada frente a serogrupo C) y posteriormente con el anticuerpo anti-C3 humano conjugado con el fluorocromo FITC. La cantidad de C3b fijado a superficie de la bacteria (medido como IRF) resultó ser significativamente menor en las dos cepas resistentes que en la cepa sensible S3 ( $P < 0,01$ ) (Figura 26).

**Figura 26. Depósito del componente C3b en la superficie de las cepas S3, SR y R3**

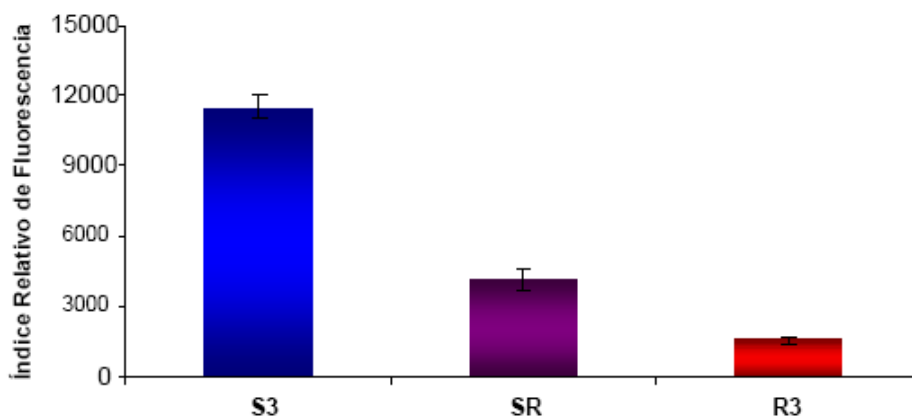


## 9.2 Fijación del complejo de ataque a la membrana

Una vez analizada la unión del componente C3b a la superficie bacteriana, el paso siguiente consistió en caracterizar la fijación del MAC.

La incubación de las cepas con los sueros inmunes y con los Ac1<sup>ario</sup> y 2<sup>ario</sup> permitió detectar mediante FACS, la fijación del MAC en la superficie de la cepa sensible S3 comparándola con los dos aislados resistentes R3 y SR. Al igual que ocurrió con la cantidad de C3b unido, las dos cepas resistentes SR y R3 fijaron significativamente menos MAC en su superficie en comparación con la cepa sensible S3 ( $P < 0,01$ ) (Figura 27).

**Figura 27. Inserción del MAC en la superficie de las cepas S3, SR y R3**



Las diferencias observadas entre las cepas resistentes y la cepa sensible en cuanto al depósito de C3b y a la cantidad de MAC fijada en la superficie bacteriana, eran consistentes con los datos obtenidos en los ensayos de SBA, así como en los realizados con complemento humano, esto sugería que las cepas resistentes presentaban una mayor capacidad para evadir la inmunidad mediada por el sistema del complemento.

### **9.3 Activación del sistema del complemento regulado por la vía alternativa**

Se analizó si existían diferencias en la capacidad de las cepas sensibles y resistentes para activar la vía alternativa del complemento. Para ello, se bloqueó la activación tanto de la vía clásica como de la vía de las lectinas utilizando inhibidores específicos con el fin de permitir que la única vía de activación del complemento fuera la vía alternativa. Se determinó la cantidad de C3b y de MAC unido a la superficie de la bacteria tras bloquear la vía clásica y de la vía de las lectinas.

#### **9.3.1 Depósito del componente C3b**

Las tres cepas, S3, SR y R3, se incubaron con suero humano inmune (mezcla de 10 sueros) y con los inhibidores de la vía clásica y de las lectinas.

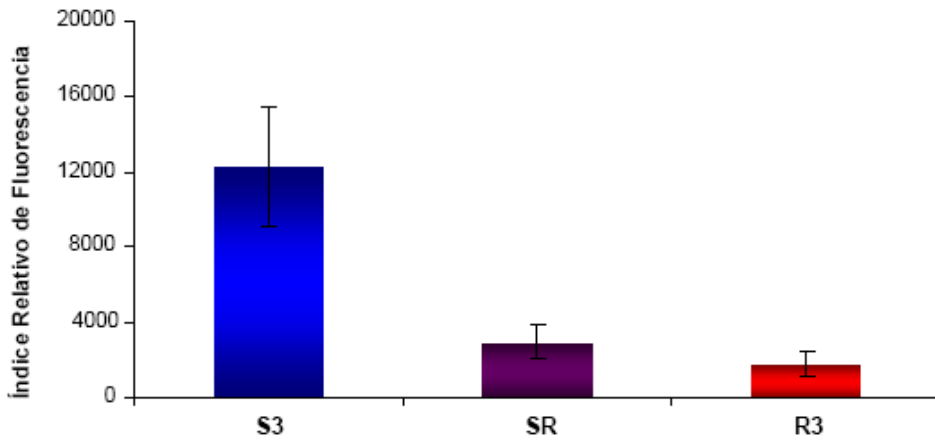
En presencia sólo de la vía alternativa, la cantidad de C3b fijada a la superficie de la bacteria seguía siendo significativamente mayor en la cepa S3 (al igual que se había visto en el apartado 9.1) respecto a las cepas resistentes, SR y R3 ( $P < 0,01$ ) (Figura 28).

#### **9.3.2 Fijación del complejo de ataque a la membrana**

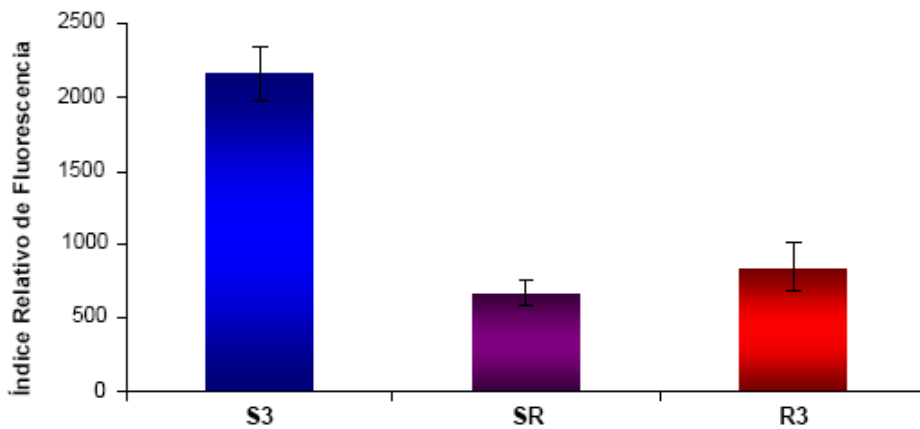
Siguiendo la metodología del apartado anterior se determinó la cantidad de MAC fijada en la superficie bacteriana como consecuencia de la activación de la vía alternativa. Como se observa en la Figura 29, en ausencia de la vía clásica y de lectinas, la cantidad de MAC fijada en las cepas resistentes SR y R3, fue significativamente menor que en la cepa sensible ( $P < 0,01$ ).

Los resultados obtenidos demostraron que las cepas resistentes presentaban una mayor capacidad para evadir la activación de la vía alternativa que las cepas sensibles, evitando de este modo la opsonización por C3b y la activación o inserción del MAC en la superficie bacteriana.

**Figura 28. Depósito del componente C3b en la superficie de las cepas S3, SR y R3 mediado por la activación de la vía alternativa del complemento**



**Figura 29. Inserción del MAC en la superficie de las cepas S3, SR y R3 mediado por la activación de la vía alternativa del complemento**



## 10 Análisis de la proteína de superficie PorA en relación a la resistencia de las cepas

### 10.1 Ensayo de SBA con anticuerpo anti-PorA

Se analizó la sensibilidad de las cepas frente a un anticuerpo dirigido frente a la proteína de membrana PorA, que es un potente inmunógeno inductor de anticuerpos bactericidas frente a meningococo.

Se realizó el ensayo de SBA, enfrentando las cepas sensibles S3, S4 y S5 y todos los aislados resistentes (R1, R2, R3 y SR) con el Acm P1.5 dirigido frente al subtipo de PorA que expresaban todas las cepas del estudio.

En la Tabla 44, se indican los títulos de SBA obtenidos frente a la proteína PorA de tres cepas sensibles (S3, S4 y S5) y de las cepas resistentes. La activación del complemento en presencia del anticuerpo específico permitió la lisis de las cepas sensibles con títulos de SBA de 128 o de 256, mientras que no se produjo lisis de las cepas resistentes con títulos de SBA de <8.

**Tabla 44. Títulos de SBA del Acm-P1 5 frente a las cepas resistentes y a tres cepas sensibles**

	S3	S4	S5	R1	R2	R3	SR
Acm P1.5	128	128	256	<8	<8	<8	<8

Estos resultados probaron que en las cepas sensibles el anticuerpo dirigido frente a la proteína PorA presentaba acción bactericida a través de la activación del sistema del complemento. Por el contrario en las cepas resistentes, la activación del complemento por la unión específica antígeno-anticuerpo no fue suficiente para provocar la lisis de la bacteria.

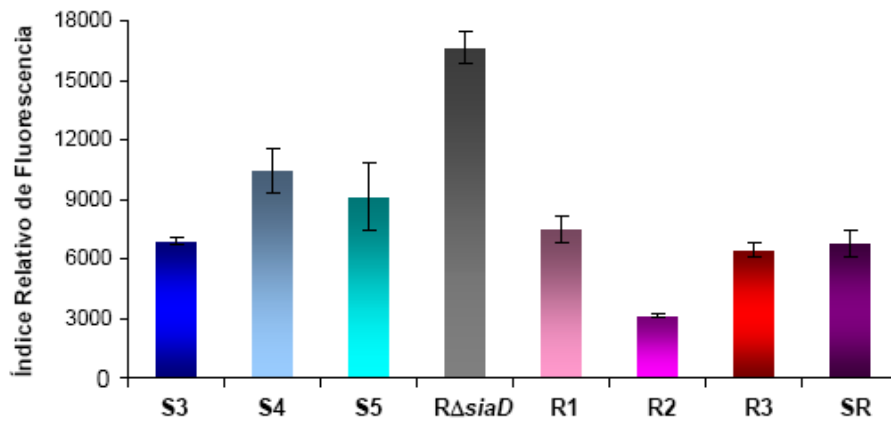
## 10.2 Análisis de la expresión de PorA

Se analizó si las diferencias obtenidas entre las cepas sensibles y resistentes a la acción bactericida del anticuerpo anti-PorA podían deberse a una diferente expresión de la proteína PorA en la superficie de las cepas.

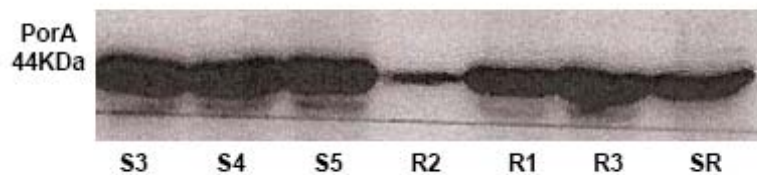
Se detectó mediante FACS la cantidad de Acm P1.5 unido a tres de las cepas sensibles (S3, S4 y S5) y a las cuatro cepas resistentes (R1, R2, R3 y SR). No se apreciaron diferencias significativas en cuanto unión del anticuerpo (medido como IRF) entre las cepas sensibles y las resistentes, con excepción de la cepa R2 y el mutante en cápsula, que unieron menor y mayor cantidad de anticuerpo, respectivamente (Figura 30).

Para conocer la cantidad de proteína PorA expresada por las cepas y así comprobar si la menor unión del anticuerpo observada en la cepa R2 guardaba relación con una menor expresión de PorA, se realizó el análisis mediante Western blot. En general, no se evidenciaron diferencias significativas en la cantidad de proteína expresada por las cepas sensibles y los aislados resistentes, R1, R2 y R3 (Figura 31). Sin embargo, la cepa R2 mostró menor cantidad de PorA, lo que confirmaría los resultados obtenidos por citometría de flujo que se muestran en la Figura 30.

**Figura 30. Detección de PorA en los aislados resistentes (R1, R2, R3 y SR), en las tres cepas sensibles (S3, S4 y S5) y en un mutante en cápsula**



**Figura 31. Expresión de PorA en las tres cepas sensibles (S3, S4 y S5) y en los aislados resistentes (R1, R2, R3 y SR)**



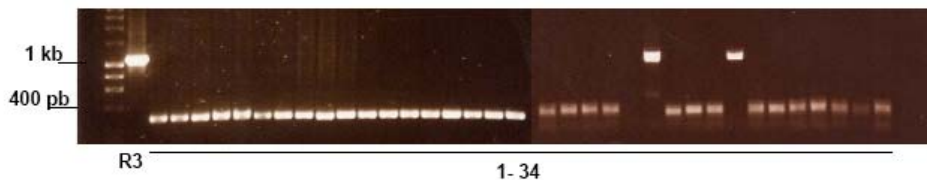
## 11 Detección de la secuencia de inserción IS1301 en cepas aisladas de individuos vacunados

Desde la implantación en España de la vacuna conjugada frente al serogrupo C en el esquema nacional de vacunación, se han documentado casos de EM en individuos que habían sido inmunizados, habiendo seguido correctamente las pautas de vacunación. El Laboratorio de Referencia de Neisserias dispone de algunas de estas cepas aisladas de individuos vacunados con casos de EM documentados como fallos vacunales.

El objetivo era averiguar si al igual que ocurría en las cepas resistentes, la secuencia de inserción IS1301 estaba localizada en estos aislados en la RIG *siaA-ctrA* y poder establecer así alguna asociación entre la presencia de la misma con los fallos vacunales.

Se analizaron 34 cepas causantes de EM en niños y adolescentes vacunados. Se amplificó mediante PCR una secuencia parcial de los genes *siaA* y *ctrA* así como la RIG comprendida entre ambos. Como se observa en la Figura 32, el tamaño aproximado de los productos de PCR fue de 300 pb en 32 de las cepas. Dos de los aislados presentaron un tamaño de producto aproximado de 1.1 Kb que ponía de manifiesto la inserción de la secuencia IS1301 en la RIG *siaA-ctrA*, al igual que la cepa resistente R3, utilizada como control. Estas dos cepas habían sido aisladas a partir de sangre y LCR en los años 2006 y 2007 y eran fenotípicamente iguales, C:2a:NST.

**Figura 32. Amplificación de la región intergénica entre los genes *siaA* y *ctrA* en cepas asociadas a fallos vacunales**



Los resultados obtenidos indicaron la presencia de la secuencia de inserción IS1301 localizada en la RIG *siaA-ctrA*, en aproximadamente el 6% de las cepas estudiadas, por lo que no se pudo establecer una relación directa entre la presencia de la misma y la presentación de fallos vacunales.

## **DISCUSIÓN**



La enfermedad meningocócica sigue produciendo elevados índices de mortalidad y alta ansiedad social, por lo que su erradicación continúa siendo uno de los objetivos prioritarios en Salud Pública.

El éxito obtenido con la implantación de las vacunas conjugadas frente a serogrupo C podría verse afectado por la emergencia de cepas resistentes a la acción bactericida del suero en la lisis mediada por el sistema del complemento. La identificación y caracterización molecular de los mecanismos que pueden inducir resistencia en estos aislados, tiene un indudable valor para poder entender cómo el meningococo es capaz de evadir la respuesta inmune, para desarrollar métodos que permitan detectar precozmente la emergencia de cepas hipervirulentas susceptibles de producir procesos epidémicos y para diseñar nuevas medidas preventivas que impidan su expansión.

Partiendo de estas premisas, se investigó la existencia fenómenos de resistencia entre cepas circulantes de meningococo, que podrían haberse desarrollado y seleccionado debido a la presión selectiva impuesta por la inmunización. Se seleccionaron al azar aislados clínicos de *N. meningitidis* serogrupo C causantes de enfermedad invasiva, para el estudio de su sensibilidad frente a sueros de individuos inmunizados con vacuna conjugada frente al serogrupo C. Se considera que un título de SBA mayor o igual a 8 o un aumento  $\geq 4$  en dicho título, está aceptado como correlación de protección inmunológica frente a cepas del serogrupo C (Borrow et al., 2001). Del total de 109 aislados analizados, se identificaron 3 cepas con elevada resistencia a la acción bactericida del suero, cuyos títulos de SBA diferían en 4 ó más diluciones respecto a los obtenidos para la cepa control, siendo uno de estos tres aislados, resistente a todos los sueros estudiados. Además, estos resultados se confirmaron utilizando suero humano como fuente de complemento, ya que se ha sugerido que el uso de complemento de conejo induce títulos bactericidas algo mayores en comparación con los obtenidos con complemento humano (Santos et al., 2001; Granoff, 2009), lo que demostró que el fenómeno de resistencia encontrado en las cepas del estudio, era independiente de la fuente de complemento utilizada. Los tres aislados con fenotipo C:2a:P1.5, en la actualidad

uno de los fenotipos más frecuentes asociado con EM producida por el serogrupo C (Fazio et al., 2009; Tapsall, 2009), pertenecían al ST-11 CC. Este complejo clonal se ha dispersado por todo el mundo desde que emergiera por primera vez en Canadá en la década de los 80 (Whalen et al., 1995; Traore et al., 2006) y actualmente es uno de los principales responsables de EM por serogrupo C en el mundo (Harrison et al., 2009).

Con el fin de determinar las bases moleculares de la resistencia al suero en las cepas identificadas como resistentes, se comenzó analizando el grado de sialización del LPS y su posible implicación en la resistencia de los aislados. En *N. gonorrhoeae* se ha demostrado que la sialización del LPS contribuye al desarrollo de resistencia al suero ya que la bacteria recluta fH de una manera más eficiente si existe un alto grado de sialización del LPS, de modo que esta unión al fH mejora la ruptura e inactivación del componente C3b del complemento mediada por el fI (Ram et al., 1998). En el caso de *N. meningitidis*, se ha descrito que el microorganismo también es capaz de sializar su LPS (Mandrell et al., 1991) aunque existen discrepancias sobre si la presencia de ácido siálico en el LPS confiere al meningococo la capacidad para resistir a la acción bactericida del suero. Algunos estudios demostraron que la sialización del LPS en cepas de meningococo no modificaba la susceptibilidad de los aislados analizados a la SBA (Fox et al., 1989). Sin embargo, otros autores han encontrado correlación entre la aparición de resistencia al suero en aislados de serogrupo C y el grado de sialización de su LPS, de tal forma que los aislados clínicos que presentaban mayor sialización del LPS mostraban una mayor resistencia a la actividad lítica del complemento (Estabrook et al., 1997).

Cuando se analizó el grado de sialización del LPS mediante Western blot, no se obtuvieron diferencias claras entre los aislados sensibles y resistentes, lo que sugería que no había relación entre la sialización del LPS y la resistencia al suero. Para profundizar en el papel que podría conferir el LPS y el grado de sialización en la resistencia al suero, se crearon mutantes en el gen *lst* que codifica la enzima  $\alpha$ -2,3 LPS sialiltransferasa que es responsable de la unión del ácido siálico a los residuos de la galactosa terminal del LPS (Tsai et al.,

2002). En diferentes estudios previos que utilizaban aislados clínicos encapsulados de *N. meningitidis* serogrupo B y C, la inactivación del gen *Ist* permitió demostrar que los mutantes isogénicos eran ligeramente más sensibles a la SBA que las cepas salvajes, aunque únicamente se encontraba este fenotipo cuando se enfrentaban las cepas a concentraciones elevadas de suero (Vogel et al., 1997a, 1999). El análisis mediante ensayos de SBA de los mutantes en *Ist* no aportó ningún hallazgo significativo en relación a la sialización del LPS y la resistencia al suero. No se produjo ningún cambio en la supervivencia del mutante R3::*Ist* respecto a la cepa R3, manteniendo su alto grado de resistencia al suero en todos los sueros analizados. Esto demostró que la resistencia al suero de las cepas era un fenómeno independiente a la sialización del LPS y confirmaba los resultados obtenidos por Vogel y colaboradores, demostrando que la sialización del LPS es un fenómeno de menor importancia para la resistencia al suero en meningococo (Vogel et al., 1999). El hecho de que nuestros resultados difieran de los obtenidos por otros autores en los que sí se encontró una correlación entre la sialización del LPS y la resistencia al suero (Estabrook et al., 1997), podría deberse a que en dicho estudio se analizaron cepas procedentes de portadores asintomáticos y de pacientes con EM estudiando el grado de sialización en ambos tipos de aislados, mientras que en nuestro caso todas las cepas seleccionadas pertenecían a pacientes con EM. Un posible mecanismo por el que los aislados de portadores son más sensibles al suero podría deberse a que el LPS sializado funcione mejor que el LPS no sializado para proteger sitios vulnerables en la superficie bacteriana del ataque del complemento. Estos sitios podrían no estar presentes o tan accesibles en los aislados invasivos resistentes al suero (Vogel et al., 1999). Recientemente se ha descrito la posibilidad de que determinados aislados de meningococo, para adaptarse a cambios medioambientales, generan hipermutaciones basadas en cambios de variación de fase que afectan a la expresión del gen *IgtG*, de modo que puede añadir una glucosa o una molécula de fosfoetanolamina al LPS afectando a la lisis mediada por anticuerpos específicos (Bayliss et al., 2008). En nuestro caso, el hecho de que los mutantes en *Ist* no sufrieran modificación en su

sensibilidad al suero, sugiere que en las cepas resistentes analizadas la presencia de posibles variaciones de fase no parece que fuera la responsable de la resistencia, aunque no se descarta que pudiera afectar de algún modo al grado de resistencia observado entre las diferentes cepas.

El siguiente paso para caracterizar el posible mecanismo responsable de la resistencia al suero, consistió en comprobar si la presencia de grupos O-acetilo en el polisacárido capsular, podría afectar al nivel de resistencia de las cepas a la SBA. Este fenómeno es relativamente frecuente en meningococo, ya que se estima que alrededor del 80% de los aislados de serogrupo C e Y están acetilados, mientras que sólo el 8% de los aislados de serogrupo W135 presentan cápsulas O-acetiladas (Borrow et al., 2000). Estos grupos O-acetilo se acoplan a la cápsula gracias a la acción de acetiltransferasas codificadas por el gen *oatC* en el serogrupo C (Claus et al., 2004).

Los resultados obtenidos al amplificar y secuenciar el gen *oatC*, que contiene los tractos poliT y poliA que controlan la acetilación a través de variaciones de fase (Claus et al., 2004), confirmaron que todos los aislados analizados expresaban el gen responsable de la acetilación capsular. Aunque todas las cepas contenían el gen *oatC*, se evaluó si podían existir diferencias en cuanto al grado de acetilación entre las cepas sensibles y resistentes, mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los aislados sensibles y resistentes estudiados, lo que sugería que el nivel de resistencia no dependía de cambios en la acetilación del polisacárido capsular. A pesar de que todos los aislados caracterizados expresaron el gen *oatC* y los polisacáridos capsulares mostraron niveles similares de acetilación, cabía la posibilidad de que hubiera diferencias entre los aislados resistentes y sensibles en relación a la interacción de sus grupos O-acetilo con componentes de la respuesta inmune y de este modo pudieran afectar a su susceptibilidad al suero. En este sentido, se ha demostrado que la O-acetilación puede afectar a la lisis mediada por la activación de la vía alternativa del complemento (Varki and Kornfeld, 1980) y además, maximiza la resistencia en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* a la opsonización y lisis

mediada por anticuerpos específicos presentes en el suero de pacientes con fibrosis quística (Pier et al., 2001). En *N. meningitidis*, aunque la O-acetilación del polisacárido capsular se conoce desde hace décadas, el significado biológico con respecto a su eficacia biológica o a los procesos de patogénesis se desconoce. Por ello, para definir el papel de la O-acetilación en el comportamiento de las cepas resistentes, se construyeron mutantes en el gen *oatC* y se realizaron ensayos de SBA con sueros inmunes. La inactivación del gen *oatC* en la cepa R3 no modificó su nivel de resistencia frente a todos los sueros analizados, ni tampoco en la cepa S3 que conservó su sensibilidad a los sueros inmunes, lo que excluía a la acetilación del polisacárido capsular como la causa de la diferencia en sensibilidad al suero entre las cepas sensibles y resistentes. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios en los que, utilizando mutantes que carecían de actividad acetiltransferasa como en nuestro caso, la mutación no afectó a la resistencia al suero en aislados de *Legionella pneumophila* (Luck et al., 2001). La presencia de grupos O-acetilo afecta a la antigenicidad e inmunogenicidad de los polisacáridos capsulares como se ha demostrado para *Staphylococcus aureus* (Fattom et al., 1998). Actualmente, existen comercializadas dos tipos de vacunas conjugadas frente al serogrupo C, una compuesta por polisacáridos O-acetilados y otra por polisacáridos desacetilados. Se ha sugerido que la vacuna compuesta por polisacárido desacetilado es más inmunógena y podría proporcionar mejor protección frente a la EM por serogrupo C que la forma acetilada (Michon et al., 2000; Richmond et al., 2001). Esto contrasta con otros microorganismos como *E. coli*, donde los polisacáridos capsulares O-acetilados son más inmunogénicos que los polisacáridos desacetilados (Orskov et al., 1979). Otros autores han mostrado que la O-acetilación de la cápsula en *S. aureus* es más proclive a proteger al microorganismo de determinados mecanismos de defensa inmune que los aislados que presentan polisacáridos capsulares desacetilados (Bhasin et al., 1998). Los hallazgos obtenidos en nuestro estudio demostraron que la acetilación del polisacárido capsular no fue la responsable del fenotipo resistente de las cepas, por lo que, aunque en otros microorganismos pueda ser un factor que

contribuye de forma significativa a la inmunogenicidad y patogénesis, en los aislados de meningococo estudiados no afectó a la resistencia al suero y por tanto tampoco a la mayor capacidad patogénica de las cepas analizadas.

Aunque los resultados obtenidos no relacionaban la acetilación del polisacárido capsular con la resistencia de las cepas, se planteó la posibilidad de que la cápsula de algún modo, podía estar relacionada con la mayor resistencia de los aislados al ser ésta el principal factor de virulencia del meningococo, cuya expresión es indispensable para la patogénesis del microorganismo (Vogel and Frosch, 1999). Aunque es un fenómeno poco frecuente, se han dado casos de enfermedad producida por aislados de *N. meningitidis* que carecen por completo de los genes implicados en la producción de la cápsula (Claus et al., 2002), asociado principalmente a casos producidos en pacientes inmunocomprometidos (Vogel et al., 2004). Este fenómeno también se ha observado en pacientes sanos aunque en este caso se trata de un evento extremadamente infrecuente (Hoang et al., 2005).

Se inactivó el gen *siaD*, que codifica la polisialiltransferasa necesaria para la polimerización del polisacárido capsular, con el fin de evaluar mediante ensayos de SBA la sensibilidad de las cepas a diferentes sueros inmunes. Como cabía esperar, la sensibilidad del mutante  $S3\Delta siaD$  no se modificó por la pérdida de la cápsula, manteniendo su fenotipo sensible. Sin embargo, la sensibilidad al suero del mutante  $R3\Delta siaD$  sufrió una variación muy acentuada, pasando de un título de SBA de  $<8$  a títulos protectores en todos los sueros analizados, obteniendo de este modo un patrón de sensibilidad muy similar al observado en las cepas sensibles, lo que demostraba que la expresión de la cápsula en las cepas resistentes era fundamental para su comportamiento frente a sueros inmunes. La presencia de cápsula es un mecanismo esencial para la virulencia del microorganismo, ya que evade la opsonofagocitosis durante la diseminación del mismo (Vogel et al., 1997b; Kahler et al., 1998). En nuestro estudio, aunque tanto los aislados sensibles como resistentes presentaban cápsula, la inactivación de la misma en el aislado resistente R3 permitió que la cepa se convirtiera en sensible. Según esto, las cepas resistentes podrían albergar algún

tipo de modificación genética en el operón capsular *cps*, que podría estar implicada en su resistencia a la acción bactericida del suero. Con el fin de evaluar esta hipótesis, se planteó transferir genéticamente el fenotipo resistente desde la cepa R3 a una de las cepas sensibles (S3). Al analizar la sensibilidad al suero de los transformantes obtenidos se demostró que alguno de ellos se convirtió en resistente, lo que efectivamente confirmaba que el fenotipo de resistencia podía transferirse de unas cepas a otras. Para intentar identificar algún cambio o modificación en el *cps* que pudieran estar relacionados con la resistencia, se amplificó el operón capsular en el aislado resistente R3 y en dos de las cepas sensibles. Se observó que la cepa R3 presentaba un fragmento de ADN adicional, con un tamaño aproximado de 800 pb, localizado en la RIG comprendida entre los genes *siaA* y *ctrA*. Estudios posteriores mostraron que esta región polimórfica estaba presente en las todas cepas resistentes, incluyendo los transformantes resistentes originados a partir de la transferencia genética entre las cepa R3 y S3, lo que sugería que este cambio en el operón capsular podría relacionarse con la diferencia entre las cepas sensibles y resistentes en cuanto a sensibilidad al suero. Este fragmento se identificó en todas las cepas resistentes como la secuencia de inserción denominada IS1301, localizada en el mismo punto de la RIG *siaA-ctrA* y en la misma orientación en todas ellas. El análisis de las cepas sensibles demostró que aunque ninguna de ellas presentaba la IS1301 en la RIG *siaA-ctrA*, ésta si que estaba presente en otra localización del genoma de todos los aislados sensibles analizados, lo que sugería que la inserción de este elemento móvil entre estos dos genes esenciales para el correcto funcionamiento de la cápsula, podría ser el responsable de la resistencia a la SBA. Para confirmarlo, la transferencia de la RIG *siaA-ctrA* que contenía la secuencia IS1301 a una cepa sensible fue suficiente para convertirla en resistente (generándose el aislado denominado SR) a la actividad bactericida de anticuerpos dirigidos frente a la cápsula, frente a la proteína PorA y frente al microorganismo completo. Además se demostró que la presencia del marcador de resistencia a kanamicina introducido en la secuencia IS1301 (con el fin de seleccionar a los transformantes) no afectaba a la

resistencia de la cepa R3, por lo que era la presencia de la secuencia IS1301 en la RIG *siaA-ctrA* la responsable directa del fenotipo resistente.

Existen numerosos ejemplos de bacterias que evitan la destrucción mediada por el sistema inmune a partir de variaciones antigénicas o mediante la expresión reducida de determinados antígenos en su superficie. Estos mecanismos han sido descritos para PorA que es el principal inmunógeno en las vacunas de OMVs frente a meningococo (Bjune et al., 1991). De hecho, un simple cambio de aminoácido en esta proteína puede afectar a la actividad de los anticuerpos bactericidas (Suker et al., 1994; Martin et al., 2000), mientras que modificaciones en la longitud de los tractos homopoliméricos en el promotor del gen *porA* o en secuencias codificantes puede afectar a la transcripción o la traducción, respectivamente (van der Ende et al., 2000).

Para analizar si la presencia de la secuencia de inserción IS1301 podía producir cambios antigénicos en la superficie bacteriana, se inmunizaron ratones con una cepa sensible y con los aislados resistentes R3 y SR. Se realizaron ensayos de SBA enfrentando estas cepas a los diferentes sueros de ratón obtenidos, confirmando que la resistencia de los aislados resistentes no estaba causada por cambios o alteraciones en la naturaleza de los antígenos expresados por estas cepas. Otra posibilidad era que la secuencia IS1301 pudiera inducir alguna modificación en la estructura del polisacárido capsular en las cepas resistentes y de este modo afectar a su sensibilidad al suero. Por ello, se analizó la estructura del mismo mediante espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN en una de las cepas sensibles y en el aislado R3. Se obtuvo un espectro similar en ambas cepas, con enlaces idénticos entre los monómeros de ácido siálico y presentando el mismo grado y distribución de residuos O-acetilados lo que descartaba que la presencia de la secuencia IS1301 en la RIG *siaA-ctrA* estuviera relacionada con cambios que pudieran afectar a la estructura antigénica del polisacárido capsular. Se ha visto que la presencia de la secuencia IS1301 en el gen *oatWY* produce cambios en el estado de acetilación del polisacárido capsular en los serogrupos W e Y (Claus et al., 2004). Aunque la presencia de esta secuencia de inserción pudiera afectar de algún modo al gen

implicado en la acetilación del polisacárido capsular, nuestros resultados previos (utilizando mutantes en el mismo) demostraron que no afectaba a la sensibilidad al suero de las cepas.

Se han descrito varios mecanismos de variación de fase que controlan la expresión de la cápsula en *N. meningitidis*. Uno de ellos se basa en la inactivación reversible del gen *siaA* mediante la inserción y posterior escisión de la secuencia de inserción IS1301 (Hammerschmidt et al., 1996a). También se ha observado que la presencia de cambios reversibles en el número de residuos de citosinas en la región 5' del gen *siaD* produce variaciones de fase que afectan a la expresión del polisacárido capsular (Hammerschmidt et al., 1996b). De hecho, el análisis de los mecanismos de control y regulación en la expresión de la cápsula a nivel transcripcional, demuestra que éstos modulan la expresión de la misma durante los diferentes estados de la infección, con mayores niveles de expresión de los genes que componen los operones *sia* y *ctr* (Tzeng et al., 2001; Von Loewenich et al., 2001). A pesar de que la inserción de la secuencia IS1301 en la RIG *siaA-ctrA* de las cepas resistentes no produjo modificaciones antigénicas en el polisacárido capsular, se planteó la posibilidad de que pudiera afectar a la transcripción de estos dos genes involucrados en la biosíntesis y transporte del polisacárido capsular y, en consecuencia, modificar la cantidad de cápsula producida.

El análisis de la expresión de los genes *siaA* y *ctrA* mediante qRT-PCR demostró que los niveles de transcripción de ambos fueron significativamente superiores en los aislados resistentes, lo que indicaba que las cepas resistentes podrían expresar mayores niveles de polisacárido capsular en su superficie. Para confirmar si el aumento en la transcripción de los genes *siaA* y *ctrA* en las cepas resistentes, mediado por la presencia de IS1301 en su RIG, originaba mayor producción de polisacárido capsular, se midió la cantidad de cápsula expresada en la superficie de los diferentes aislados. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo al utilizar un anticuerpo específico frente al polisacárido capsular, mostraron que la fluorescencia generada en las cepas resistentes era notablemente más elevada que en las cepas sensibles, lo que sugería que la

cantidad de cápsula expresada por los aislados resistentes era relativamente mayor que en las cepas sensibles. Para confirmarlo se utilizó la técnica de criotEM con el fin de visualizar la bacteria sin necesidad de seccionar o utilizar metodologías de contraste para mejorar la sensibilidad de la técnica (Chiu, 1986) y se empleó tinción de ferritina para teñir la bacteria mediante la atracción de las cargas con las cápsulas aniónicas (Anderson, 1998). La especificidad de este método se demostró por la falta de marcaje o tinción del mutante en cápsula. Las cepas resistentes analizadas produjeron y expresaron más cápsula en comparación con la cepa sensible control, lo que era consistente con los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. Por todo ello, parecía evidente que en las cepas identificadas como resistentes, la presencia de IS1301 en la RIG *siaA-ctrA* incrementaba la biosíntesis y el transporte del polisacárido capsular, lo que generaba un incremento en la cantidad de antígeno diana en la superficie bacteriana.

Esta es la primera ocasión en la que se ha confirmado que la secuencia de inserción IS1301 participa en el incremento de la expresión génica en *N. meningitidis*, aunque se ha descrito anteriormente en *Actinobacillus actinomycescomitans*, demostrando que la presencia de IS1301 incrementó la expresión del operón *ltx*, que regula una leucotoxina del microorganismo implicada en virulencia al inducir apoptosis de células fagocitarias (He et al., 1999; Mitchell et al., 2003). Por el contrario, este elemento móvil sí que se ha asociado en numerosas ocasiones con inactivación reversible de determinados genes de meningococo, entre los que se incluyen *porA*, *siaA* y *oatC* (Hammerschmidt et al., 1996a; Newcombe et al., 1998; Claus et al., 2004). La inactivación del gen *porA* fue ocasionada por la integración de una única copia de la secuencia IS1301 en este gen en un aislado clínico de *N. meningitidis* asociado a un fatal desenlace (Newcombe et al., 1998). La confirmación posterior de la presencia de esta secuencia inactivando el gen *porA* en otros aislados de meningococo del complejo clonal ET-15 asociados también a mortalidad durante una onda epidémica (Jelfs et al., 2000b), confirma nuestros hallazgos y demuestra que la integración de la secuencia IS1301 en el genoma de

meningococo no es un hecho aislado sino genérico y que en función del gen o del punto donde se inserte puede modificar características fenotípicas de la cepa incrementando posiblemente la virulencia del microorganismo. De hecho esta secuencia no se ha descrito en cepas no patógenas de *Neisseria spp* mientras que es frecuente en *N. meningitidis* serogrupo B, C, W135 e Y, lo que sugiere que podría estar asociada a patogenicidad (Hilse et al., 1996). Se ha descrito que aislados pertenecientes al ST-11 CC (ET-15) que contienen entre 15 y 20 copias de la secuencia IS1301 han causado brotes de EM asociados a casos con elevadas tasas de letalidad (Tribe et al., 2002; Tsang et al., 2004; Elias and Vogel, 2007). Aunque se desconoce si estas cepas son más virulentas de forma inherente, la secuencia IS1301 podría tener un impacto significativo en la patogénesis de las infecciones producidas por el complejo ET-15 mediante regulación de la expresión de determinados factores de virulencia, entre los se incluye la cápsula. De hecho, la presencia de la secuencia IS1301 en el gen *siaA*, confirió variaciones de fase alterando de forma reversible la expresión de la cápsula y la sialización del LPS, lo que se ha sugerido que podría incrementar la virulencia de meningococo al facilitar el paso a través de la barrera hematoencefálica en determinadas fases de la patogénesis del microorganismo (Hammerschmidt et al., 1996a). En nuestro trabajo, los mecanismos por los que la secuencia IS1301 incrementaba los niveles de ARNm de los genes *siaA* y *ctrA* parecen ser complejos ya que ambos genes se encuentran transcritos de forma divergente por promotores que solapan (Swartley et al., 1996; Von Loewenich et al., 2001).

La cápsula es el antígeno reconocido específicamente por los anticuerpos generados tras la inmunización con la vacuna conjugada. Debido a ello, ante una mayor expresión de cápsula, cabría esperar que se produjera un aumento en la sensibilidad de las cepas al ser reconocidas de forma más eficiente por los anticuerpos bactericidas presentes en el suero, y de este modo ser destruidas más eficazmente por la inmunidad mediada por el sistema de complemento. Sin embargo, la mayor cantidad de cápsula expresada por las cepas que presentaban la secuencia IS1301 en la RIG *siaA-ctrA* podría explicar

el fenotipo resistente de las mismas ya que la cápsula es uno de los principales factores de virulencia del meningococo, al evadir el reconocimiento por el componente clave del complemento C3b (Vogel et al., 1997b). En este sentido, aunque la cápsula no es la única diana de la respuesta inmune, es un mecanismo muy importante por el cual la bacteria se protege frente a la lisis mediada por el sistema del complemento. Nuestros resultados mostraron que en las cepas resistentes, la cápsula más que estar distribuida de forma uniforme por toda la superficie bacteriana, se encontraba formando ocasionalmente agregados extracelulares irregulares que podrían desviar la unión de los anticuerpos bactericidas presentes en el suero así como evadir factores del complemento de la membrana bacteriana externa.

Para profundizar en esta hipótesis, se estudió la interacción de las cepas sensibles y resistentes con el sistema del complemento. Cuando se analizó el depósito del componente C3b en la superficie bacteriana, se observó que las cepas resistentes mostraban menores niveles de C3b unido en comparación con la cepa sensible. Por lo tanto, parecía que la mayor presencia de cápsula en la envoltura bacteriana de las cepas que mostraban resistencia al suero, servía al microorganismo para evitar ser reconocido de forma eficaz por el sistema del complemento. Estos resultados demostraron que las cepas que presentaban la secuencia de inserción en la RIG *siaA-ctrA* evadían el depósito de C3b al incrementar la cantidad de polisacárido capsular en la superficie bacteriana, lo que confirmaba estudios anteriores en los que utilizando mutantes sin cápsula, el depósito de C3b era notablemente mayor que en las cepas de meningococo con cápsula (Vogel et al., 1997b). El componente C3b puede originarse por la activación de alguna de las tres vías del complemento como son la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas (Walport, 2001). En *N. meningitidis*, aunque tanto la vía clásica como la vía alternativa inducen la formación del componente C3b de forma sinérgica en suero humano (Sjoholm et al., 1991), la activación de la vía alternativa es más relevante. Además, la vía de las lectinas acelera la activación del complemento incrementando de este modo la lisis mediada por los anticuerpos bactericidas del suero (Jack et al., 2001).

Para caracterizar qué vía era inhibida de una forma más eficiente por las cepas resistentes, se utilizaron inhibidores específicos de las vías del complemento (Jongorius et al., 2007). Los resultados obtenidos demostraron que las cepas resistentes evadían de un modo muy eficaz la activación del complemento mediada por la vía alternativa. En ausencia de la vía clásica y de la vía de las lectinas, los niveles reducidos de C3b depositado en las cepas resistentes estaban en consonancia con su mayor resistencia asociada con mayor expresión de polisacárido capsular, ya que se ha observado que la cápsula participa en la inhibición de la vía alternativa no sólo en bacterias gramnegativas (Pluschke et al., 1983; Jarvis and Vedros, 1987) sino también en grampositivas (Marques et al., 1992; Hyams et al., 2009). La principal función de la vía alternativa es amplificar la activación del complemento que se ha iniciado por la activación de la vía clásica y la vía de lectinas, aunque también se activa de forma espontánea a partir de los niveles basales de C3b que se están originando a partir del C3 presente en la circulación (Walport, 2001). De este modo, la inhibición de la vía alternativa provocada por el incremento de cápsula en las cepas resistentes, reduciría la activación del complemento independientemente del estímulo inicial. En el caso del meningococo, la formación e inserción del MAC en la superficie bacteriana presenta mayor importancia que la fagocitosis para producir la lisis del microorganismo (Figueroa et al., 1993). Así, un incremento en la expresión de la cápsula podría también inhibir de forma directa la inserción del MAC dentro de la membrana externa, previniendo de este modo la lisis bacteriana (Joiner et al., 1985; Walport, 2001). El análisis posterior de la activación del MAC en la superficie de las diferentes cepas del estudio, demostró que los aislados resistentes presentaban una mayor capacidad para evadir el ensamblaje del MAC en la superficie bacteriana, lo que demostraba que la mayor expresión de cápsula favorecía la evasión del MAC en los aislados de meningococo resistentes a la SBA. De hecho, se ha sugerido que uno de los principales mecanismos por los que *N. meningitidis* podría evadir la inserción del MAC es mediante la expresión del polisacárido capsular (Ram et al., 1999). Además, al igual que ocurría con el depósito de C3b, se observó que esta mayor capacidad

para escapar al reconocimiento y ensamblaje del MAC en los aislados resistentes era consecuencia directa de la reducida activación de la vía alternativa del complemento en estas cepas.

La elevada expresión de polisacárido capsular en los aislados resistentes, debido a la presencia de la secuencia IS1301 en la RIG *siaA-ctrA*, permitió a las cepas evitar ser reconocidas de forma eficaz por el sistema del complemento al interferir con la activación la vía alternativa. Esto se tradujo en un menor reconocimiento y anclaje del MAC en la superficie bacteriana reduciendo así la lisis mediada por el complemento en presencia de anticuerpos bactericidas del suero. Sin embargo, existen otros mecanismos que podrían también contribuir a la inhibición del complemento entre los que se incluye una elevada capacidad para cambiar y modificar el antígeno capsular por las cepas resistentes, alejando de esta manera los anticuerpos bactericidas presentes en el suero. Una mayor expresión de cápsula podría ocultar ciertos antígenos subcapsulares lo que contribuiría a promover resistencia al evitar la lisis producida por los anticuerpos originados frente al microorganismo completo y frente a la proteína PorA, que es un potente inmunógeno inductor de anticuerpos bactericidas (Jansen et al., 2000).

Cuando se analizó la sensibilidad de las cepas a la actividad bactericida de los anticuerpos que reconocen PorA, se observó que estos anticuerpos reconocían de forma significativa a los aislados sensibles induciendo su lisis, mientras que los aislados resistentes evitaron la actividad bactericida de los mismos. Una posible causa para esta mayor resistencia a la lisis mediada por PorA en las cepas resistentes, podría ser que en estos aislados hubiera menor expresión de PorA, lo que explicaría su comportamiento frente a los anticuerpos que reconocen PorA. Sin embargo, todas las cepas sensibles y resistentes analizadas mostraron niveles de expresión similares de PorA. Estos resultados podían sugerir que el aumento en la expresión de cápsula en las cepas resistentes impidió el reconocimiento de otros antígenos de meningococo evitando la lisis mediada por los anticuerpos dirigidos frente a PorA. Esto concuerda con estudios realizados en los que se demostró que determinados

aislados invasivos de *Streptococcus pyogenes* son capaces de regular la expresión de cápsula, incrementando los niveles de polisacárido capsular en la superficie bacteriana, con el fin de evitar ser reconocidos por anticuerpos dirigidos frente a antígenos bacterianos parcialmente expuestos en la superficie del microorganismo y escapar de este modo a la opsonofagocitosis del huésped (Dinkla et al., 2007).

La posible implicación clínica y epidemiológica de los hallazgos obtenidos en el presente trabajo parece evidente y podría tener repercusión en el desarrollo de futuras vacunas. En nuestro estudio, utilizando una colección de 109 aislados clínicos de serogrupo C procedentes de pacientes con enfermedad invasiva en España, se identificaron tres cepas que presentaban resistencia incrementada a la lisis bacteriana mediada por el sistema del complemento, que es uno de los mecanismos inmunológicos más importantes frente a *N. meningitidis*. Las cepas contenían idéntica modificación genética en el *cps*, presentando la secuencia de inserción IS1301 en el mismo punto y orientación de la RGI entre los operones necesarios para la biosíntesis y el transporte del polisacárido capsular. Los serogrupos de *N. meningitidis* que expresan cápsulas que contienen ácido siálico presentan una significativa amenaza en salud pública (Jodar et al., 2002). En la actualidad aún no existen vacunas comercializadas eficaces frente a *N. meningitidis* serogrupo B, que es uno de los principales serogrupos causantes de enfermedad en Europa, América y Oceanía (Harrison et al., 2009). Las cepas de serogrupo W135 han producido numerosos brotes en África subsahariana y son responsables de la diseminación global de la infección desde que ocurrió en año 2000 en el peregrinaje a La Meca (Taha et al., 2000), mientras que las infecciones por serogrupo Y han emergido como un importante problema en América del Norte y más recientemente en otros países de América del Sur (McEllistrem et al., 2004; Abad et al., 2009). La RGI *siaA-ctrA* está presente en todos los serogrupos de meningococo que producen cápsulas que contienen ácido siálico (Claus et al., 2004). De este modo, las cepas que pertenecen a estos serogrupos podrían convertirse en aislados hiperproductores

de cápsula tras la adquisición de la IS1301 en la RGI *siaA-ctrA* mediante procesos de transformación.

Los métodos de tipificación empleados actualmente no analizan de manera rutinaria la sensibilidad a los anticuerpos bactericidas, ya que ésta es una metodología laboriosa y difícil de estandarizar entre diferentes laboratorios (Jolley et al., 2007). Sin embargo, esta información es crucial para entender el posible rango de eficacia de las vacunas así como para caracterizar mecanismos de virulencia utilizados por las cepas de meningococo y para identificar las bases moleculares de la emergencia de determinados clones patogénicos. La presencia de la secuencia IS1301 en la RGI *siaA-ctrA* puede ser detectada mediante PCR y podría ser utilizada como una prueba para evaluar la aparición de cepas con resistencia incrementada.

Con el fin de caracterizar la implicación que podría suponer la presencia de la secuencia de inserción en cepas asociadas a casos de fallos vacunales, se analizaron aislados clínicos procedentes de individuos inmunizados con vacuna conjugada frente a serogrupo C y con enfermedad invasiva, para identificar mediante PCR la presencia de la secuencia IS1301 en la RIG *siaA-ctrA*. Únicamente dos de los aislados estudiados mostraron tener la secuencia IS1301 en dicha localización, lo que confirmaba que aunque no es un fenómeno frecuente, tampoco es un hecho aislado y sugiere que la presencia de IS1301 en la RIG *siaA-ctrA* podría ser una amenaza en la eficacia de las vacunas actuales disponibles frente a serogrupo C. Además, recientemente se ha descrito que todos los aislados clínicos del complejo ST-269 CC, responsable de una tercera parte de los casos de EM por serogrupo B en Reino Unido, poseen la secuencia IS1301 de modo que esto podría poner en riesgo el éxito de futuras vacunas frente a este serogrupo (Lucidarme et al., 2009). Según se demuestra en nuestro estudio, la presencia de la secuencia IS1301 en la RIG *siaA-ctrA* parece conferir una marcada ventaja a las cepas para sobrevivir en presencia de suero inmune. Teniendo en cuenta que la presencia de esta secuencia de inserción en el genoma de *N. meningitidis* es relativamente frecuente, puede haber diferentes razones por las que esta modificación no se encuentra más diseminada entre las

cepas circulantes de meningococo. Podría ocurrir que las cepas puedan ser eliminadas de forma muy eficaz por otros mecanismos inmunológicos como por ejemplo la opsonofagocitosis (Welsch and Granoff, 2004). Por otra parte, la secuencia IS1301 puede haberse integrado en la RIG de manera reciente, por lo que este cambio podría no haber tenido la oportunidad de haberse expandido a otros aislados de meningococo. Además, aunque una mayor expresión de cápsula pueda ser beneficiosa para la supervivencia en presencia de anticuerpos bactericidas del suero, es posible que haya un fenómeno de compensación en el que la inserción de la secuencia IS1301 en la RGI *siaA-ctrA* sea perjudicial para la bacteria en otros estadios de su ciclo vital. Por último, se sabe que la presencia de cápsula participa en la inhibición de la adhesión a las células epiteliales humanas (Stephens et al., 1993; Virji et al., 1995), por ello, la mayor expresión de cápsula en las cepas resistentes les conferiría menor capacidad de adhesión, proceso clave durante la fase de colonización, lo que podría proporcionar suficiente presión selectiva para prevenir la diseminación de estas cepas.

Existen numerosos mecanismos que pueden generar diversidad genética entre los aislados de *N. meningitidis*. A diferencia de otros cambios, la inserción de la secuencia IS1301 en la RIG entre *siaA-ctrA* es un único cambio genético que puede originar cepas que posean un mecanismo genérico para evitar la lisis mediada por el complemento, independientemente de la naturaleza del antígeno diana. Esto se demostró por la mayor resistencia de las cepas frente a la destrucción mediada por anticuerpos de sueros humanos obtenidos de individuos vacunados, así como por anticuerpos de sueros murinos obtenidos frente a bacteria completa y por el anticuerpo anti PorA. Sin embargo, no está claro si cepas con esta modificación genética comprometerán la eficacia de las vacunas meningocócicas. Las vacunas polisacáridicas han estado disponibles frente a aislados de meningococo serogrupo C durante más de 30 años sin ningún tipo de informe hasta la actualidad que documente la emergencia de cepas resistentes. A pesar de ello, sería necesario realizar estudios globales para evaluar la distribución y diseminación de aislados que presenten la secuencia

IS1301 en la RIG *siaA-ctrA* durante el estado de portador asintomático así como en los casos de enfermedad diagnosticada. También sería de gran utilidad este tipo de estudios antes y después de la introducción de programas preventivos de inmunización frente a *N. meningitidis*.

## **CONCLUSIONES**



1. La identificación de aislados clínicos de *N. meningitidis* serogrupo C resistentes a la actividad bactericida de sueros inmunes demuestra que este fenómeno está presente en esta especie y puede evolucionar entre cepas circulantes.
2. Cambios en el grado de sialización del LPS y en el estado de acetilación del polisacárido capsular no se relacionan con la diferencia en sensibilidad al suero de las cepas.
3. La presencia de la secuencia de inserción IS1301, localizada en la RIG entre los operones *sia* y *ctr* de todos los aislados resistentes, origina una mayor expresión de la cápsula en todos ellos y es la responsable del fenotipo resistente.
4. La mayor producción de polisacárido capsular en las cepas resistentes, evade la opsonización por el componente C3b al inhibir de forma eficiente la activación de la vía alternativa del complemento, reduciendo de forma eficaz la inserción del complejo de ataque a la membrana y evitando de este modo, la lisis mediada por el sistema del complemento.
5. El aumento en la expresión de la cápsula en los aislados resistentes impide la acción de anticuerpos bactericidas dirigidos frente a otros antígenos subcapsulares, como la proteína PorA, incrementando la eficiencia de la resistencia en estas cepas
6. La identificación del mecanismo de resistencia permite el diseño y desarrollo de un método basado en PCR para la detección de este tipo de aislados en grandes estudios poblacionales.

7. Si bien la dispersión de este fenómeno puede en un futuro comprometer la eficacia de intervenciones con vacuna en *N. meningitidis*, su prevalencia actual es baja y no explica por si solo la aparición de fallos vacunales.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abad, R., Enriquez, R., Salcedo, C., and Vazquez, J.A. (2008). PorB2/3 protein hybrid in *Neisseria meningitidis*. *Emerg Infect Dis* 14, 688-689.
- Abad, R., Agudelo, C.I., Brandileone, M.C., Chanto, G., Gabastou, J.M., Hormazabal, J.C., MC, O.G., Maldonado, A., Moreno, J., Muros-Le Rouzic, E., et al. (2009). Molecular characterization of invasive serogroup Y *Neisseria meningitidis* strains isolated in the Latin America region. *J Infect* 59, 104-114.
- Aguilera, J.F., Perrocheau, A., Meffre, C., and Hahne, S. (2002). Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000. *Emerg Infect Dis* 8, 761-767.
- Aho, E.L., Dempsey, J.A., Hobbs, M.M., Klapper, D.G., and Cannon, J.G. (1991). Characterization of the opa (class 5) gene family of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 5, 1429-1437.
- Ala'Aldeen, D.A., Davies, H.A., and Borriello, S.P. (1994). Vaccine potential of meningococcal FrpB: studies on surface exposure and functional attributes of common epitopes. *Vaccine* 12, 535-541.
- Ala'Aldeen, D.A., and Borriello, S.P. (1996). The meningococcal transferrin-binding proteins 1 and 2 are both surface exposed and generate bactericidal antibodies capable of killing homologous and heterologous strains. *Vaccine* 14, 49-53.
- Ala'Aldeen, D.A., Neal, K.R., Ait-Tahar, K., Nguyen-Van-Tam, J.S., English, A., Falla, T.J., Hawkey, P.M., and Slack, R.C. (2000). Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol* 38, 2311-2316.
- Alcala, B., Salcedo, C., Arreaza, L., Berron, S., De La Fuente, L., and Vazquez, J.A. (2002). The epidemic wave of meningococcal disease in Spain in 1996-1997: probably a consequence of strain displacement. *J Med Microbiol* 51, 1102-1106.
- Anderson, K.L. (1998). Cationized ferritin as a stain for electron microscopic observation of bacterial ultrastructure. *Biotech Histochem* 73, 278-288.
- Antignac, A., Alonso, J.M., and Taha, M.K. (2001a). Nonculture prediction of *Neisseria meningitidis* susceptibility to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 3625-3628.
- Antignac, A., Kriz, P., Tzanakaki, G., Alonso, J.M., and Taha, M.K. (2001b). Polymorphism of *Neisseria meningitidis* penA gene associated with reduced susceptibility to penicillin. *J Antimicrob Chemother* 47, 285-296.

Apicella, M.A. (2005). *Neisseria meningitidis*: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds Principles and Practice of Infectious Diseases Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone 6th ed, chap 208.

Arreaza, L., and Vazquez, J.A. (2000). High frequency of reduced susceptibility to penicillin in serogroup 29E meningococci. Clin Microbiol Infect 6, 229-230.

Artenstein, M.S., Lamson, T.H., and Evans, J.R. (1967). Attempted prophylaxis against meningococcal infection using intramuscular penicillin. Military Med 132, 1009-1011.

Artenstein, M.S., Gold, R., Zimmerly, J.G., Wyle, F.A., Schneider, H., and Harkins, C. (1970). Prevention of meningococcal disease by group C polysaccharide vaccine. New Engl J Med 282, 417-420.

Ashton, F.E., and Caugant, D.A. (2001). The panmictic nature of *Neisseria meningitidis* serogroup B during a period of endemic disease in Canada. Can J Microbiol 47, 283-289.

Balmer, P., Borrow, R., and Miller, E. (2002). Impact of meningococcal C conjugate vaccine in the UK. J Medical Microbiol 51, 717-722.

Bayliss, C.D., Hoe, J.C., Makepeace, K., Martin, P., Hood, D.W., and Moxon, E.R. (2008). *Neisseria meningitidis* escape from the bactericidal activity of a monoclonal antibody is mediated by phase variation of IgtG and enhanced by a mutator phenotype. Infec Immun 76, 5038-5048.

Berron, S., De La Fuente, L., Martin, E., and Vazquez, J.A. (1998). Increasing incidence of meningococcal disease in Spain associated with a new variant of serogroup C. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17, 85-89.

Bhasin, N., Albus, A., Michon, F., Livolsi, P.J., Park, J.S., and Lee, J.C. (1998). Identification of a gene essential for O-acetylation of the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide. Mol Microbiol 27, 9-21.

Bhattacharjee, A.K., Jennings, H.J., Kenny, C.P., Martin, A., and Smith, I.C. (1975). Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. J Biol Chem 250, 1926-1932.

Bhattacharjee, A.K., Jennings, H.J., Kenny, C.P., Martin, A., and Smith, I.C. (1976). Structural determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W-135, and BO1. Can J Biochem 54, 1-8.

- Bilukha, O.O., and Rosenstein, N. (2005). Prevention and control of meningococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 54, 1-21.
- Bishof, N.A., Welch, T.R., and Beischel, L.S. (1990). C4B deficiency: a risk factor for bacteremia with encapsulated organisms. *J Infect Dis* 62, 248-250.
- Bjune, G., Hoiby, E.A., Gronnesby, J.K., Arnesen, O., Fredriksen, J.H., Halstensen, A., Holten, E., Lindbak, A.K., Nokleby, H., Rosenqvist, E., *et al.* (1991). Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 338, 1093-1096.
- Blom, A.M., Kask, L., and Dahlback, B. (2003). CP1-4 of the C4b-binding protein alpha-chain are required for factor I mediated cleavage of complement factor C3b. *Mol Immunol* 39, 547-56.
- Borrow, R., Claus, H., Guiver, M., Smart, L., Jones, D.M., Kaczmarek, E.B., Frosch, M., and Fox, A.J. (1997). Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (siaD) PCR ELISA. *Epidemiol Infect* 118, 111-117.
- Borrow, R., Longworth, E., Gray, S.J., and Kaczmarek, E.B. (2000). Prevalence of de-O-acetylated serogroup C meningococci before the introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the United Kingdom. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28, 189-191.
- Borrow, R., Southern, J., Andrews, N., Peake, N., Rahim, R., Acuna, M., Martin, S., Miller, E., and Kaczmarek, E. (2001). Comparison of antibody kinetics following meningococcal serogroup C conjugate vaccine between healthy adults previously vaccinated with meningococcal A/C polysaccharide vaccine and vaccine-naive controls. *Vaccine* 19, 3043-3050.
- Borrow, R., Balmer, P., and Miller, E. (2005). Meningococcal surrogates of protection--serum bactericidal antibody activity. *Vaccine* 23, 2222-2227.
- Botha, P. (1988). Penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in southern Africa. *Lancet* 1, 54.
- Boulton, I.C., and Gray-Owen, S.D. (2002). Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nature Immunol* 3, 229-236.
- Brandtzaeg, P., Sandset, P.M., Joo, G.B., Ovstebo, R., Abildgaard, U., Kierulf, P. (1989). The quantitative association of plasma endotoxin, antithrombin, protein C, extrinsic pathway inhibitor and fibrinopeptide A in systemic meningococcal disease. *Thromb Res* 55, 459-470.

- Brandtzaeg, P., Ovstebo, R., and Kierulf, P. (1992). Compartmentalization of lipopolysaccharide production correlates with clinical presentation in meningococcal disease. *J Infect Dis* 166, 650-652.
- Brandtzaeg, P. (2003). Host response to *Neisseria meningitidis* lacking lipopolysaccharides. *Expert Rev Anti-infect Ther* 1, 589-596.
- Brown, J.W., and Condit, P.K. (1965). Meningococcal Infections. Fort Ord and California. *Calif Med* 102, 171-180.
- Bruge, J., Bouveret-Le Cam, N., Danve, B., Rougon, G., and Schulz, D. (2004). Clinical evaluation of a group B meningococcal N-propionylated polysaccharide conjugate vaccine in adult, male volunteers. *Vaccine* 22, 1087-1096.
- Bundle, D.R., Jennings, H.J., and Kenny, C.P. (1974a). Studies on the group-specific polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup X and an improved procedure for its isolation. *J Biol Chem* 249, 4797-4801.
- Bundle, D.R., Smith, I.C., and Jennings, H.J. (1974b). Determination of the structure and conformation of bacterial polysaccharides by carbon 13 nuclear magnetic resonance. Studies on the group-specific antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups A and X. *J Biol Chem* 249, 2275-2281.
- Bygraves, J.A., and Maiden, M.C. (1992). Analysis of the clonal relationships between strains of *Neisseria meningitidis* by pulsed field gel electrophoresis. *J Gen Microbiol* 138, 523-531.
- Cartwright, K.A., Stuart, J.M., Jones, D.M., and Noah, N.D. (1987). The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect* 99, 591-601.
- Cartwright, K.A., Hunt, D., and Fox, A. (1995). Chemoprophylaxis fails to prevent a second case of meningococcal disease in a day nursery. *Commun Dis Report* 5, R199.
- Cartwright, K., Morris, R., Rumke, H., Fox, A., Borrow, R., Begg, N., Richmond, P., and Poolman, J. (1999). Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. *Vaccine* 17, 2612-2619.
- Caugant, D.A., Froholm, L.O., Bovre, K., Holten, E., Frasch, C.E., Mocca, L.F., Zollinger, W.D., and Selander, R.K. (1987a). Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. *Ant van Leeuwenhoek* 53, 389-394.

- Caugant, D.A., Mocca, L.F., Frasch, C.E., Froholm, L.O., Zollinger, W.D., and Selander, R.K. (1987b). Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol* 169, 2781-2792.
- Caugant, D.A., Zollinger, W.D., Mocca, L.F., Frasch, C.E., Whittam, T.S., Froholm, L.O., and Selander, R.K. (1987c). Genetic relationships and clonal population structure of serotype 2 strains of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 55, 1503-1512.
- Caugant, D.A., Hoiby, E.A., Magnus, P., Scheel, O., Hoel, T., Bjune, G., Wedege, E., Eng, J., and Froholm, L.O. (1994). Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol* 32, 323-330.
- Caugant, D.A. (1998). Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* 106, 505-525.
- Caugant, D.A., Tzanakaki, G., and Kriz, P. (2007). Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiol Rev* 31, 52-63.
- Chin, R. F., Neville, B.G., Peckham, C., Bedford, H., Wade, A., Scott, R. C., (2006). Incidence, cause, and short-term outcome of convulsive status epilepticus in childhood: prospective population-based study. *Lancet* 368, 222-229.
- Claus, H., Maiden, M.C., Maag, R., Frosch, M., and Vogel, U. (2002). Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiol* 148, 1813-1819.
- Claus, H., Borrow, R., Achtman, M., Morelli, G., Kantelberg, C., Longworth, E., Frosch, M., and Vogel, U. (2004). Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. *Mol Microbiol* 51, 227-239.
- Claus, H., Maiden, M.C., Wilson, D.J., McCarthy, N.D., Jolley, K.A., Urkin, R., Hessler, F., Frosch, M., and Vogel, U. (2005). Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis*, 191, 1263-1271,
- Comanducci, M., Bambini, S., Brunelli, B., Adu-Bobie, J., Arico, B., Capocchi, B., Giuliani, M.M., Massignani, V., Santini, L., Savino, S., *et al.* (2002). NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 195, 1445-1454.
- Costantino, P., Viti, S., Podda, A., Velmonte, M.A., Nencioni, L., and Rappuoli, R. (1992). Development and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C. *Vaccine* 10, 691-698.

- Chiu, W. (1986). Electron microscopy of frozen, hydrated biological specimens. *Ann Rev Bioph Bioph Chem* 15, 237-257.
- D'Antuono, A., Andalo, F., and Varotti, C. (1999). Acute urethritis due to *Neisseria meningitidis*. *Sex Trans Infect* 75, 362.
- Danzig, L. (2004). Meningococcal vaccines. *Ped Infect Dis J* 23, S285-292.
- de Moraes, J.C., Perkins, B.A., Camargo, M.C., Hidalgo, N.T., Barbosa, H.A., Sacchi, C.T., Landgraf, I.M., Gattas, V.L., Vasconcelos Hde, G., et al. (1992). Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 340, 1074-1078.
- Deghmane, A.E., Petit, S., Topilko, A., Pereira, Y., Giorgini, D., Larribe, M., and Taha, M.K. (2000). Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *EMBO J* 19, 1068-1078.
- Deghmane, A.E., Giorgini, D., Larribe, M., Alonso, J.M., and Taha, M.K. (2002). Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by *CrgA* regulatory protein. *Mol Microbiol* 43, 1555-1564.
- Devoe, I.W., and Gilchrist, J.E. (1974). Ultrastructure of pili and annular structures on the cell wall surface of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 10, 872-876.
- Dillon, J.R., Pauze, M., and Yeung, K.H. (1983). Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from the gonococcus to *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 1, 779-781.
- Dinkla, K., Sastalla, I., Godehardt, A.W., Janze, N., Chhatwal, G.S., Rohde, M., and Medina, E. (2007). Upregulation of capsule enables *Streptococcus pyogenes* to evade immune recognition by antigen-specific antibodies directed to the G-related alpha2-macroglobulin-binding protein GRAB located on the bacterial surface. *Microb Infect* 9, 922-931.
- DiScipio, R.G., Chakravarti, D.N., Muller-Eberhard, H.J., and Fey, G.H. (1988). The structure of human complement component C7 and the C5b-7 complex. *The J Biol Chem* 263, 549-560.
- Djibo, S., Nicolas, P., Alonso, J.M., Djibo, A., Couret, D., Riou, J.Y., and Chippaux, J.P. (2003). Outbreaks of serogroup X meningococcal meningitis in Niger 1995-2000. *Trop Med Int Health* 8, 1118-1123.

- Dunbar, S.A., Eason, R.A., Musher, D.M., and Clarridge, J.E., 3rd (1998). Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis. *J Clin Microbiol* 36, 1617-1620.
- Dworzack, D.L., Sanders, C.C., Horowitz, E.A., Allais, J.M., Sookpranee, M., Sanders, W.E., Jr., and Ferraro, F.M. (1988). Evaluation of single-dose ciprofloxacin in the eradication of *Neisseria meningitidis* from nasopharyngeal carriers. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 1740-1741.
- Dyett, K.H., and Martin, D.R. (2006). Clonal analysis of the serogroup B meningococci causing New Zealand's epidemic. *Epidemiol Infect* 134, 377-383.
- Edwards, U., and Frosch, M. (1992). Sequence and functional analysis of the cloned *Neisseria meningitidis* CMP-NeuNAc synthetase. *FEMS Microbiol Letters* 75, 161-166.
- Edwards, U., Muller, A., Hammerschmidt, S., Gerardy-Schahn, R., and Frosch, M. (1994). Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol Microbiol* 14, 141-149.
- Efron, A.M., Sorhouet, C., Salcedo, C., Abad, R., Regueira, M., and Vazquez, J.A. (2009). W135 invasive meningococcal strains spreading in South America: significant increase in incidence rate in Argentina. *J Clin Microbiol* 47, 1979-1980.
- Elias, J., and Vogel, U. (2007). IS1301 fingerprint analysis of *Neisseria meningitidis* strains belonging to the ET-15 clone. *J Clin Microbiol* 45, 159-167.
- Enriquez, R., Abad, R., Salcedo, C., Perez, S., and Vazquez, J.A. (2008). Fluoroquinolone resistance in *Neisseria meningitidis* in Spain. *J Antimicrob Chemother* 61, 286-290.
- Estabrook, M.M., Griffiss, J.M., and Jarvis, G.A. (1997). Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. *Infect Immun* 65, 4436-4444.
- Evans, J.R., Artenstein, M.S., and Hunter, D.H. (1968). Prevalence of meningococcal serogroups and description of three new groups. *Am J Epidemiol* 87, 643-646.
- Exley, R.M., Shaw, J., Mowe, E., Sun, Y.H., West, N.P., Williamson, M., Botto, M., Smith, H., and Tang, C.M. (2005). Available carbon source influences the resistance of *Neisseria meningitidis* against complement. *J Exp Med* 201, 1637-1645.

- Fairley, C.K., Begg, N., Borrow, R., Fox, A.J., Jones, D.M., and Cartwright, K. (1996). Conjugate meningococcal serogroup A and C vaccine: reactogenicity and immunogenicity in United Kingdom infants. *J Infect Dis* 174, 1360-1363.
- Fattom, A.I., Sarwar, J., Basham, L., Ennifar, S., and Naso, R. (1998). Antigenic determinants of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharide vaccines. *Infect Immun* 66, 4588-4592.
- Fazio, C., Neri, A., Tonino, S., Carannante, A., Caporali, M.G., Salmaso, S., Mastrantonio, P., and Stefanelli, P. (2009). Characterisation of *Neisseria meningitidis* C strains causing two clusters in the north of Italy in 2007 and 2008. *Euro Surveill* 14.
- Feavers, I.M., Suker, J., McKenna, A.J., Heath, A.B., and Maiden, M.C. (1992). Molecular analysis of the serotyping antigens of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 60, 3620-3629.
- Feavers, I.M., and Pizza, M. (2009). Meningococcal protein antigens and vaccines. *Vaccine* 27 Suppl 2, B42-50.
- Ferreiros, C.M., Criado, M.T., Pintor, M., and Ferron, L. (1991). Analysis of the molecular mass heterogeneity of the transferrin receptor in *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria*. *FEMS Microbiol Letters* 67, 123-136.
- Figueroa, J.E., and Densen, P. (1991). Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 4, 359-395.
- Figueroa, J., Andreoni, J., and Densen, P. (1993). Complement deficiency states and meningococcal disease. *Immunol Res* 12, 295-311.
- Fijen, C., van den Bogaard, R., Schipper, M., Mannens, M., Schlesinger, M., Nordin, G., Dankert, J., *et al.* (1999). Properdin deficiency: molecular basis and disease association. *Mol Immunol* 36, 863-867.
- Fijen, C.A., Bredius, R.G., Kuijper, E.J., Out, T.A., De Haas, M., De Wit, A.P., Daha, M.R., De Winkel, J.G. (2000). The role of Fc $\gamma$  receptor polymorphisms and C3 in the immune defence against *Neisseria meningitidis* in complement-deficient individuals. *Clin Exp Immunol* 120, 338-45.
- Finne, J., Leinonen, M., and Makela, P.H. (1983). Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 2, 355-357.

- Finne, J., Bitter-Suermann, D., Goridis, C., and Finne, U. (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.
- Flexner, S. (1913). The Results of the Serum Treatment in Thirteen Hundred Cases of Epidemic Meningitis. *J Exp Med* 17, 553-576.
- Fontanals, D., Pineda, V., Pons, I., and Rojo, J.C. (1989). Penicillin-resistant beta-lactamase producing *Neisseria meningitidis* in Spain. *Eur J Clin microbiol Infect Dis* 8, 90-91.
- Fox, A.J., Jones, D.M., Scotland, S.M., Rowe, B., Smith, A., Brown, M.R., Fitzgeorge, R.G., Baskerville, A., Parsons, N.J., Cole, J.A., *et al.* (1989). Serum killing of meningococci and several other gram-negative bacterial species is not decreased by incubating them with cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid. *Microb Pathog* 7, 317-318.
- Frosch, M., Weisgerber, C., and Meyer, T.F. (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 USA* 86, 1669-1673.
- Frosch, M., Schultz, E., Glenn-Calvo, E., and Meyer, T.F. (1990). Generation of capsule-deficient *Neisseria meningitidis* strains by homologous recombination. *Mol Microbiol* 4, 1215-1218.
- Frosch, M., Edwards, U., Bousset, K., Krausse, B., and Weisgerber, C. (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.
- Frosch, M., Muller, D., Bousset, K., and Muller, A. (1992). Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect Immun* 60, 798-803.
- Frosch, M., and Muller, A. (1993). Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 8, 483-493.
- Frosch, M. (2006). The Population Biology of *Neisseria meningitidis*: Implication for Meningococcal Disease, Epidemiology and Control. *Handbook of Meningococcal Disease Infection Biology, Vaccination, Clinical Management*, 17-32.

- Fujita, T., Matsushita, M., and Endo, Y. (2004). The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* 198, 185-202.
- Galimand, M., Gerbaund, G., Guibourdenche, M., Riou, J.Y., and Courvalin, P. (1998). High-level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med* 339, 868-874.
- Garred, P., Larsen, F., Madsen, H.O., and Koch, C. (2003). Mannose-binding lectin deficiency--revisited. *Mol Immunol* 40, 73-84.
- Gasque, P. (2004). Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 41, 1089-1098.
- Geoffroy, M.C., Floquet, S., Metais, A., Nassif, X., and Pelicic, V. (2003). Large-scale analysis of the meningococcus genome by gene disruption: resistance to complement mediated lysis. *Genome Res* 13, 391-398.
- Ghiran, I., Barbashov, S.F., Klickstein, L.B., Tas, S.W., Jensenius, J.C., and Nicholson-Weller, A. (2000). Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med* 192, 1797-1808.
- Giuliani, M.M., Adu-Bobie, J., Comanducci, M., Arico, B., Savino, S., Santini, L., Brunelli, B., Bambini, S., Biolchi, A., Capecchi, B., *et al.* (2006). A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10834-10839.
- Glover, J. (1920). Observations of the meningococcus carrier rate and their application to the prevention of cerebro-spinal fever. *Spec Rep Ser Med Res Council* 50, 133-165.
- Gold, R., Goldschneider, I., Lepow, M.L., Draper, T.F., and Randolph, M. (1978). Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. *J Infect Dis* 137, 112-121.
- Goldacre, M.J., Roberts, S.E., and Yeates, D. (2003). Case fatality rates for meningococcal disease in an English population, 1963-98: database study. *BMJ* 327, 596-597.
- Goldschneider, I., Gotschlich, E.C., and Artenstein, M.S. (1969a). Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 129, 1307-1326.
- Goldschneider, I., Gotschlich, E.C., and Artenstein, M.S. (1969b). Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J Exp Med* 129, 1327-1348.

- Gorter, A.D., Oostrik, J., van der Ley, P., Hiemstra, P.S., Dankert, J., and van Alphen, L. (2003). Involvement of lipooligosaccharides of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis* in defensin-enhanced bacterial adherence to epithelial cells. *Microb Pathog* 34, 121-130.
- Gotschlich, E.C., Goldschneider, I., and Artenstein, M.S. (1969). Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. *J Exp Med* 129, 1385-1395.
- Granoff, D.M., Suarez, B.K., Pandey, J.P., and Shackelford, P.G. (1988). Genes associated with the G2m(23) immunoglobulin allotype regulate the IgG subclass responses to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine. *J Infect Dis* 157, 1142-1149.
- Granoff, D.M., Maslanka, S.E., Carlone, G.M., Plikaytis, B.D., Santos, G.F., Mokatri, A., and Raff, H.V. (1998). A modified enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to meningococcal C polysaccharide that correlate with bactericidal responses. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 479-485.
- Granoff, D.M. (2009). Relative importance of complement-mediated bactericidal and opsonic activity for protection against meningococcal disease. *Vaccine* 27 Suppl 2, B117-125.
- Greenwood, M. (1917). The Outbreak of Cerebrospinal Fever at Salisbury in 1914-15. *Proc Royal Soc Med* 10, 44-60.
- Greenwood, B.M., and Wali, S.S. (1980). Control of meningococcal infection in the African meningitis belt by selective vaccination. *Lancet* 1, 729-732.
- Griffioen, A.W., Franklin, S.W., Zegers, B.J., and Rijkers, G.T. (1993). Expression and functional characteristics of the complement receptor type 2 on adult and neonatal B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 69, 1-8.
- Haines, A.L., and Lepow, I.H. (1964). Studies on Human C'1-Esterase. II. Function of Purified C'1-Esterase in the Human Complement System. *J Immunol* 92, 468-478.
- Hammerschmidt, S., Birkholz, C., Zahringer, U., Robertson, B.D., van Putten, J., Ebeling, O., and Frosch, M. (1994). Contribution of genes from the capsule gene complex (cps) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 11, 885-896.
- Hammerschmidt, S., Hilse, R., van Putten, J.P., Gerardy-Schahn, R., Unkmeir, A., and Frosch, M. (1996a). Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J* 15, 192-198.

- Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., van Putten, J., Zollinger, W.D., Gerardy-Schahn, R., and Frosch, M. (1996b). Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* 20, 1211-1220.
- Hansman, D., and Ashton, F. (1994). Serotype and serosubtype distribution of strains of *Neisseria meningitidis* isolated in South Australia and the Northern Territory of Australia: 1971-1989. *Pathology* 26, 318-320.
- Haralambous, E., Dolly S.O., Hibberd, M.L., Litt, D., Udalova, I.A., O'dwyer, C., Langford, P.R., Simon Kroll, J., and Levin, M. (2006). Factor H, a regulator of complement activity, is a major determinant of meningococcal disease susceptibility in UK Caucasian patients. *Scand J Infect Dis* 38, 764-771.
- Harrison, L.H., Pass, M.A., Mendelsohn, A.B., Egri, M., Rosenstein, N.E., Bustamante, A., Razeq, J., and Roche, J.C. (2001). Invasive meningococcal disease in adolescents and young adults. *JAMA* 286, 694-699.
- Harrison, L.H. (2006). Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. *Clin Microbiol Rev* 19, 142-164.
- Harrison, L.H., Trotter, C.L., and Ramsay, M.E. (2009). Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine* 27 *Suppl* 2, B51-63.
- Harwood, C.A., Stevens, J.C., Orton, D., Bull, R.C., Paige, D., Lessing, M.P., Mortimer, P.S. *et al.* (2005). Chronic meningococcaemia: a forgotten meningococcal disease. *Br J Dermatol* 153, 669-671.
- He, T., Nishihara, T., Demuth, D.R., and Ishikawa, I. (1999). A novel insertion sequence increases the expression of leukotoxicity in *Actinobacillus actinomycescomitans* clinical isolates. *J Periodont* 70, 1261-1268.
- Hibberd, M.L., Sumiya, M., Summefield, J.A., Booy, R., and Levin, M. (1999). Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet* 353, 1049-1053.
- Hilse, R., Hammerschmidt, S., Bautsch, W., and Frosch, M. (1996). Site-specific insertion of IS1301 and distribution in *Neisseria meningitidis* strains. *J Bacteriol* 178, 2527-2532.

- Hoang, L.M., Thomas, E., Tyler, S., Pollard, A.J., Stephens, G., Gustafson, L., McNabb, A., Pocock, I., Tsang, R., and Tan, R. (2005). Rapid and fatal meningococcal disease due to a strain of *Neisseria meningitidis* containing the capsule null locus. *Clin Infect Dis* 40, 38-42.
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K., and Brown, J.S. (2009). The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun* 78, 716-725.
- Idanpaan-Heikkila, I., Hoiby, E.A., Chattopadhyay, P., Airaksinen, U., Michaelsen, T.M., and Wedege, E. (1995). Antibodies to meningococcal class 1 outer-membrane protein and its variable regions in patients with systemic meningococcal disease. *J Med Microbiol* 43, 335-343.
- Jack, D.L., Jarvis, G.A., Booth, C.L., Turner, M.W., and Klein, N.J. (2001). Mannose-binding lectin accelerates complement activation and increases serum killing of *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Infect Dis* 184, 836-845.
- Janda, W., and Knapp, J. (2003). *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis*. Manual of clinical microbiology, 8<sup>a</sup> ed ASM Press, Washington DC, 585-608.
- Jansen, C., Kuipers, B., van der Biezen, J., de Cock, H., van der Ley, P., and Tommassen, J. (2000). Immunogenicity of in vitro folded outer membrane protein PorA of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27, 227-233.
- Jarva, H., Ram, S., Vogel, U., Blom, A.M., and Meri, S. (2005). Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 174, 6299-6307.
- Jarvis, G.A., and Vedros, N.A. (1987). Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. *Infect Immun* 55, 174-180.
- Jelfs, J., Munro, R., Ashto, F.E., and Caugant, D.A. (2000a). Genetic characterization of a new variant within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis* associated with outbreaks in various parts of the world. *Epidemiol Infect* 125, 285-298.
- Jelfs, J., Munro, R., Wedege, E., and Caugant, D.A. (2000b). Sequence variation in the porA gene of a clone of *Neisseria meningitidis* during epidemic spread. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 390-395.
- Jennings, H.J., Bhattacharjee, A.K., Kenne, L., Kenny, C.P., and Calver, G. (1980). The R-type lipopolysaccharides of *Neisseria meningitidis*. *Can J Biochem* 58, 128-136.

- Jennings, H.J., Roy, R., and Gamian, A. (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.
- Jennings, H.J., Gamian, A., and Ashton, F.E. (1987). N-propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique epitope on group B *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 165, 1207-1211.
- Jennings, M.P., Hood, D.W., Peak, I.R., Virji, M., and Moxon E. R. (1995). Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 18, 729-740.
- Jennings, M.P., Srikhanta, Y.N., Moxon, E.R., Kramer, M., Poolman, J.T., Kuipers, B., and van der Ley, P. (1999). The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 145, 3013-3021.
- Jochmann, G. (1906). Versuche zur Serodiagnostik und Serotherapie der epidermischen Genickstarre. *Dtsch Med Wschr* 32, 788-793.
- Jodar, L., Feavers, I.M., Salisbury, D., and Granoff, D.M. (2002). Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet* 359, 1499-1508.
- Jodar, L., LaForce, F.M., Ceccarini, C., Aguado, T., and Granoff, D.M. (2003). Meningococcal conjugate vaccine for Africa: a model for development of new vaccines for the poorest countries. *Lancet* 361, 1902-1904.
- Johansson, L., Rytönen, A., Bergman, P., Albiger, B., Kallström, H., Hokfelt, T., Agerberth, B., Cattaneo, R., and Jonsson, A.B. (2003). CD46 in meningococcal disease. *Science* 301, 373-375.
- Johansson, L., Rytönen, A., Wan, H., Bergman, P., Plant, L., Agerberth, B., Hokfelt, T., and Jonsson, A.B. (2005). Human-like immune responses in CD46 transgenic mice. *J Immunol* 175, 433-440.
- Joiner, K.A., Schmetz, M.A., Sanders, M.E., Murray, T.G., Hammer, C.H., Dourmashkin, R., and Frank, M.M. (1985). Multimeric complement component C9 is necessary for killing of *Escherichia coli* J5 by terminal attack complex C5b-9. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4808-4812.
- Jolley, K.A., Kalmusova, J., Feil, E.J., Gupta, S., Musilek, M., Kriz, P., and Maiden, M.C. (2000). Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol* 38, 4492-4498.

- Jolley, K.A., Appleby, L., Wright, J.C., Christodoulides, M., and Heckels, J.E. (2001). Immunization with recombinant Opc outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of sequence variation and levels of expression on the bactericidal immune response against meningococci. *Infect Immun* 69, 3809-3816.
- Jolley, K.A., Brehony, C., and Maiden, M.C. (2007). Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev* 31, 89-96.
- Jones, D.M., Borrow, R., Fox, A.J., Gray, S., Cartwright, K.A., and Poolman, J.T. (1992). The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* 13, 219-224.
- Jones, C., and Lemercinier, X. (2002). Use and validation of NMR assays for the identity and O-acetyl content of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine manufacture. *J Pharm Biomed Anal* 30, 1233-1247.
- Jongerijs, I., Kohl, J., Pandey, M.K., Ruyken, M., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A., and Rooijackers, S.H. (2007). Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med* 204, 2461-2471.
- Judson, F.N., and Ehret, J.M. (1984). Single-dose ceftriaxone to eradicate pharyngeal *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 2, 1462-1463.
- Kahler, C.M., Carlson, R.W., Rahman, M.M., Martin, L.E., and Stephens, D.S. (1996a). Inner core biosynthesis of lipooligosaccharide (LOS) in *Neisseria meningitidis* serogroup B: identification and role in LOS assembly of the alpha1,2 N-acetylglucosamine transferase (RfaK). *J Bacteriol* 178, 1265-1273.
- Kahler, C.M., Carlson, R.W., Rahman, M.M., Martin, L.E., and Stephens, D.S. (1996b). Two glycosyltransferase genes, lgtF and rfaK, constitute the lipooligosaccharide ice (inner core extension) biosynthesis operon of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 178, 6677-6684.
- Kahler, C.M., Martin, L.E., Shih, G.C., Rahman, M.M., Carlson, R.W., and Stephens, D.S. (1998). The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum. *Infect Immun* 66, 5939-5947.
- Kallstrom, H., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., and Jonsson, A.B. (1997). Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 25, 639-647.

- Kiefer, F. (1896). Zur diferencial Diagnose des Erregers der epidemischen Cerebro spinalmeningitis und der Gonorrhoea. *Ver Klin Wochenschr* 33, 628.
- Klickstein, L.B., Barbashov, S.F., Liu, T., Jack, R.M., and Nicholson-Weller, A. (1997). Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* 7, 345-355.
- Lansac, N., Picard, F.J., Menard, C., Boissinot, M., Ouellette, M., Roy, P.H., and Bergeron, M.G. (2000). Novel genus-specific PCR-based assays for rapid identification of *Neisseria* species and *Neisseria meningitidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 443-451.
- Lapeyssonnie, L. (1963). [Cerebrospinal Meningitis in Africa.]. *Bull World Health Org* 28, SUPPL:1-114.
- Larrauri, A., Cano, R., Garcia, M., and Mateo, S. (2005). Impact and effectiveness of meningococcal C conjugate vaccine following its introduction in Spain. *Vaccine* 23, 4097-4100.
- Law, S.K., Lichtenberg, N.A., and Levine, R.P. (1979). Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces. *J Immunol* 123, 1388-1394.
- Lemercinier, X., and Jones, C. (1996). Full <sup>1</sup>H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. *Carbohydr Res* 296, 83-96.
- Lesinski, G.B., and Westerink, M.A. (2001). Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J Microbiol Meth* 47, 135-149.
- Li, Y., Zhang, Q., Winterbotham, M., Mowe, E., Gorringer, A., and Tang, C.M. (2006). Immunization with live *Neisseria lactamica* protects mice against meningococcal challenge and can elicit serum bactericidal antibodies. *Infect Immun* 74, 6348-6355.
- Longworth, E., Borrow, R., Goldblatt, D., Balmer, P., Dawson, M., Andrews, N., Miller, E., and Cartwright, K. (2002a). Avidity maturation following vaccination with a meningococcal recombinant hexavalent PorA OMV vaccine in UK infants. *Vaccine* 20, 2592-2596.
- Longworth, E., Fernsten, P., Mininni, T.L., Vogel, U., Claus, H., Gray, S., Kaczmarek, E., and Borrow, R. (2002b). O-Acetylation status of the capsular polysaccharides of serogroup Y and W135 meningococci isolated in the UK. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32, 119-123.

- Loos, M. (1982a). The classical complement pathway: mechanism of activation of the first component by antigen-antibody complexes. *Prog Allergy* 30, 135-192.
- Loos, M. (1982b). Antibody-independent activation of C1, the first component of complement. *Ann Immunol* 133, 165-179.
- Lucidarme, J., Comanducci, M., Findlow, J., Gray, S.J., Kaczmarek, E.B., Guiver, M., Kugelberg, E., Vallely, P.J., Oster, P., Pizza, M., *et al.* (2009). Characterization of fHbp, nhba (gna2132), nadA, porA, sequence type (ST), and genomic presence of IS1301 in group B meningococcal ST269 clonal complex isolates from England and Wales. *J Clin Microbiol* 47, 3577-3585.
- Luck, P.C., Freier, T., Steudel, C., Knirel, Y.A., Luneberg, E., Zahringer, U., and Helbig, J.H. (2001). A point mutation in the active site of Legionella pneumophila O-acetyltransferase results in modified lipopolysaccharide but does not influence virulence. *Int J Med Microbiol* 291, 345-352.
- Mackinnon, F.G., Borrow, R., Gorrings, A.R., Fox, A.J., Jones, D.M., and Robinson, A. (1993). Demonstration of lipooligosaccharide immunotype and capsule as virulence factors for *Neisseria meningitidis* using an infant mouse intranasal infection model. *Microb Pathog* 15, 359-366.
- Madico, G., Welsch, J.A., Lewis, L.A., McNaughton, A., Perlman, D.H., Costello, C.E., Ngampasutadol, J., Vogel, U., Granoff, D.M., and Ram, S. (2006). The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance. *J Immunol* 177, 501-510.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., *et al.* (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3140-3145.
- Maiden, M.C., and Stuart, J.M. (2002). Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. *Lancet* 359, 1829-1831.
- Maiden, M.C., and Caugant, D.A. (2006). The Population Biology of *Neisseria meningitidis*: Implication for Meningococcal Disease, Epidemiology and Control. *Handbook of Meningococcal Disease Infection Biology, Vaccination, Clinical Management*, 17-32.

- Mandrell, R.E., Griffiss, J.M., and Marcher, B.A. (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.
- Mandrell, R.E., Kim, J.J., John, C.M., Gibson, B.W., Sugai, J.V., Apicella, M.A., Griffiss, J.M., and Yamasaki, R. (1991). Endogenous sialylation of the lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 173, 2823-2832.
- Marchiafava, E., and Celli, A. (1884). Spra i micrococchi Della meningite cerebrospinale epidemica. *Gazz degli Ospedali* 5, 59.
- Marques, M.B., Kasper, D.L., Pangburn, M.K., and Wessels, M.R. (1992). Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect Immun* 60, 3986-3993.
- Martin, D., Cadieux, N., Hamel, J., and Brodeur, B.R. (1997). Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. *J Exp Med* 185, 1173-1183.
- Martin, S.L., Borrow, R., van der Ley, P., Dawson, M., Fox, A.J., and Cartwright, K.A. (2000). Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 18, 2476-2481.
- Maslanka, S.E., Tappero, J.W., Plikaytis, B.D., Brumberg, R.S., Dykes, J.K., Gheesling, L.L., Donaldson, K.B., Schuchat, A., Pullman, J., Jones, M., *et al.* (1998). Age-dependent *Neisseria meningitidis* serogroup C class-specific antibody concentrations and bactericidal titers in sera from young children from Montana immunized with a licensed polysaccharide vaccine. *Infect Immun* 66, 2453-2459.
- Matshushita, M., and Fujita, T. (1992). Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 176, 1497-1502.
- McEllistrem, M.C., Kolano, J.A., Pass, M.A., Caugant, D.A., Mendelsohn, A.B., Fonseca Pacheco, A.G., Shutt, K.A., Razeq, J., and Harrison, L.H. (2004). Correlating epidemiologic trends with the genotypes causing meningococcal disease, Maryland. *Emerg Infect Dis* 10, 451-456.

- McGuinness, B.T., Lambden, P.R., and Heckels, J.E. (1993). Class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: epitope analysis of the antigenic diversity between strains, implications for subtype definition and molecular epidemiology. *Mol Microbiol* 7, 505-514.
- Michon, F., Huang, C.H., Farley, E.K., Hronowski, L., Di, J., and Fusco, P.C. (2000). Structure activity studies on group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines: effect of O-acetylation on the nature of the protective epitope. *Develop Biol* 103, 151-160.
- Minetti, C.A., Blake, M.S., and Remeta, D.P. (1998). Characterization of the structure, function, and conformational stability of PorB class 3 protein from *Neisseria meningitidis*. A porin with unusual physicochemical properties. *J Biol Chem* 273, 25329-25338.
- Mitchell, L.A., Ochnio, J.J., Glover, C., Lee, A.Y., Ho, M.K., and Bell, A. (1996). Analysis of meningococcal serogroup C-specific antibody levels in British Columbian children and adolescents. *J Infect Dis* 173, 1009-1013.
- Mitchell, C., Gao, L., and Demuth, D.R. (2003). Positive and negative cis-acting regulatory sequences control expression of leukotoxin in *Actinobacillus actinomycescomitans* 652. *Infect Immun* 71, 5640-5649.
- Moe, G.R., Zuno-Mitchell, P., Lee, S.S., Lucas, A.H., and Granoff, D.M. (2001). Functional activity of anti-Neisserial surface protein A monoclonal antibodies against strains of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Infect Immun* 69, 3762-3771.
- Molesworth, A.M., Cuevas, L.E., Connor, S.J., Morse, A.P., and Thomson, M.C. (2003). Environmental risk and meningitis epidemics in Africa. *Emerg Infect Dis* 9, 1287-1293.
- Moller, A.S., Bjerre, A., Brusletto, B., Joo, G.G., Brandtzaetg, P., Kierulf, P. (2005). Chemokine patterns in meningococcal disease. *J Infect Dis* 191, 768-775.
- Mongini, P.K., Stein, K.E., and Paul, W.E. (1981). T cell regulation of IgG subclass antibody production in response to T-independent antigens. *J Exp Med* 153, 1-12.
- Moxon, E.R., and Jansen, V.A. (2005). Phage variation: understanding the behaviour of an accidental pathogen. *Trends Microbiol* 13, 563-565.
- Mueller, J.E., Borrow, R., and Gessner, B.D. (2006). Meningococcal serogroup W135 in the African meningitis belt: epidemiology, immunity and vaccines. *Expert Rev Vaccines* 5, 319-336.

- Muller-Eberhard, H.J. (1988). Molecular organization and function of the complement system. *Ann Rev Biochem* 57, 321-347.
- Muller, E., and Apicella, M.A. (1988). T-cell modulation of the murine antibody response to *Neisseria meningitidis* group A capsular polysaccharide. *Infect Immun* 56, 259-266.
- Muller, A., Gunther, D., Dux, F., Naumann, M., Meyer, T.F., and Rudel, T. (1999). Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO J* 18, 339-352.
- Murphy, K.M., O'Donnell, K.A., Higgins, A.B., O'Neill, C., and Cafferkey, M.T. (2003). Irish strains of *Neisseria meningitidis*: characterisation using multilocus sequence typing. *Br J Biomed Sci* 60, 204-209.
- Nadel, S., and Kroll, J.S. (2007). Diagnosis and management of meningococcal disease: the need for centralized care. *FEMS Microbiol Rev* 31, 71-83.
- Nassif, X., Marceau, M., Pujol, C., Pron, B., Beretti, J.L., and Taha, M.K. (1997). Type-4 pili and meningococcal adhesiveness. *Gene* 192, 149-153.
- Newcombe, J., Cartwright, K., Dyer, S., and McFadden, J. (1998). Naturally occurring insertional inactivation of the *porA* gene of *Neisseria meningitidis* by integration of IS1301. *Mol Microbiol* 30, 453-454.
- Nicolas, P., Decousset, L., Riglet, V., Castelli, P., Stor, R., and Blanchet, G. (2001). Clonal expansion of sequence type (ST-)5 and emergence of ST-7 in serogroup A meningococci, Africa. *Emerg Infect Dis* 7, 849-854.
- Nonaka, M. (2001). Evolution of the complement system. *Curr Opin Immunol* 13, 69-73.
- Nordahl, E.A., Rydengard, V., Nyberg, P., Nitsche, D.P., Morgelin, M., Malmsten, M., Bjorck, L., and Schmidtchen, A. (2004). Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 16879-16884.
- O'Hallahan, J., Lennon, D., and Oster, P. (2004). The strategy to control New Zealand's epidemic of group B meningococcal disease. *Ped Infect Dis J* 23, S293-298.
- Olyhoek, A.J., Sarkari, J., Bopp, M., Morelli, G., and Achtman, M. (1991). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *opc*, the gene for an unusual class 5 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis* (meningococci/surface antigen). *Microb Pathog* 11, 249-257.

- Orskov, F., Orskov, I., Sutton, A., Schneerson, R., Lin, W., Egan, W., Hoff, G.E., and Robbins, J.B. (1979). Form variation in *Escherichia coli* K1: determined by O-acetylation of the capsular polysaccharide. *J Exp Med* 149, 669-685.
- Oster, P., Lennon, D., O'Hallahan, J., Mulholland, K., Reid, S., and Martin, D. (2005). MeNZB: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine* 23, 2191-2196.
- Pace, D., and Pollard, A.J. (2007). Meningococcal A, C, Y and W-135 polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Arch Dis Child* 92, 909-915.
- Packiam, M., Shell, D.M., Liu, S.V., Liu, Y.B., McGee, D.J., Srivastava, R., Seal, S., and Rest, R.F. (2006). Differential expression and transcriptional analysis of the alpha-2,3-sialyltransferase gene in pathogenic *Neisseria spp.* *Infect Immun* 74, 2637-2650.
- Pangburn, M.K., and Muller-Eberhard, H.J. (1983). Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of C3. *Ann New York Acad Sci* 421, 291-298.
- Parsons, N.J., Patel, P.V., Tan, E.L., Andrade, J.R., Nairn, C.A., Goldner, M., Cole, J.A., and Smith, H. (1988). Cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid and a low molecular weight factor from human blood cells induce lipopolysaccharide alteration in gonococci when conferring resistance to killing by human serum. *Microb Pathog* 5, 303-309.
- Peltola, H., Makela, H., Kayhty, H., Jousimies, H., Herva, E., Hallstrom, K., Sivonen, A., Renkonen, O.V., Pettay, O., Karanko, V., *et al.* (1977). Clinical efficacy of meningococcus group A capsular polysaccharide vaccine in children three months to five years of age. *N Engl J Med* 297, 686-691.
- Petering, H., Hammerschmidt, S., Frosch, M., van Putten, J.P., Ison, C.A., and Robertson, B.D. (1996). Genes associated with meningococcal capsule complex are also found in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 178, 3342-3345.
- Pier, G.B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M., and Ohman, D.E. (2001). Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* 69, 1895-1901.
- Pizza, M., Scarlato, V., Masignani, V., Giuliani, M.M., Arico, B., Comanducci, M., Jennings, G.T., Baldi, L., Bartolini, E., Capecchi, B., *et al.* (2000). Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287, 1816-1820.

- Plant, L., Sundqvist, J., Zughayer, S., Lovkvist, L., Stephens, D.S., and Jonsson, A.B. (2006). Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 74, 1360-1367.
- Plummer, F.A., Chubb, H., Simonsen, J.N., Bosire, M., Slaney, L., Maclean, I., Ndinya-Achola, J.O., Waiyaki, P., and Brunham, R.C. (1993). Antibody to Rmp (outer membrane protein 3) increases susceptibility to gonococcal infection. *J Clin Invest* 91, 339-343.
- Pluschke, G., Maiden, J., Achtman, M., and Levine, R.P. (1983). Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect Immun* 42, 907-913.
- Podack, E.R., and Tschopp, J. (1982). Polymerization of the ninth component of complement (C9): formation of poly(C9) with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 574-578.
- Pollabauer, E.M., Petermann, R., and Ehrlich, H.J. (2005). Group C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine: a meta-analysis of immunogenicity, safety and posology. *Human Vaccines* 1, 131-139.
- Pollard, A. J., and Sheifele, D. (2001). Meningococcal disease and vaccination in North America. *J Paediatr Child Health* 37, S20-27.
- Poolman, J.T., Kriz-Kuzemenska, P., Ashton, F., Bibb, W., Dankert, J., Demina, A., Froholm, L.O., Hassan-King, M., Jones, D.M., Lind, I., *et al.* (1995). Serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*: results of an international study comparing sensitivities and specificities of monoclonal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2, 69-72.
- Porritt, R.J., Mercer, J.L., and Munro, R. (2000). Detection and serogroup determination of *Neisseria meningitidis* in CSF by polymerase chain reaction (PCR). *Pathology* 32, 42-45.
- Prinz, T., and Tommassen, J. (2000). Association of iron-regulated outer membrane proteins of *Nisseria meningitidis* with the RmpM (class 4) protein. *FEMS Microbiol Lett* 183, 49-53.
- Pujol, C., Eugene, E., Marceau, M., and Nassif, X. (1999). The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 4017-4022.
- Racoosin, J.A., Whitney, C.G., Conover, C.S., and Diaz, P.S. (1998). Serogroup Y meningococcal disease in Chicago, 1991-1997. *JAMA* 280, 2094-2098.

- Ram, S., Sharma, A.K., Simpson, S.D., Gulati, S., McQuillen, D.P., Pangburn, M.K., and Rice, P.A. (1998). A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 187, 743-752.
- Ram, S., Mackinnon, F.G., Gulati, S., McQuillen, D.P., Vogel, U., Frosch, M., Elkins, C., Guttormsen, H.K., Wetzler, L.M., Oppermann, M., *et al.* (1999). The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol* 36, 915-928.
- Ram, S., Cullinane, M., Blom, A.M., Gulati, S., McQuillen, D.P., Monks, B.G., O'Connell, C., Boden, R., Elkins, C., Pangburn, M.K., *et al.* (2001). Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 193, 281-295.
- Ramsay, M.E., Andrews, N.J., Trotter, C.L., Kaczmarski, E.B., and Miller, E. (2003). Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: database analysis. *BMJ* 326, 365-366.
- Rappuoli, R. (2001). Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine* 19, 2688-2691.
- Read, R.C., Pullin, J., Gregory, S., Borrow, R., Kaczmarski, E.B., di Giovine, F.S., Dower, S.K., Cannings, C., and Wilson, A.G. (2001). A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 184, 640-642.
- Reingold, A.L., Broome, C.V., Hightower, A.W., Ajello, G.W., Bolan, G.A., Adamsbaum, C., Jones, E.E., Phillips, C., Tiendrebeogo, H., and Yada, A. (1985). Age-specific differences in duration of clinical protection after vaccination with meningococcal polysaccharide A vaccine. *Lancet* 2, 114-118.
- Richmond, P., Kaczmarski, E., Borrow, R., Findlow, J., Clark, S., McCann, R., Hill, J., Barker, M., and Miller, E. (2000). Meningococcal C polysaccharide vaccine induces immunologic hyporesponsiveness in adults that is overcome by meningococcal C conjugate vaccine. *J Infect Dis* 181, 761-764.
- Richmond, P., Borrow, R., Findlow, J., Martin, S., Thornton, C., Cartwright, K., and Miller, E. (2001). Evaluation of De-O-acetylated meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in infancy: reactogenicity, immunogenicity, immunologic priming, and bactericidal activity against O-acetylated and De-O-acetylated serogroup C strains. *Infect Immun* 69, 2378-2382.

- Richter, S.S., Gordon, K.A., Rhomberg, P.R., Pfaller, M.A., and Jones, R.N. (2001). *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to penicillin: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, North America, 1989-99. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42, 83-88.
- Riedo, F.X., Plikaytis, B.D., and Broome, C.V. (1995). Epidemiology and prevention of meningococcal disease. *Ped Infect Dis J* 14, 643-657.
- Roberts, I.S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Ann Rev Microbiol* 50, 285-315.
- Rokbi, B., Mignon, M., Maitre-Wilmotte, G., Lissolo, L., Danve, B., Caugant, D.A., and Quentin-Millet, M.J. (1997). Evaluation of recombinant transferrin-binding protein B variants from *Neisseria meningitidis* for their ability to induce cross-reactive and bactericidal antibodies against a genetically diverse collection of serogroup B strains. *Infect Immun* 65, 55-63.
- Rosenqvist, E., Wedege, E., Hoiby, E.A., and Froholm, L.O. (1990). Serogroup determination of *Neisseria meningitidis* by whole-cell ELISA, dot-blotting and agglutination. *APMIS* 98, 501-506.
- Rosenqvist, E., Hoiby, E.A., Wedege, E., Kusecek, B., and Achtman, M. (1993). The 5C protein of *Neisseria meningitidis* is highly immunogenic in humans and induces bactericidal antibodies. *J Infect Dis* 167, 1065-1073.
- Rosenqvist, E., Hoiby, E.A., Wedege, E., Bryn, K., Kolberg, J., Klem, A., Ronnild, E., Bjune, G., and Nokleby, H. (1995). Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect Immun* 63, 4642-4652.
- Rosenqvist, E., Musacchio, A., Aase, A., Hoiby, E.A., Namork, E., Kolberg, J., Wedege, E., Delvig, A., Dalseg, R., Michaelsen, T.E., *et al.* (1999). Functional activities and epitope specificity of human and murine antibodies against the class 4 outer membrane protein (Rmp) of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 67, 1267-1276.
- Rosenstein, N.E., Perkins, B.A., Stephens, D.S., Popovic, T., and Hughes, J.M. (2001). Meningococcal disease. *New Engl J Med* 344, 1378-1388.
- Russell, J.E., Jolley, K.A., Feavers, I.M., Maiden, M.C., and Suker, J. (2004). PorA variable regions of *Neisseria meningitidis*. *Emerg Infect Dis* 10, 674-678.
- Saez-Nieto, J.A., Llacer, A., Catala, F., Fenoll, A., and Casal, J. (1981). [Meningococcal meningitis in Spain (1978-1980). I. Epidemiologic studies, serogroups and sensitivity to antimicrobial agents]. *Rev San Hig Publ* 55, 831-869.

- Saez-Nieto, J.A., Fenoll, A., Vazquez, J., and Casal, J. (1982). Prevalence of maltose-negative *Neisseria meningitidis* variants during an epidemic period in Spain. *J Clin Microbiol* 15, 78-81.
- Sáez-Nieto J.A, Fontanals D, Garcia de Jalon J, Martinez de Artola V, Peña P, Morera MA, Verdaguer R, Sanfeliu I, Belio-Blasco C, Perez-Saenz JL, *et al.* (1987). Isolation of *Neisseria meningitidis* strains with increase of penicillin minimal inhibitory concentrations. *Epidemiol Infect.* 99, 463-469.
- Saez-Nieto, J.A., Lujan, R., Berron, S., Campos, J., Viñas, M., Fuste, C., Vazquez, J.A. *et al.* (1992). Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in Spain: a 5-year history (1985-1989). *Clin Infect Dis* 14, 394-402.
- Sahu, A., and Lambris, J.D. (2001). Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* 180. 35-48.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Santos, G.F., Deck, R.R., Donnelly, J., Blackwelder, W., and Granoff, D.M. (2001). Importance of complement source in measuring meningococcal bactericidal titers. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 616-623.
- Saukkonen, K., Abdillahi, H., Poolman, J.T., and Leinonen, M. (1987). Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. *Microb Pathog* 3, 261-267
- Scherp, H.W., and Rake, G. (1935). Studies on Meningococcus Infection : Viii. the Type I Specific Substance. *J Exp Med* 61, 753-769.
- Schneider, M.C., Exley, R.M., Chan, H., Feavers, I., Kang, Y.H., Sim, R.B., and Tang, C.M. (2006). Functional significance of factor H binding to *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 176, 7566-7575.
- Schneider, M.C., Exley, R.M., Ram, S., Sim, R.B., and Tang, C.M. (2007). Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends Microbiol* 15, 233-240.
- Scholten, R.J., Kuipers, B., Valkenburg, H.A., Dankert, J., Zollinger, W.D., and Poolman, J.T. (1994). Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *J Med Microbiol* 41, 236-243.

- Schwentker, F. (1937). Treatment of meningococcic meningitis with sulfanilamide. *J Pediatr* 11, 874-880.
- Seib, K.L., Serruto, D., Oriente, F., Delany, I., Adu-Bobie, J., Veggi, D., Arico, B., Rappuoli, R., and Pizza, M. (2009). Factor H-binding protein is important for meningococcal survival in human whole blood and serum and in the presence of the antimicrobial peptide LL-37. *Infect Immun* 77, 292-299.
- Serruto, D., Spadafina, T., Ciocchi, L., Lewis, L.A., Ram, S., Tontini, M., Santini, L., Biolchi, A., Seib, K.L., Giuliani, M.M., *et al.* (2010). *Neisseria meningitidis* GNA2132, a heparin-binding protein that induces protective immunity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Shultz, T.R., Tapsall, J.W., White, P.A., Ryan, C.S., Lyras, D., Rood, J.I., Binotto, E., and Richardson, C.J. (2003). Chloramphenicol-resistant *Neisseria meningitidis* containing catP isolated in Australia. *J Antimicrob Chemother* 52, 856-859.
- Sierra, G.V., Campa, H.C., Varcacel, N.M., Garcia, I.L., Izquierdo, P.L., Sotolongo, P.F., Casanueva, G.V., Rico, C.O., Rodriguez, C.R., and Terry, M.H. (1991). Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH annals* 14, 195-207; discussion 208-110.
- Sim, R.B., and Laich, A. (2000). Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 28, 545-550.
- Sim, R.J., Harrison, M.M., Moxon, E.R., and Tang, C.M. (2000). Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. *Lancet* 356, 1653-1654.
- Sjoholm, A.G., Braconier, J.H., and Soderstrom, C. (1982). Properdin deficiency in a family with fulminant meningococcal infections. *Clin Exp Immunol* 50, 291-297.
- Sjoholm, A.G., Selander, B., Ostenson, S., Holmstrom, E., and Soderstrom, C. (1991). Normal human serum depleted of C1q, factor D and properdin: its use in studies of complement activation. *APMIS* 99, 1120-1128.
- Sjoholm, A.B., Jonsson, G., Braconier, J.H., Sturfet, G., and Truedsson, L. (2006). Complement deficiency and disease: an update. *Mol Immunol* 43, 78-85.
- Smith, H., Yates, E.A., Cole, J.A., and Parsons, N.J. (2001). Lactate stimulation of gonococcal metabolism in media containing glucose: mechanism, impact on pathogenicity, and wider implications for other pathogens. *Infect Immun* 69, 6565-6572.

- Sophian, A., and Black, J. (1912). Prophylactic vaccination against epidemic meningitis. *J Am Med Assoc* 59, 527-532.
- Spinosa, M.R., Progida, C., Tala, A., Cogli, L., Alifano, P., and Bucci, C. (2007). The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. *Infect Immun* 75, 3594-3603.
- Stein, K.E. (1992). Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. *J Infect Dis* 165 Suppl 1, S49-52.
- Stefanelli, P., Carattoli, A., Neri, A., Fazio, C., and Mastrantonio, P. (2003). Prediction of decreased susceptibility to penicillin of *Neisseria meningitidis* strains by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 41, 4666-4670.
- Stephens, D.S., and McGee, Z.A. (1981). Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. *J Infect Dis* 143, 525-532.
- Stephens, D.S., Hoffman, L.H., and McGee, Z.A. (1983). Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* 148, 369-376.
- Stephens, D.S., Whitney, A.M., Rothbard, J., and Schoolnik, G.K. (1985). Pili of *Neisseria meningitidis*. Analysis of structure and investigation of structural and antigenic relationships to gonococcal pili. *J Exp Med* 161, 1539-1553.
- Stephens, D.S., Spellman, P.A., and Swartley, J.S. (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.
- Stephens, D.S. (1999). Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet* 353, 941-942.
- Stephens, D.S. (2007). Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev* 31, 3-14.
- Stephens, D.S., Greenwood, B., and Brandtzaeg, P. (2007). Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 369, 2196-2210.
- Stuart, J.M., Cartwright, K.A., Robinson, P.M., and Noah, N.D. (1989). Effect of smoking on meningococcal carriage. *Lancet* 23, 723-725.
- Suker, J., Feavers, I.M., Achtman, M., Morelli, G., Wang, J.F., and Maiden, M.C. (1994). The *porA* gene in serogroup A meningococci: evolutionary stability and mechanism of genetic variation. *Mol Microbiol* 12, 253-265.

- Sutcliffe, E.M., Jones, D.M., el-Sheikh, S., and Percival, A. (1988), Penicillin-insensitive meningococci in the UK. *Lancet* 19, 657-658.
- Swartley, J.S., Ahn, J.H., Liu, L.J., Kahler, C.M., and Stephens, D.S. (1996). Expression of sialic acid and polysialic acid in serogroup B *Neisseria meningitidis*: divergent transcription of biosynthesis and transport operons through a common promoter region. *J Bacteriol* 178, 4052-4059.
- Swartley, J.S., Marfin, A.A., Edupuganti, S., Liu, L.J., Cieslak, P., Perkins, B., Wenger, J.D., and Stephens, D.S. (1997). Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 271-276.
- Swartley, J.S., Liu, L.J., Miller, Y.K., Martin, L.E., Edupuganti, S., and Stephens, D.S. (1998). Characterization of the gene cassette required for biosynthesis of the ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-linked N-acetyl-D-mannosamine-1-phosphate capsule of serogroup A *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 180, 1533-1539.
- Taha, M.K. (2000). Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 38, 855-857.
- Taha, M.K., Achtman, M., Alonso, J.M., Greenwood, B., Ramsay, M., Fox, A., Gray, S., and Kaczmarski, E. (2000). Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet* 356, 2159.
- Taha, M.K., and Fox, A. (2007). Quality assessed nonculture techniques for detection and typing of meningococci. *FEMS Microbiol Rev* 31, 37-42.
- Tang, C.M., Stroud, D., Mackinnon, F., Makepeace, K., Plested, J., Moxon, E.R., and Chalmers, R. (2002). Genetic linkage analysis to identify a gene required for the addition of phosphoethanolamine to meningococcal lipopolysaccharide. *Gene* 284, 133-140.
- Tapsall, J.W., Shultz, T., Limnios, E., Munro, R., Mercer, J., Porrit, R., Griffith, J., Hogg, G., Lum, G., *et al.* 2001. Surveillance of antibiotic resistance in invasive isolates of *Neisseria meningitidis* in Australia 1994-1999. *Pathology* 33, 359-361.
- Tapsall, J. (2009). Annual report of the Australian Meningococcal Surveillance Programme, 2007-Amended. *Comm Dis Intell* 33, 1-9.
- Tettelin, H., Saunders, N.J., Heidelberg, J., Jeffries, A.C., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Ketchum, K.A., Hood, D.W., Peden, J.F., Dodson, R.J., *et al.* (2000). Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 287, 1809-1815.

- Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Stover, C.M., Schwaeble, W., Laursen, S.B., Poulsen, K., Willis, A.C. et al. (1997). A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386, 506-510.
- Thompson, E.A., Feavers, I.M., and Maiden, M.C. (2003). Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology* 149, 1849-1858.
- Tommassen, J., Vermeij, P., Struyve, M., Benz, R., and Poolman, J.T. (1990). Isolation of *Neisseria meningitidis* mutants deficient in class 1 (porA) and class 3 (porB) outer membrane proteins. *Infect Immun* 58, 1355-1359.
- Tonjum, T., Freitag, N.E., Namork, E., and Koomey, M. (1995). Identification and characterization of pilG, a highly conserved pilus-assembly gene in pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 16, 451-464.
- Traore, Y., Njanpop-Lafourcade, B.M., Adjogble, K.L., Lourd, M., Yaro, S., Nacro, B., Drabo, A., Parent du Chatelet, I., Mueller, J.E., Taha, M.K., et al. (2006). The rise and fall of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup W135 meningitis in Burkina Faso, 2002-2005. *Clin Infect Dis* 43, 817-822.
- Tribe, D.E., Zaia, A.M., Griffith, J.M., Robinson, P.M., Li, H.Y., Taylor, K.N., and Hogg, G.G. (2002). Increase in meningococcal disease associated with the emergence of a novel ST-11 variant of serogroup C *Neisseria meningitidis* in Victoria, Australia, 1999-2000. *Epidemiol Infect* 128, 7-14.
- Troncoso, G., Sanchez, S., Criado, M.T., and Ferreiros, C.M. (2002). Analysis of *Neisseria lactamica* antigens putatively implicated in acquisition of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, 9-15.
- Tsai, C.M., Mocca, L.F., and Frasch, C.E. (1987). Immunotype epitopes of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide types 1 through 8. *Infect Immun* 55, 1652-1656.
- Tsai, C.M., Kao, G., and Zhu, P. (2002). Influence of the length of the lipooligosaccharide alpha chain on its sialylation in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 70, 407-411.
- Tsang, R.S., Tsai, C.M., Zhu, P., Ringuette, L., Lorange, M., and Law, D.K. (2004). Phenotypic and genetic characterization of a unique variant of serogroup C ET-15 meningococci (with the antigenic formula C:2a:P1.7,1) causing invasive meningococcal disease in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 42, 1460-1465.
- Tzeng, Y.L., and Stephens, D.S. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microb Infect* 2, 687-700.

- Tzeng, Y.L., Swartley, J.S., Miller, Y.K., Nisbet, R.E., Liu, L.J., Ahn, J.H., and Stephens, D.S. (2001). Transcriptional regulation of divergent capsule biosynthesis and transport operon promoters in serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 69, 2502-2511.
- Tzeng, Y.L., Noble, C., and Stephens, D.S. (2003). Genetic basis for biosynthesis of the (alpha 1-->4)-linked N-acetyl-D-glucosamine 1-phosphate capsule of *Neisseria meningitidis* serogroup X. *Infect Immun* 71, 6712-6720.
- Tzeng, Y.L., Kahler, C.M., Zhang, X., and Stephens, D.S. (2008). MisR/MisS two-component regulon in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 76, 704-716.
- Unkmeir, A., Kammerer, U., Stade, A., Hubner, C., Haller, S., Kolb-Maurer, A., Frosch, M., and Dietrich, G. (2002). Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun* 70, 2454-2462.
- van der Ende, A., Hopman, C.T., and Dankert, J. (2000). Multiple mechanisms of phase variation of PorA in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 68, 6685-6690.
- van der Ende, A., Hopman, C.T., Keijzers, W.C., Spanjaard, L., Lodder, E.B., van Keulen, P.H., and Dankert, J. (2003). Outbreak of meningococcal disease caused by PorA-deficient meningococci. *J Infect Dis* 187, 869-871.
- van der Ley, P., Kramer, M., Martin, A., Richards, J.C., and Poolman, J.T. (1997). Analysis of the icsBA locus required for biosynthesis of the inner core region from *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharide. *FEMS Microbiol letters* 146, 247-253.
- van Deuren, M., Brandtzaeg, P., and van der Meer, J.W. (2000). Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 13, 144-166.
- Varki, A., and Kornfeld, S. (1980). An autosomal dominant gene regulates the extent of 9-O-acetylation of murine erythrocyte sialic acids. A probable explanation for the variation in capacity to activate the human alternate complement pathway. *J Exp Med* 152, 532-544.
- Vazquez, J.A., de la Fuente, L., Berron, S., O'Rourke, M., Smith, N.H., Zhou, J., and Spratt, B.G. (1993). Ecological separation and genetic isolation of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Curr Biol* 3, 567-572.
- Vazquez, J.A., Enriquez, A.M., De la Fuente, L., Berron, S., and Baquero, M. (1996). Isolation of a strain of beta-lactamase producing *Neisseria meningitidis* in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15, 181-182.

- Vazquez, J.A., Berron, S., Gimenez, M.J., de la Fuente, L., and Aguilar, L. (2001). In vitro susceptibility of *Neisseria meningitidis* isolates to gemifloxacin and ten other antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20, 150-151.
- Vazquez, J.A. (2002). [Development of vaccinations against meningococcus: a long, winding, and still unfinished road]. *Enferm Infec Microbiol Clin* 20, 313-315.
- Vazquez, J.A. (2007). Resistance testing of meningococci: the recommendations of the European Monitoring Group on Meningococci. *FEMS Microbiol Rev* 31, 97-100.
- Vedros, N.A. (1978). Serology of meningococcus. *Methods in Microbiology Academic Press London* 10, 293-314.
- Vedros, N. (1984). Genus I. *Neisseria*. *Bergey's of Systematic Bacteriology Williams & Wilkins, Baltimore, London* 290-296.
- Vieusseux, M. (1806). Memorie sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. *J Med Chir Pharmacol* 11, 163-182.
- Virji, M., and Heckels, J.E. (1988). Nonbactericidal antibodies against *Neisseria gonorrhoeae*: evaluation of their blocking effect on bactericidal antibodies directed against outer membrane antigens. *J Gen Microbiol* 134, 2703-2711.
- Virji, M., Heckels, J.E., Potts, W.J., Hart, C.A., and Saunders, J.R. (1989). Identification of epitopes recognized by monoclonal antibodies SM1 and SM2 which react with all pili of *Neisseria gonorrhoeae* but which differentiate between two structural classes of pili expressed by *Neisseria meningitidis* and the distribution of their encoding sequences in the genomes of *Neisseria spp.* *J Gen Microbiol* 135, 3239-3251
- Virji, M., Alexandrescu, C., Ferguson, D.J., Saunders, J.R., and Moxon, E.R. (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.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J., Achtman, M., and Moxon, E.R. (1993). Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* 10, 499-510.
- Virji, M., Makepeace, K., Peak, I.R., Ferguson, D.J., Jennings, M.P., and Moxon, E.R. (1995). Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol* 18, 741-754.

- Vodopija, I., Baklaic, Z., Hauser, P., Roelants, P., Andre, F.E., and Safary, A. (1983). Reactivity and immunogenicity of bivalent (AC) and tetravalent (ACW135Y) meningococcal vaccines containing O-acetyl-negative or O-acetyl-positive group C polysaccharide. *Infect Immun* 42, 599-604.
- Vogel, U., Hammerschmidt, S., and Frosch, M. (1996). Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. *Med Microbiol Immunol* 185, 81-87.
- Vogel, U., Claus, H., Heinze, G., and Frosch, M. (1997a). Functional characterization of an isogenic meningococcal alpha-2,3-sialyltransferase mutant: the role of lipooligosaccharide sialylation for serum resistance in serogroup B meningococci. *Med Microbiol Immunol* 186, 159-166.
- Vogel, U., Weinberger, A., Frank, R., Muller, A., Kohl, J., Atkinson, J.P., and Frosch, M. (1997b). Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 65, 4022-4029.
- Vogel, U., Claus, H., Heinze, G., and Frosch, M. (1999). Role of lipopolysaccharide sialylation in serum resistance of serogroup B and C meningococcal disease isolates. *Infect Immun* 67, 954-957.
- Vogel, U., and Frosch, M. (1999). Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol Microbiol* 32, 1133-1139.
- Vogel, U., Claus, H., von Muller, L., Bunjes, D., Elias, J., and Frosch, M. (2004). Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the capsule null locus (cni). *J Clin Microbiol* 42, 2898-2901.
- Von Loewenich, F.D., Wintermeyer, E., Dumig, M., and Frosch, M. (2001). Analysis of transcriptional control mechanisms of capsule expression in *Neisseria meningitidis*. *Int J Med Microbiol* 291, 361-369.
- Walport, M.J. (2001). Complement. First of two parts. *New Engl J Med* 344, 1058-1066.
- Weichselbaum, A. (1887). Ueber die Aetiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis. *Fortschr Med* 5.
- Welsch, J.A., and Granoff, D. (2004). Naturally acquired passive protective activity against *Neisseria meningitidis* Group C in the absence of serum bactericidal activity. *Infect Immun* 72, 5903-5909.

- Wetzler, L.M., Ho, Y., and Reiser, H. (1996). Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. *J Exp Med* 183, 1151-1159.
- Whalen, C.M., Hockin, J.C., Ryan, A., and Ashton, F. (1995). The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis*. *Jama* 273, 390-394.
- Willis, T. (1684). A description of an epidemical fever in 1661. *Practice of physick London Treatise VII*, 46-54.
- Winstead, J.M., McKinsey, D.S., Tasker, S., De Groote, M.A., and Baddour, L.M. (2000). Meningococcal pneumonia: characterization and review of cases seen over the past 25 years. *Clin Infect Dis* 30, 87-94.
- Wright, J.C., J.S, P., and E.R, M. (2006). The Population Biology of *Neisseria meningitidis*: Implication for Meningococcal Disease, Epidemiology and Control Handbook of Meningococcal Disease Infection Biology, Vaccination, Clinical Management, 17-32.
- Yazdankhah, S.P., and Caugant, D.A. (2004). *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol* 53, 821-832.
- Yuste, J., Botto, M., Bottoms, S.E., and Brown, J.S. (2007). Serum amyloid P aids complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* 3, 1208-1219.
- Zhu, P, Klutch M.J., Bash M.C., Tsang R.S., Ng L.K., and Tsai C.M. (2002). Genetic diversity of three lgt loci for biosynthesis of lipooligosaccharide (LOS) in *Neisseria* species. *Microbiology* 148, 1833-1844.
- Zarantonelli, M.L., Huerre, M., Taha, M.K., and Alonso, J.M. (2006). Differential role of lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* in virulence and inflammatory response during respiratory infection in mice. *Infect Immun* 74, 5506-5512.
- Ziccardi, R.J. (1983). The first component of human complement (C1): activation and control. *Springer Sem Immunopathol* 6, 213-230.



**PUBLICACIÓN**



# A generic mechanism in *Neisseria meningitidis* for enhanced resistance against bactericidal antibodies

Maria Jose Uria,<sup>1,2</sup> Qian Zhang,<sup>1</sup> Yanwen Li,<sup>1</sup> Angel Chan,<sup>1</sup> Rachel M. Exley,<sup>1</sup> Bridget Gollan,<sup>1</sup> Hannah Chan,<sup>3</sup> Ian Feavers,<sup>3</sup> Andy Yarwood,<sup>4</sup> Raquel Abad,<sup>2</sup> Ray Borrow,<sup>5</sup> Roland A. Fleck,<sup>3</sup> Barbara Mulloy,<sup>3</sup> Julio A. Vazquez,<sup>2</sup> and Christoph M. Tang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre for Molecular Microbiology and Infection, Department of Microbiology, Imperial College London, London SW7 2AZ, England, UK

<sup>2</sup>Reference Laboratory for *Neisseria*, National Center of Microbiology, Institute of Health Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>3</sup>National Institute of Biological Standards and Control, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, England, UK

<sup>4</sup>JEOL (UK) Ltd., JEOL House, Silvercourt, Watchmead, Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 1LT, England, UK

<sup>5</sup>Vaccine Evaluation Unit, North West Regional HPA Laboratory, Manchester Royal Infirmary, Manchester M13 9WZ, England, UK

The presence of serum bactericidal antibodies is a proven correlate of protection against systemic infection with the important human pathogen *Neisseria meningitidis*. We have identified three serogroup C *N. meningitidis* (MenC) isolates recovered from patients with invasive meningococcal disease that resist killing by bactericidal antibodies induced by the MenC conjugate vaccine. None of the patients had received the vaccine, which has been successfully introduced in countries in North America and Europe. The increased resistance was not caused by changes either in lipopolysaccharide sialylation or acetylation of the  $\alpha$ 2-9-linked polysialic acid capsule. Instead, the resistance of the isolates resulted from the presence of an insertion sequence, IS1301, in the intergenic region (IGR) between the *sia* and *ctr* operons, which are necessary for capsule biosynthesis and export, respectively. The insertion sequence led to an increase in the transcript levels of surrounding genes and the amount of capsule expressed by the strains. The increased amount of capsule was associated with down-regulation of the alternative pathway of complement activation, providing a generic mechanism by which the bacterium protects itself against bactericidal antibodies. The strains with IS1301 in the IGR avoided complement-mediated lysis in the presence of bactericidal antibodies directed at the outer membrane protein, PorA, or raised against whole cells.

## CORRESPONDENCE

Christoph M. Tang:  
c.tang@imperial.ac.uk

Abbreviations used: AP, alternative pathway; BHI, brain heart infusion; CP, classical pathway; cryo-TEM, cryo-transmission electron microscopy; IGR, intergenic region; LP, lectin pathway; MAC, membrane attack complex; MCC, *N. meningitidis* serogroup C conjugate; MenC, serogroup C *N. meningitidis*; MFI, mean fluorescence index; qRT-PCR, quantitative real-time RT-PCR; SBA, serum bactericidal antibody; ST-11, sequence type 11.

Bacteria have a remarkable capacity to respond to new environments and adapt to novel selective pressures. This versatility reflects their genetic diversity, which is generated by high mutation rates, the acquisition of novel sequences by horizontal transfer, and mobile elements and repeated sequences in their genomes (1). Consequently, populations of bacteria often harbor variants that may have a selective advantage in a new or changing environment. The diversity of bacteria and their ability to generate novel variants can promote their virulence and limit the success of prophylactic and therapeutic interventions.

The online version of this article contains supplemental material.

*Neisseria meningitidis* is a Gram-negative diplococcus that remains a leading cause of bacterial meningitis and septicaemia. The complement system is critical for immunity against this important pathogen, as indicated by the exquisite sensitivity of individuals with complement deficiencies to meningococcal infection (2). This is particularly true for people lacking components (C5 to C9, inclusive) of the membrane attack complex (MAC), which is necessary for bacterial lysis (3). Furthermore, the most validated correlate of protection against meningococcal infection is the presence in serum of bactericidal antibodies (4–6). These antibodies initiate the classical pathway (CP) of complement activation,

ultimately leading to the insertion of the MAC into the outer membrane of *N. meningitidis* and bacteriolysis.

The *N. meningitidis* serogroup C conjugate (MCC) vaccine has been recently introduced into countries across Europe and North America (7, 8), primarily in response to the rising incidence of serogroup C *N. meningitidis* (MenC) disease caused by strains belonging to sequence type 11 (ST-11) (9). ST-11 strains have been responsible for meningococcal infection across the world, causing endemic disease usually as MenC isolates and occasional outbreaks as serogroup W135 isolates (10–12). The MCC vaccine consists of the  $\alpha$ 2–9-linked polysialic capsular polysaccharide coupled to a carrier protein (13), and protection is mediated by bactericidal antibodies directed against the capsule (4, 6). The level of these antibodies in individuals is measured by the serum bactericidal antibody (SBA) assay, and an SBA titer of  $\geq 8$  is a proven correlate of protection against MenC disease (4, 14).

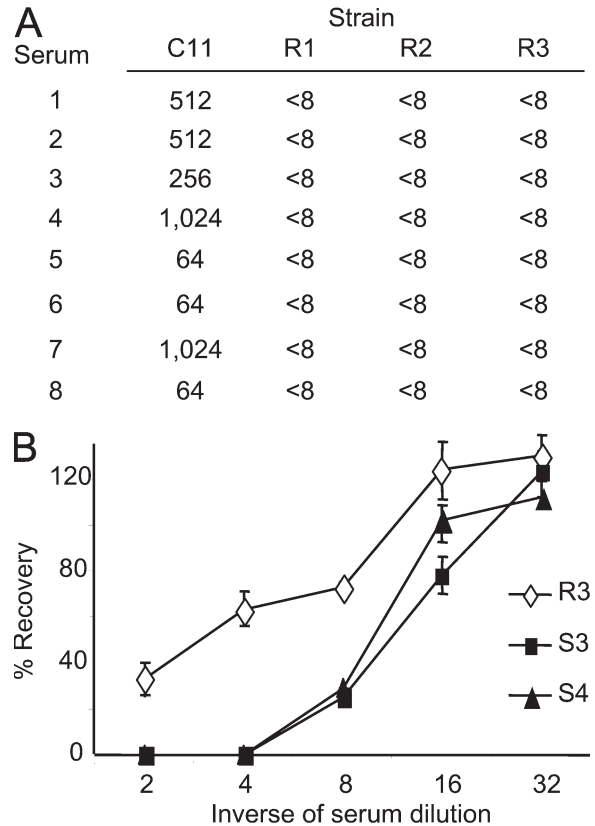
The MCC vaccine has been a major success and has resulted in dramatic decreases in the incidence of MenC disease to <5% of prevaccine levels, with an estimated vaccine efficacy between 95–98% (7, 8, 15). So far, concerns (16) that the MCC vaccine would lead to the emergence of ST-11 strains expressing other capsular types or that other strains of *N. meningitidis* would fill the ecological niche vacated by MenC have proven largely unfounded, although continuing surveillance is still underway (8).

In this study, we describe the identification and characterization of three MenC strains with enhanced resistance against bactericidal antibodies elicited by the MCC vaccine. We found that an insertion sequence, IS1301, in the 134-bp intergenic region (IGR) between the *sia* and *ctr* operons (involved in capsule biosynthesis and export, respectively) is responsible for the resistance. Previously, IS1301 has only been described as causing gene inactivation in *N. meningitidis* (17). Insertion of this element in the IGR results in increased transcript levels in both operons, leading to an increase in the amount of capsular polysaccharide and impairment of the alternative pathway (AP) of complement activation. This single genetic change provides the meningococcus with a generic mechanism to evade killing by bactericidal antibodies, and is of broad significance given the widespread distribution of IS1301 in *N. meningitidis* and the bacterium's competence for DNA uptake.

## RESULTS

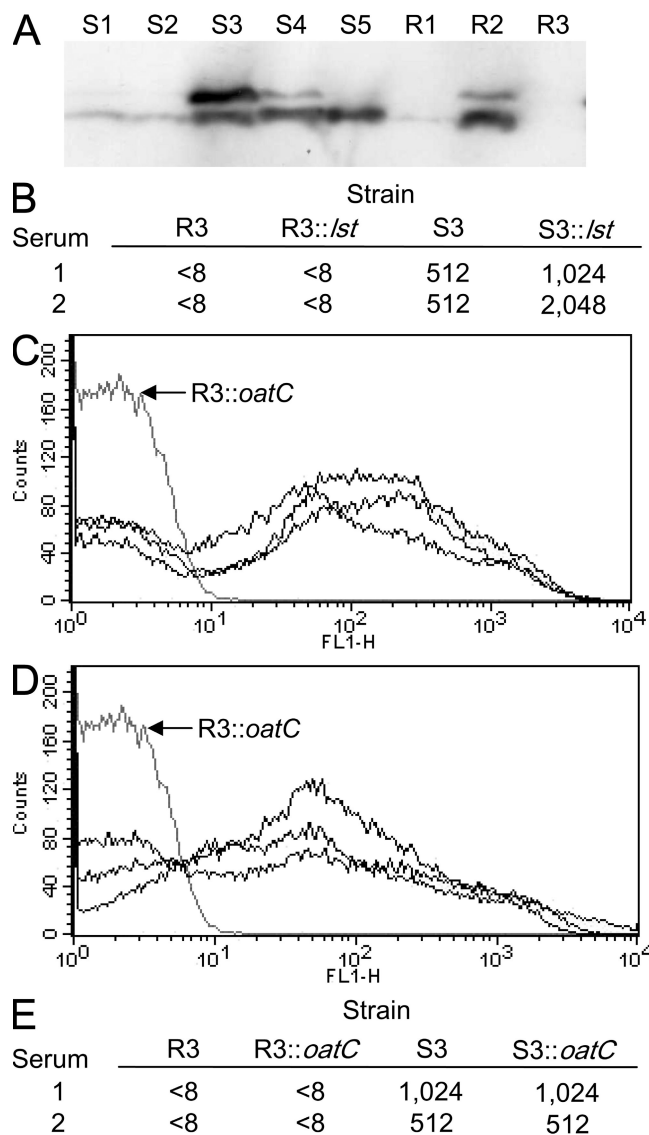
### Identification of MenC strains that avoid bactericidal antibodies elicited by the MCC vaccine

To identify meningococcal strains that are resistant to SBAs raised by the MCC vaccine, we used sera from three vaccinees to screen 109 MenC isolates from patients with proven meningococcal disease received by the Spanish National Reference laboratory between 2000 and 2003. The three vaccinees had been immunized with an MCC vaccine and had high level SBA titers against C11, a MenC strain routinely used for assessment of vaccine responses (Fig. 1 A) (18, 19). Three strains, designated R1, R2, and R3, were



**Figure 1. Identification of strains with increased resistance against bactericidal antibodies elicited by the MenC conjugate vaccine.** (A) SBA titers using sera from eight vaccinees against the R strains and the control strain, C11. All sera had SBA titers of <8 with the R strains. (B) The percent survival of strains S3, S4, and R3 after 1 h of incubation in dilutions of human immune serum. Assays were performed in triplicate, and the error bars show the SEM. The survival of R3 was significantly increased compared with other strains.  $P = 0.0002$  and  $0.0001$  at a 1:2 and 1:4 serum dilution, respectively, with the Student's *t* test.

identified, against which the SBA titers of sera from all three vaccinees was <8. The strains were tested with sera from five more vaccinees with identical results. SBA titers against MenC are routinely measured with rabbit complement (6, 14); similar results were obtained when assays were performed with human complement (Table S1, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20072577/DC1>). Isolate R1 was recovered from a 37-yr-old female with fatal meningococcal septicaemia in Madrid in 2000, whereas R2 was obtained from blood cultures taken from a 40-yr-old female from Léon in 2003. R3 was isolated from blood cultures from a 19-yr-old female in Valladolid in the same year. None of the patients had received a MenC vaccine, and the patients infected with strains R2 and R3 made uneventful recoveries. The R strains were phenotypically C:2a:P1.5 and ST-11, subgroup ET-15 (ST-11/ET-15) by multilocus sequencing typing and *fumC* sequencing (20). Five fully sensitive C:2a:P1.5, ST-11/ET-15 isolates (designated S1–S5) were selected from the collection at the reference laboratory



**Figure 2. Resistance of strains is not due to changes in LPS sialylation or *O*-acetylation of capsular polysaccharide.** (A) The extent of LPS sialylation of the R and S strains. Samples were separated by SDS-PAGE and transferred to membranes that were then incubated with the mAb 3F11, which detects unsialylated LPS. The strains are indicated above each lane. (B) SBA titers of two vaccinees' sera against R3, S3, and the corresponding *lst* mutants, which are unable to sialylate their LPS; a lack of LPS sialylation did not affect the survival of the R or S strains. Both the S (C) and R (D) strains express an *O*-acetylated polysaccharide capsule. FACS analysis of strains was performed with the mAb 1125. The gray line shows results obtained with the *oatC*-negative mutant, R3::*oatC*. (E) The sensitivity of S3 and R3 to antibodies in sera from two vaccinees is unaffected by acetylation. Identical SBA titers were obtained with wild-type strains and their corresponding *oatC* mutants.

as controls. We also examined the recovery of one of the R strains after incubation in immune sera, which includes human complement; R3 was relatively more resistant against killing in human immune sera than the control strains, S3 and S4 (Fig. 1 B).

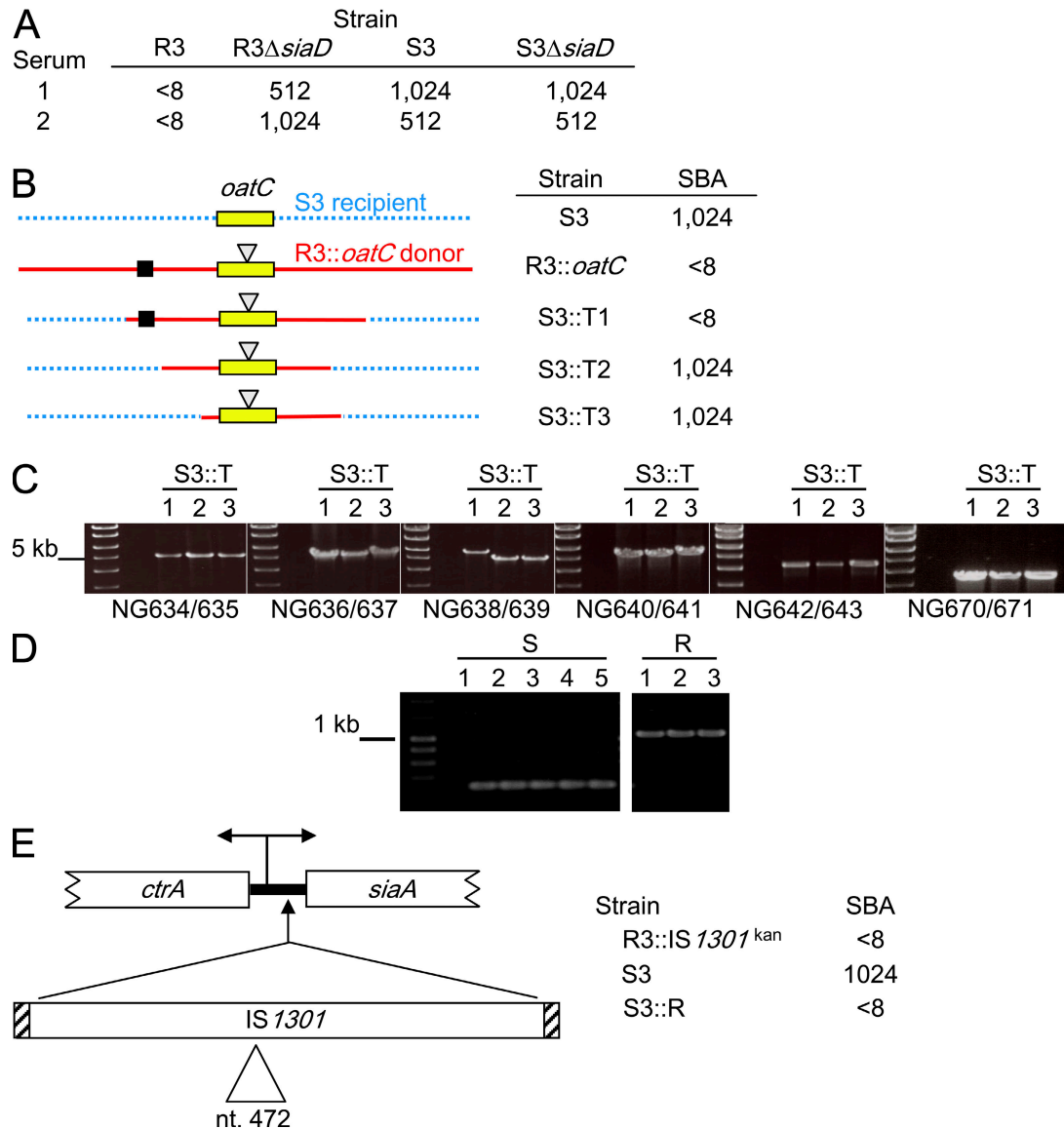
### Strains are not resistant because of changes in LPS sialylation or acetylation of capsular polysaccharide

To understand the basis of the increased resistance of the R strains against immune sera, we first examined the degree of LPS sialylation of strains, as this modification can contribute to the avoidance of complement-mediated lysis (3, 21). There were no consistent differences in the degree of LPS sialylation between the R and S strains, as determined by Western blot analysis using mAb 3F11, which binds to unsialylated LPS (Fig. 2 A) (22). To exclude the possibility that LPS sialylation was responsible for the resistance of strains, we inactivated *lst* (which encodes the LPS-specific sialyl transferase) in strain R3. This had no impact on the survival of this strain in the presence of immune sera, demonstrating that its resistance is independent of LPS sialylation (Fig. 2 B).

We next examined whether alterations in the acetylation status of the capsule affected the resistance of strains. Capsule *O*-acetylation is mediated by a transferase encoded by *oatC*, which is located in the capsule biosynthesis locus (*cps*) (23). The *oatC* open reading frame contains two homopolymeric tracts that can mediate ON:OFF switching of acetylation after alteration in the tract length during DNA replication (23). The nucleotide sequence of the *oatC* gene in the R and S strains indicated that the gene is predicted to be expressed in all strains (unpublished data). The capsules of all strains were acetylated, as demonstrated by FACS analysis using the mAb 1125 (Fig. 2, C and D). To define the role of *O*-acetylation in the behavior of the R strains, we generated an *oatC* mutant, R3::*oatC*, by insertional inactivation. Loss of *oatC* did not alter the survival of this strain in the presence of immune sera (Fig. 2 E), excluding acetylation as the cause of the difference between the R and S strains.

### Insertion of IS1301 in the capsule biosynthesis locus is responsible for increased resistance

To investigate the role of the capsule itself, we generated capsule-negative derivatives of strains R3 and S3 by inactivating *siaD*, which encodes the capsule-specific polysialyl transferase (24). Although the SBA titer of the vaccinees' sera (which contain antibodies against subcapsular antigens as well as against capsular polysaccharide) against strain S3 was largely unchanged after loss of the capsule, R3 became markedly more susceptible to killing (Fig. 3 A), with the SBA titer increasing from <8 for R3 to  $\geq 512$  for R3 $\Delta$ *siaD*. This demonstrates that expression of the capsule is necessary for the enhanced resistance of R3, suggesting that the R strains might harbor changes in the *cps* that mediate their enhanced survival in the presence of immune sera. To test this hypothesis, we attempted to transfer the resistance from an R strain with a marker in the *cps* into a sensitive strain. Genomic DNA from strain R3::*oatC* (Fig. 3 B) was used to transform S3, and kanamycin-resistant transformants were analyzed for their sensitivity to bactericidal antibodies. As expected (depending on whether recombination transferred in sequences responsible for increased resistance; Fig. 3 B), we identified transformants that had become resistant to killing (S3::T1) to antibodies



**Figure 3. Insertion of IS1301 between the *sia* and *ctr* operons leads to enhanced resistance.** (A) The increased resistance of R3 requires expression of the polysaccharide capsule. The *siaD* mutant of R3 is sensitive to killing mediated by sera from two vaccinees, compared with the parental strain. (B) Transfer of resistance from strain R3 to S3 using genomic DNA from R3::*oatC* as the donor. This was performed to test the hypothesis that R3 (DNA shown as a continuous red line) has a region (indicated with a black square) in the *cps* that confers resistance and is different from the S strains (DNA shown as a blue dotted line). Transformants have enhanced resistance (S3::T1) or are fully sensitive (S3::T2 and S3::T3) transformants after transformation of S3, as would be expected depending on the site of recombination. (C) Overlapping PCR products spanning the *cps* were amplified from the transformants. The strain used as the target is indicated above each lane, and primers are given underneath; the sizes of a kb ladder are shown. White lines indicate that intervening lanes have been spliced out. (D) Analysis of PCR products obtained with primers NG732 and NG733 from the R and S strains. The R strains gave a product of around 1.1 kb, ~800 bp larger than that obtained from the sensitive strains. (E) Location of the IS1301 in the 134-bp *siaA-ctrA* intergenic region (thick black line), which contains a divergent promoter. Transfer of an IGR containing IS1301 (amplified with primers NG679 and NG687) to S3 (resulting in S3::R) is sufficient to confer resistance against killing mediated by bactericidal antibodies in vaccinees' sera. The location of the kan resistance marker in strains R3::IS1301<sup>kan</sup> and S3::R is indicated with a triangle.

elicited by the MCC vaccine, as well as those that remained fully sensitive (S3::T2 and S3::T3).

To identify regions of the *cps* that might confer the increased resistance, we amplified overlapping fragments of the *cps* from the transformants S3::T1, S3::T2, and S3::T3. One region of the *cps* (amplified with primers NG638 and NG639)

yielded a significantly larger product from the transformant with enhanced resistance (S3::T1) compared with the fully sensitive transformants (S3::T2 and S3::T3; Fig. 3 C). Further PCRs were performed to define the precise location of this polymorphic region; using primers NG732 and NG733 (Fig. 3), an ~1.1-kb fragment was amplified from S3::T1, whereas an

**Table I.** SBA titers of sera raised against different strains in assays against homologous or heterologous strains

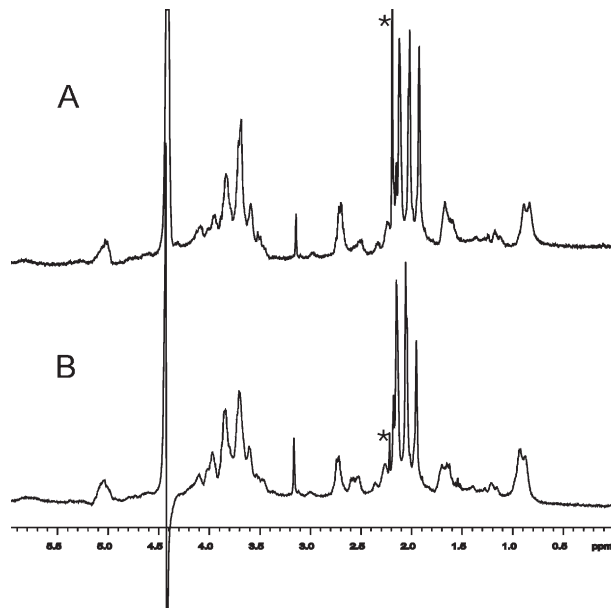
Sera raised versus	SBA titer against		
	S3	S3::R	R3
S3	1,024	<8	<8
SR	1,024	<8	<8
R3	1,024	<8	<8

~300-bp product was obtained from S3::T2 and S3::T3 (not depicted). We also examined the sizes of fragments obtained with these primers from the isolates R1–R3 and S1–S5, and 27 more fully sensitive, ST-11 strains from the Spanish collection. The R strains all gave the larger ~1.1-kb product, whereas the ~300-bp product was amplified from all sensitive strains, demonstrating a direct correlation between the size of this region of the *cps* and the ability of strains to withstand SBAs elicited by immunization with the MCC vaccine (Fig. 3 D and not depicted).

Sequence analysis demonstrated that the polymorphism in the *cps* locus resulted from the presence of an insertion sequence, *IS1301*, in the 134-bp IGR between *siaA* and *ctrA* in all R strains and S3::T1. *siaA* and *ctrA* are the first genes in monocistronic operons involved in the biosynthesis and export of capsular polysaccharide, respectively. The operons are divergently transcribed from promoters in the IGR (25–27). *IS1301* is an 844-bp mobile element that is present in multiple copies in the genomes of some meningococcal strains, including ST-11 isolates belonging to ET-15 (17, 28). The insertion sequence was located at the identical site in the same orientation in all three R strains, 54 bp upstream of the ATG start codon of *siaA*. To establish whether *IS1301* in the *siaA-ctrA* IGR is responsible for the resistance of the R strains, we transferred this element from R3 into the sensitive strain, S3. First, a marker encoding kanamycin resistance was introduced into nucleotide 472 of *IS1301* in R3, generating R3::*IS1301*<sup>kan</sup>; the marker had no effect on the SBA of pooled immune sera against R3 (Fig. 3 E). Then, we transferred the only modified IGR into S3, generating the isogenic strain S3::R, and this was sufficient to transfer increased resistance against bactericidal antibodies to strain S3 (Fig. 3 E).

#### Insertion of *IS1301* in the IGR increases capsule expression but does not affect its structure

We next determined whether the insertion of *IS1301* affected the antigenic properties of the capsular polysaccharide. Initially immune sera were raised against the isogenic strains, S3 and S3::R, and against R3. As expected, sera raised against S3 mediated killing of the homologous strain S3 (SBA titer 1,024) but not S3::R or R3 (Table I). High dilutions of sera raised against S3::R and R3 were also able to elicit complement-mediated lysis of S3, consistent with the capsular polysaccharide from the R strains retaining its immunogenicity. However, even high concentrations of the same sera failed to mediate killing of S3::R or R3 (Table I), suggesting that the

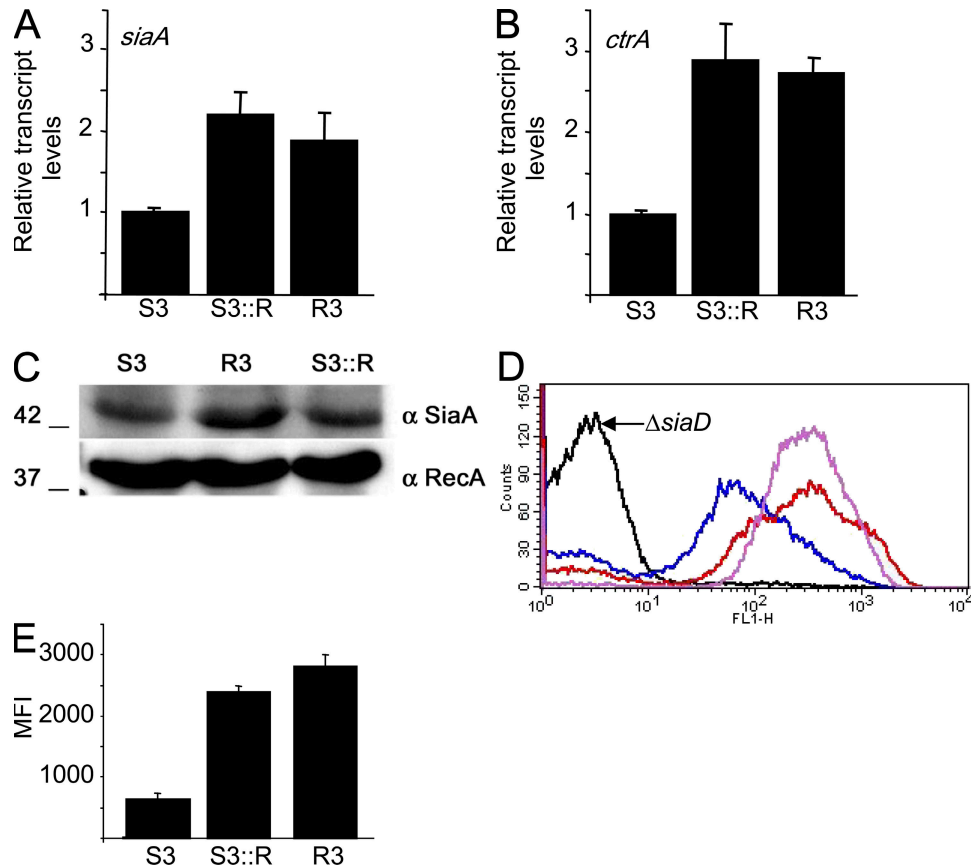


**Figure 4.** <sup>1</sup>H NMR spectra of purified capsular polysaccharide. No significant difference was identified between the capsules from strains S3 (A) and R3 (B). The asterisk denotes the internal standard (acetone), and the prominent and distorted peaks at ~4.8 parts per million (ppm) in both spectra are caused by partially deuterated water.

strains' increased resistance was not caused by an alteration in the nature of antigens expressed by the strains.

To establish whether there are qualitative changes in the capsule from the R strains, we assessed the composition of the capsular polysaccharide of strains by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy (29). The one-dimensional NMR spectrum of the serogroup C polysaccharide is sensitive to *O*-acetylation at C7 or C8, and the local sequence of *O*-acetylated monosaccharide residues (29). The spectrum of purified capsule from S3 (Fig. 4 A) was similar to that obtained for R3 and S3::R (Fig. 4 B and not depicted), and this was confirmed by two-dimensional total correlated spectroscopy (not depicted). This demonstrated that the capsular polysaccharides of the strains had identical linkages between the sialic acid monomers and the same distribution of *O*-acetylation. Therefore, insertion of *IS1301* in the IGR did not result in a detectable change in the composition of the capsule.

We next examined whether insertion of *IS1301* in the IGR affected the amount of capsule expressed by influencing the expression of neighboring genes. We performed quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) on *siaA* and *ctrA*, and compared the results with the transcript levels of a housekeeping gene, *gdh* (30). Although the transcript levels of *gdh* were not significantly different between the sensitive strains and those with enhanced resistance (not depicted), R3 and S3::R had a two- to threefold increase in mRNA of both *siaA* and *ctrA* compared with S3 ( $P < 0.005$  for *siaA* and *ctrA* in R3 and S3::R vs. S3 using the Student's *t* test; Fig. 5, A and B, respectively). We then determined whether the increase in the transcription of genes in the *cps* resulted in an



**Figure 5. Insertion of IS1301 increases the levels of *siaA* and *ctrA* transcripts and the amount of polysaccharide capsule expressed by bacteria.** The relative amounts of *siaA* (A) and *ctrA* (B) transcripts from S3, R3, and S3::R measured by qRT-PCR. Error bars show the SEM of assays performed in triplicate.  $P < 0.005$  for differences in *siaA* and *ctrA* mRNA levels in R3 and S3::R versus S3 using the Student's *t* test. (C) Western blot analysis of SiaA and RecA in whole-cell lysates. The strains are indicated above each lane, and the sizes of the proteins (in kD) are shown. (D) Expression of the polysialic capsule detected by FACS. Bacteria were incubated with polyclonal antisera raised against the MCC vaccine (black, capsule-negative strain R3 $\Delta$ *siaD*; blue, S3; red, S3::R; purple, R3). (E) Relative amount of capsule detected by FACS. Results are shown as the MFI (calculated as the geometric mean multiplied by the percentage of positive cells). Error bars show the SEM.  $P < 0.005$  for both strains with increased resistance versus S3 using the Student's *t* test.

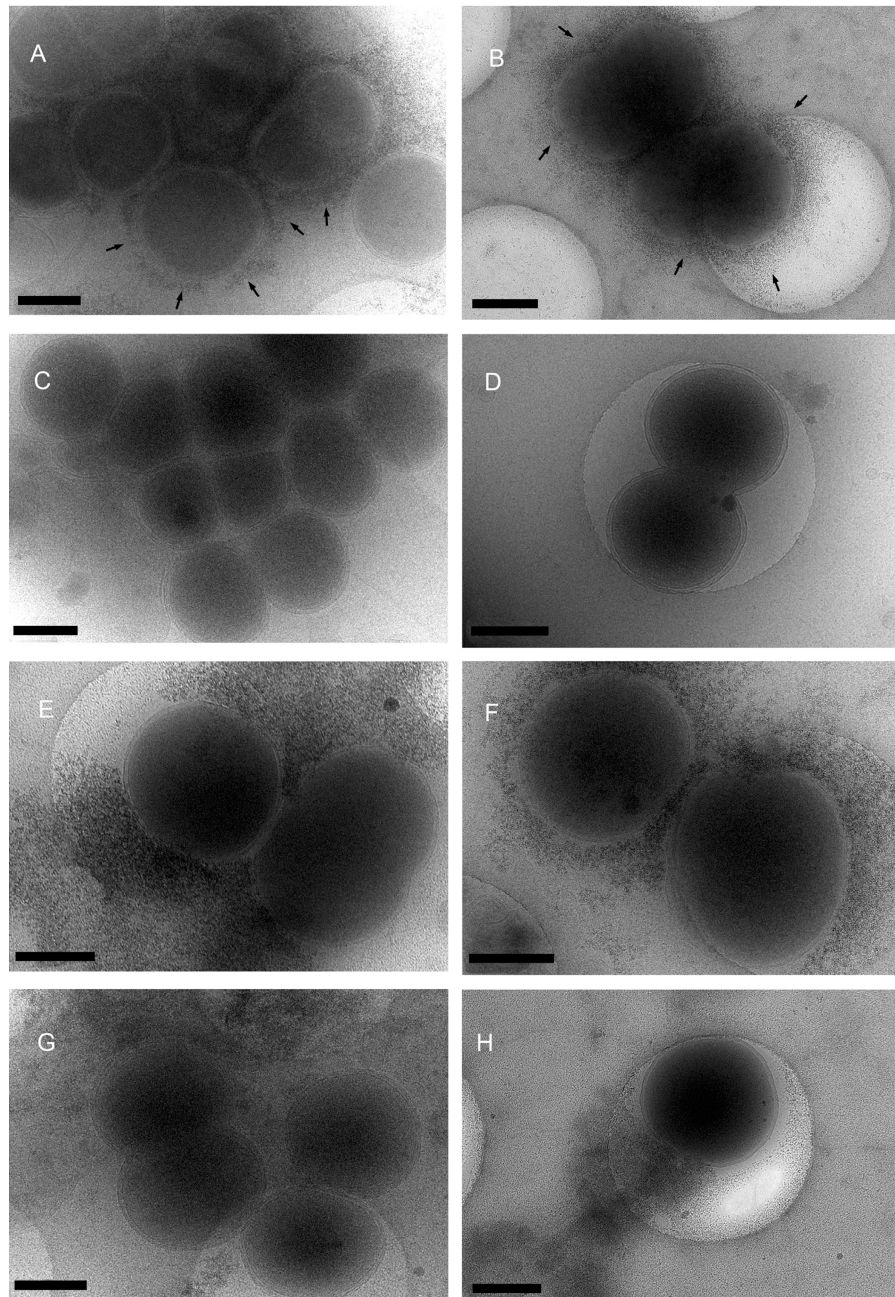
increase in the amount of the SiaA protein that is encoded by the first gene of the *sia* operon. Western blot analysis with an antipeptide antibody demonstrated that R3 and S3::R produced higher levels of SiaA than strain S3 (Fig. 5 C). We also determined the amount of capsular polysaccharide on the surface of the bacteria. We performed FACS analysis using polyclonal mouse sera raised against the MCC vaccine. Examination of a strain lacking capsule R3 $\Delta$ *siaD* demonstrated that there was no nonspecific binding of the antisera to *N. meningitidis* (Fig. 5 D). There was a significant increase in capsule expression by strains R3 and S3::R when compared with S3 ( $P < 0.005$  for both strains with increased resistance vs. S3 using the Student's *t* test; Fig. 5, D and E); the mean fluorescence index (MFI) of the strains with enhanced resistance was approximately three times higher when compared with the sensitive S3 strain.

Furthermore, we examined the strains by cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) after labeling live bacteria with the electron-dense, cationic stain ferritin, which binds to negatively charged bacterial capsules (31). After incubation with ferritin, bacteria were fixed by rapid freezing

and viewed by TEM without sectioning. With this method, capsular polysaccharide was clearly visualized around strain S3 (Fig. 6, A and B); no staining was detected around the *siaD* mutant (Fig. 6, C and D), demonstrating the specificity of staining. In contrast, there was much more capsule surrounding R3 and S3::R than observed around S3 (Fig. 6, E and F; and G and H, respectively), with capsular material extending well beyond the bacterial surface occasionally as aggregates of extracellular material. The differences between the strains were consistent on three independent occasions.

#### Activation of the alternative complement pathway is reduced on the strains with enhanced resistance

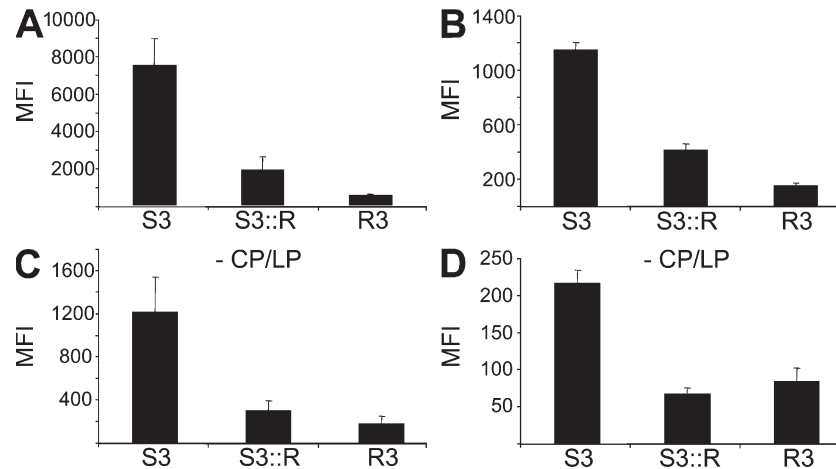
An increase in the expression of capsule, the antigen recognized by SBAs elicited by the MCC vaccine, could enhance the sensitivity of strains to immune sera rather than render them more resistant. Therefore, to further understand the underlying reason for the resistance of the strains, we examined the deposition of complement factors on bacteria after incubation in immune sera. Both R3 and S3::R had significantly



**Figure 6. Ferritin staining of capsular polysaccharide detected by cryo-TEM.** Capsular material was detected around the surface of the sensitive strain S3 (A and B, arrows) but not the corresponding *siaD* mutant (C and D). Strains R3 and S3::R (E and F; and G and H, respectively) expressed larger amounts of capsule, which formed large extracellular aggregates in places. Bars, 400 nm.

less C3 and MAC on their surfaces compared with the fully sensitive strain S3 (Fig. 7, A and B, respectively), consistent with the results of SBA titers and serum assays (Fig. 1). Sialic acid-containing capsules can inhibit the amplification of the complement cascade by interfering with the AP of complement activation (32–34); the AP serves to amplify the amount of complement activation on pathogen surfaces (35). Therefore, we examined whether there were differences in the extent of the AP activity on the surface of the strains after

incubation in immune sera by blocking the CP and lectin pathway (LP) with magnesium and EGTA (36, 37). As expected, this resulted in significantly lower overall levels of complement factors deposited on the bacteria. However, there was still significantly less C3 and MAC present on R3 and S3::R than S3 even in the absence of the CP and LP ( $P < 0.01$ ; Fig. 7, C and D, respectively), demonstrating that strains with enhanced resistance had reduced activity of the AP on their surface.



**Figure 7. Enhanced activity of the AP on sensitive strains.** Binding of C3 (A and C) and MAC (B and D) to bacteria detected by FACS analysis after incubation in immune human serum pooled from 10 donors. Results are shown as the MFI (calculated as geometric mean multiplied by the percentage of gated cells), and the error bars show the SEM. In B and D, strains were incubated with serum in the presence of magnesium and EGTA to block the CP and LP (-CP/LP). Error bars show the SEM of assays performed in triplicate. There was significantly less binding of complement factors to R3 and S3::R compared with S3.  $P < 0.01$  in all assays with the Student's  $t$  test.

If the increased amount of capsular polysaccharide inhibits the AP, this could provide a generic mechanism that protects the bacterium against bactericidal antibodies irrespective of the target antigen. We therefore tested the sensitivity of strains against a mAb against PorA (P1.5), an immunogenic outer membrane protein that elicits bactericidal antibodies (38). Although the mAb mediated lysis of the S strains with titers of 128 or 256, the titer against the R strains was  $<8$ ; these findings were confirmed in assays using a human complement source (Table S1) and are consistent with the lack of killing in the presence of antibodies raised against whole cells (Table I).

## DISCUSSION

We have identified MenC strains that have increased resistance against complement-mediated bacterial lysis, the most critical aspect of immunity against *N. meningitidis*. The strains belong to the ST-11 clone, which has spread across the world since first emerging in Canada (10, 12). The strains contain the identical genetic change in the *cps*, with *IS1301* inserted at the same site in the IGR between operons necessary for sialic acid biosynthesis and capsule export. None of the sensitive strains had this genetic change, and transfer of *IS1301* into the IGR of an S strain was sufficient to render it resistant to SBAs directed against the capsule, the outer membrane protein, PorA, and against whole cells.

There are numerous instances of bacteria avoiding immune killing through antigenic variation or by reducing expression of antigens on their surface. These mechanisms have been described for PorA, the major immunogen in outer membrane vesicle vaccines (39). A single amino acid change in this protein can affect the activity of bactericidal antibodies (40, 41), whereas changes in the length of homopolymeric tracts in the *porA* promoter or coding sequences can affect transcription or translation, respectively (42).

In contrast, our data demonstrate that insertion of *IS1301* in the *sia-ctr* IGR actually leads to an increase in the amount of the target antigen on the bacterial surface. However, the capsule is not only the target of the immune response but is also an important means by which bacteria are protected against complement-mediated killing. The reduced level of C3 bound to the strains with increased resistance in the absence of the CP and LP is in keeping with their enhanced resistance resulting from inhibition of the AP associated with increased capsule expression (32–34). The function of the AP is to amplify complement activation initiated by the CP and LP, or the spontaneous low level generation of C3b from C3 in the circulation (35). Therefore, inhibition of the AP reduces complement activation regardless of the initial stimulus. However, other mechanisms could also contribute, including elevated turnover and shedding of capsular antigen by the R strains (directing SBAs away from the bacterial surface). Furthermore, the enhanced capsule could also directly inhibit insertion of the MAC (a large multiprotein complex of around 1 mD) into the outer membrane, thereby preventing bacterial lysis (35, 43). Masking of subcapsular antigens might promote resistance against killing mediated by  $\alpha$ -PorA mAbs and antibodies raised against whole cells.

This is the first time that *IS1301* has been shown to increase gene expression in the meningococcus, although it has been described before in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (44). Instead, this element has been associated with reversible inactivation of genes, including *porA*, *siaA*, and *oatC* (23, 45, 46). ST-11/ET-15 isolates, which contain between 15 and 20 copies of *IS1301* (17), have caused outbreaks of meningococcal disease with high case fatality rates (47, 48). Although it is not known whether these strains are inherently more virulent, *IS1301* could have a significant impact on the pathogenesis of ET-15 infections by up-regulating expression of specific

virulence determinants, including capsule. The mechanisms by which *IS1301* increases mRNA levels of both *siaA* and *ctrA* are likely to be complex, as these genes are divergently transcribed from overlapping promoters (26, 27). Our preliminary data indicate that *IS1301* harbors promoter elements (unpublished data), although this does not exclude the possibility that the insertion displaces negatively acting regulators, as described previously (44).

The cryo-TEM technique we used (49) permitted visualization of bacteria without sectioning or contrast enhancement; ferritin was used to stain bacteria through its charge-based attraction to anionic capsules (31). The specificity of this method was demonstrated by the lack of staining of the capsule-negative mutant (Fig. 6). Strains R3 and S3::R produced more capsule compared with S3, consistent with FACS results (Fig. 5). Rather than being evenly distributed over the entire surface of the bacterium, the increased capsule in the R strains occasionally formed irregular extracellular aggregates, which might serve to divert bactericidal antibodies and complement factors away from the bacterial outer membrane. However, this appearance may be an artifact of TEM, and further studies are underway to measure the rates of capsule shedding by the strains.

Serogroups of *N. meningitidis* that express sialic acid-containing capsules present a significant threat to human health (13). There are no broadly effective, licensed vaccines against serogroup B *N. meningitidis*, which remains the leading cause of disease in North America and Europe. Serogroup W135 strains have caused large outbreaks of meningococcal disease in sub-Saharan Africa and the global spread of infection from the Hajj pilgrimage in 2000 (11), whereas serogroup Y infections have emerged as a major problem in North America (50). The *sia-ctr* IGR is present in all meningococcal serogroups that produce sialic acid capsules (23). Therefore, strains belonging to these serogroups could become capsule hyperproducers after acquisition of *IS1301* in the IGR by transformation.

Typing methods for the meningococcus do not routinely assess sensitivity to bactericidal antibodies, as this is a laborious task that is difficult to standardize (51). However, this information is vital for understanding the potential range of efficacy of novel vaccines, virulence mechanisms used by strains, and the molecular basis of the emergence of pathogenic clones. Clearly, the presence of *IS1301* in the *sia-ctr* IGR can be detected by PCR and could be used to screen for strains with increased resistance, which, as hyperproducers of capsular polysaccharide, could be valuable for vaccine manufacturing. Furthermore, this genetic change might explain some of the different behaviors of isolates in serum assays, as well as the variations obtained between laboratories.

From a collection of 109 strains from Spain, we identified three isolates with *IS1301* in the *siaA-ctrA* IGR. Although this insertion confers a marked survival advantage to strains in the presence of immune sera, there are several potential reasons why this change is not more widespread among isolates. First, it is possible that these strains may be effectively cleared by other immune mechanisms, such as opsonophagocytosis (52).

**Table II.** Isolates used in this study

Strain	Serogroup	Type	ST	Immunotype
C11	C	16:P1.7	345	1
S1 (13213)	C	2a:P1.5	11	2, 5
S2 (14624)	C	2a:P1.5	11	2, 5
S3 (14709)	C	2a:P1.5	11	n.k.
S4 (14715)	C	2a:P1.5	11	2, 5
S5 (14840)	C	2a:P1.5	11	2, 5
R1 (14654)	C	2a:P1.5	11	2, 5
R2 (16015)	C	2a:P1.5	11	n.k.
R3 (15967)	C	2a:P1.5	11	n.k.

Reference laboratory numbers are shown in parentheses. n.k., not known.

Second, the insertion sequence may have only recently inserted into the IGR, and this change might not have yet had the opportunity to spread among disease isolates. Finally, although increased expression of the capsule might be beneficial for survival in serum, there may be trade-offs in which the insertion of *IS1301* in the IGR is detrimental for the bacterium at other stages of its lifecycle. Sialic acid is synthesized from *N*-acetyl mannosamine and phosphoenol pyruvate (53). The latter is part of intermediary carbon metabolism, and channeling of phosphoenol pyruvate into capsule biosynthesis may lead to a reduced growth in certain environments; we have been unable to demonstrate a growth defect for the R strains in complete or defined media. Furthermore, the presence of capsule is known to inhibit pilus-mediated adhesion to human epithelial cells (54, 55), and a minor impairment of this critical step during colonization may provide sufficient selective pressure to prevent the widespread emergence of these strains with increased resistance against complement-mediated killing.

Many mechanisms can generate genetic diversity among meningococcal isolates. In contrast to other changes, insertion of *IS1301* in the *siaA-ctrA* IGR is a single genetic change that can provide strains with a generic mechanism for avoiding complement-mediated lysis, regardless of the nature of the target antigen. This is indicated by the increased resistance of the strains against killing mediated by the  $\alpha$ -Por mAb, mouse sera raised against whole bacteria, and human sera from vaccinees. However, it is not clear whether strains with this change will compromise the efficacy of meningococcal vaccines; polysaccharide vaccines have been available against MenC for >30 yr with no reports of emerging resistant strains to date. Despite this, studies are needed to examine the distribution and spread of strains with *IS1301* in the *siaA-ctrA* IGR during meningococcal carriage and disease, and before and after the implementation of immunization programs.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth.** *N. meningitidis* isolates used in this study are shown in Table II, and were characterized by their expression of surface antigens, *fumC* sequencing, and multilocus sequencing typing (20). Meningococcal strains were grown on brain heart infusion (BHI) medium with 5%

Levanthal's supplement. *Escherichia coli* was propagated on Luria-Bertani media with antibiotics as required.

**Molecular methods.** Genomic and plasmid DNA were extracted by standard methods, and PCRs were performed with Taq polymerase (Sigma-Aldrich). The oligonucleotides used in this study are shown in Table S2 (available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20072577/DC1>). For RNA isolation, bacteria were grown in a 10-ml volume in liquid BHI media with gentle agitation to midlogarithmic phase with an OD<sub>A600</sub> of ~0.6. Cells were harvested by centrifugation at 4,000 g, and RNA was extracted with the RNeasy mini kit (QIAGEN). Genomic DNA was removed by treatment with DNase (QIAGEN). 500 ng RNA was reverse transcribed to cDNA using the SuperScript III First-Strand Synthesis kit (Invitrogen). Transcript levels were measured by qRT-PCR using SensiMix with SYBR green detection (Quantace) on a thermal cycler (Rotor-Gene 3000; Corbett Research). Results for the transcription of *siaA* and *ctrA* were normalized with levels for the housekeeping gene *gdh*. The following primers were used to monitor transcript levels: NG770 and NG771 to generate a 221-bp *siaA* product; NG772 and NG773 to generate a 194-bp *ctrA* product; and NG886 and NG887 to generate a 235-bp *gdh* product. Data were analyzed using the comparative quantitation method by Rotor-Gene software (version 6.0; Corbett Research). Controls included reactions with no template and samples of RNA that had not been treated with RT. qRT-PCR was performed in triplicate on cDNA samples derived from three independent cultures.

Strains lacking *lst* and *siaD* have been described previously (56). For inactivation of *oatC*, a 2.2-kb fragment, including this gene, was amplified using primers NG541 and NG542. The product was ligated into pCR 2.1 Topo (Invitrogen), and the gene encoding kanamycin resistance was removed from the vector by *SphI* digestion and self-ligation. The resulting plasmid was subjected to in vitro mutagenesis with EZ-Tn5 (EPICENTRE), and the transposon insertion sites were mapped by sequencing. One plasmid, containing Tn5 at nucleotide 1,084 of the *oatC* open reading frame, was used for transformation. A similar strategy was used to mark IS1301 in the *siaA-ctrA* IGR before transfer into S3; a 1.6-kb fragment, including the IGR with IS1301 and part of *siaA* and *ctrA*, was amplified from strain R3 with primers NG679 and NG687, ligated into pCR 2.1 Topo, and the kanamycin-sensitive derivative was subjected to in vitro mutagenesis. Primers NG732 and NG733 were used to screen isolates for the presence of IS1301. Transformants were verified by PCR and Southern analysis.

**Western and FACS analyses.** For LPS analysis, whole-cell extracts were prepared in loading buffer, treated with proteinase K (QIAGEN), and subjected to Tricine SDS-PAGE analysis. LPS was subjected to Western analysis using mAb 3F11, which detects unsialylated LPS (provided by M. Apicella, University of Iowa, Iowa City, Iowa), as described previously (56). Antipeptide antibodies were generated by immunizing rabbits with a SiaA peptide (DVGTRQNNRHMGKSI) on three occasions, and the sera was affinity purified and used at a final dilution of 1:500. The anti-RecA antibody (Bio-Academia) was used at a 1:10,000 concentration. The secondary antibody was horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit Ig antibodies (1:10,000 concentration; Dako).

For FACS analysis, strains were grown to midlogarithmic phase in liquid media as in the previous section, collected by centrifugation, fixed in 3% paraformaldehyde for at least 1 h, and washed three times with PBS. Next, bacteria ( $2 \times 10^7$  cells) were incubated with a primary antibody at the following dilutions: mAb 1125 (provided by H. Claus, University of Würzburg, Würzburg, Germany) at a 1:500 dilution; and anticapsular sera at a 1:10 dilution in PBS for 30 min at 37°C. The cells were then washed twice, resuspended in PBS/0.1% Tween 20 (PBS-T) containing an FITC-conjugated donkey anti-mouse polyclonal antibody (1:200 dilution; Jackson Immuno-Research Laboratories), and incubated for 30 min on ice. After washing with PBS-T, fluorescence was measured using an analyzer (FACSCalibur; Becton Dickson), recording at least  $10^4$  events. The gate was set at ~2% of cells after incubation with PBS without a primary antibody. Results were

calculated as the MFI (calculated as geometric mean multiplied by the percentage of positive cells).

To assess the binding of complement factors, bacteria were grown and fixed to midlogarithmic phase in liquid culture, and  $2 \times 10^7$  cells were incubated with pooled immune sera from 10 vaccinees (1:5 dilution) for 30 min at 37°C, washed twice, and resuspended in PBS-T with FITC-conjugated polyclonal goat anti-human C3 (1:300 dilution; MP Biomedicals), or a polyclonal rabbit anti-human C5b-9 (1:200 dilution; EMD), which was detected with goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen). The activity of the CP and LP was inhibited in sera in the presence of 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 mM EGTA (37).

**SBA and serum assays.** SBA titers were measured according to standard protocols from the Centers for Disease Control (57). In brief, *N. meningitidis* was grown on solid media overnight and subcultured on plates for 4–5 h. Bacteria were harvested and resuspended in SBA buffer, and  $10^4$  bacteria were incubated for 1 h with serial dilutions of heat-inactivated (56°C for 30 min) vaccinees' serum in the presence of baby rabbit complement (Pelfreeze). The antiserosubtyping P1.5 mAb (hybridoma 4023; National Institute for Biological Standards and Control) was used in SBA assays to detect killing mediated against PorA. Control assays were performed without serum or without complement. The proportion of bacteria surviving was determined by plating to solid media. Assays were performed on four independent occasions, and results were given as the inverse of the highest dilution of serum that gave >50% killing of the input. SBA titers were also determined with human complement obtained from a patient with agammaglobulinaemia before he had received replacement therapy.

For serum assays, bacteria were grown in liquid media to midlogarithmic phase in liquid culture,  $10^4$  CFU was incubated with serial dilutions of pooled human immune serum (from 10 donors) for 1 h, and the proportion of bacteria surviving was determined (56). Control assays included sera inactivated by heating at 56°C for 30 min; significant differences were examined with the Student's *t* test.

**Electron microscopy.** Bacteria were grown overnight on solid media, harvested, and resuspended in PBS prewarmed to 37°C. An aliquot of the suspension was mixed with prewarmed, cationized ferritin (F7879; Sigma-Aldrich) to a final concentration of 0.5 mg/ml. Plasma-cleaned hydrophilic Quantifoil TEM grids (S143-8; Agar Scientific Ltd.) were floated on the sample and incubated for 30 min at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. Excess fluid was removed by wicking, and the samples were vitrified by plunging into liquid ethane (CPC; Leica) before being transferred into a liquid N<sub>2</sub>-cooled specimen holder (model 626; Gatan). A TEM (JEM-2100; JEOL) operating at 200 keV was used to record images on a 4,048 × 4,048-pixel charge-coupled device camera (Gatan). The cumulative electron dose was maintained at <55 electrons/Å<sup>2</sup>. The microscope was calibrated against a carbon waffle (Grating Replica, Waffle, 2160 lines/mm; Ted Pella Inc.).

**Capsule purification and NMR analysis.** Capsules were purified as described previously (18). In brief, bacteria were grown in 200 ml of BHI media overnight, and cetavlon (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 1% to lyse the bacteria and precipitate the polysaccharide. The precipitates were collected by centrifugation and resuspended in distilled water, and CaCl<sub>2</sub> was added to separate the polysaccharide from the detergent. Nucleic acids in the solution were removed by ethanol precipitation (25% vol/vol). The capsular polysaccharide in the supernatant was precipitated by ethanol at a final concentration of 80% (vol/vol); traces of cetavlon and CaCl<sub>2</sub> were removed by washing with 100% ethanol. NMR spectra (500MHz at 60°C in D<sub>2</sub>O) were recorded on a spectrometer (INOVA 500; Varian) using pulse sequences provided by the manufacturer (29, 58).

**Immunization.** Groups of 8-wk-old BABL/c mice were immunized with 0.1 ml of MCC vaccine (Wyeth Vaccines) by the subcutaneous route on days 0, 14, and 21. Serum was obtained from immunized animals on day 28.

The same schedule was used to generate immune sera from animals that were given  $10^7$  CFU of S3, R3, or S3::R by the intraperitoneal route in 250  $\mu$ l BHI on three occasions. Bacterial strains were grown overnight on solid media and harvested to PBS, and the number of CFU was determined by measuring the OD  $A_{260}$  of a lysate of cells in 0.1 M NaOH/1% SDS (56). All procedures were approved by a Home Office license.

**Online supplemental material.** Results of further SBAs are provided (Table S1), as well as primers and isolates used in this study (Table S2). Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20072577/DC1>.

We thank the staff from the Hospitals Severo Ochoa and Universitario Río Hortega an Complejo, and the Hospitalario de San Millán y San Pedro, who provided strains. We thank Luisa Arreaza, Elisabeth Kugelberg, David Holden, Samantha Sampson, Chris Jones, and Xavier Lemercinier for helpful discussions.

We are grateful to Meningitis UK, the Medical Research Council, and the Wellcome Trust for supporting the work in C.M. Tang's laboratory. M.J. Uria received scholarships from the Beca de Formación en Investigación/Fondo de Investigación Sanitaria and the Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, and R.M. Exley is a Leverhulme Trust Research Fellow.

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 6 December 2007

Accepted: 24 April 2008

## REFERENCES

- Ochman, H., J.G. Lawrence, and E.A. Groisman. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 405:299–304.
- Figueroa, J.E., and P. Densen. 1991. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:359–395.
- Schneider, M.C., R.M. Exley, S. Ram, R.B. Sim, and C.M. Tang. 2007. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends Microbiol.* 15:233–240.
- Goldschneider, I., E.C. Gotschlich, and M.S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J. Exp. Med.* 129:1307–1326.
- Zollinger, W. 1997. New and improved vaccines against meningococcal vaccines. In *New Generation Vaccines*. Second edition. M.M. Levine, G.C. Woodrow, J.B. Kaper, and G.S. Cobon, editors. Marcel Dekker, Inc., New York. 469–488.
- Richmond, P., R. Borrow, E. Miller, S. Clark, F. Sadler, A. Fox, N. Begg, R. Morris, and K. Cartwright. 1999. Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and primes for memory. *J. Infect. Dis.* 179:1569–1572.
- De Wals, P. 2004. Meningococcal C vaccines: the Canadian experience. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23:S280–S284.
- Trotter, C.L., and M.E. Ramsay. 2007. Vaccination against meningococcal disease in Europe: review and recommendations for the use of conjugate vaccines. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:101–107.
- Miller, E., D. Salisbury, and M. Ramsay. 2001. Planning, registration, and implementation of an immunisation campaign against meningococcal serogroup C disease in the UK: a success story. *Vaccine*. 20(Suppl. 1):S58–S67.
- Whalen, C.M., J.C. Hockin, A. Ryan, and F. Ashton. 1995. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis*. *JAMA*. 273:390–394.
- Taha, M.K., M. Achtman, J.M. Alonso, B. Greenwood, M. Ramsay, A. Fox, S. Gray, and E. Kaczmarski. 2000. Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet*. 356:2159.
- Traore, Y., B.M. Njanpop-Lafourcade, K.L. Adjogble, M. Lourd, S. Yaro, B. Nacro, A. Drabo, I. Parent du Chatelet, J.E. Mueller, M.K. Taha, et al. 2006. The rise and fall of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup W135 meningitis in Burkina Faso, 2002–2005. *Clin. Infect. Dis.* 43:817–822.
- Jodar, L., I.M. Feavers, D. Salisbury, and D.M. Granoff. 2002. Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet*. 359:1499–1508.
- Goldschneider, I., E.C. Gotschlich, and M.S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J. Exp. Med.* 129:1327–1348.
- Trotter, C.L., N.J. Andrews, E.B. Kaczmarski, E. Miller, and M.E. Ramsay. 2004. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet*. 364:365–367.
- Maiden, M.C., and B.G. Spratt. 1999. Meningococcal conjugate vaccines: new opportunities and new challenges. *Lancet*. 354:615–616.
- Elias, J., and U. Vogel. 2007. IS1301 fingerprint analysis of *Neisseria meningitidis* strains belonging to the ET-15 clone. *J. Clin. Microbiol.* 45:159–167.
- 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.
- Maslanka, S.E., L.L. Gheesling, D.E. Libutti, K.B. Donaldson, H.S. Harakeh, J.K. Dykes, F.F. Arhin, S.J. Devi, C.E. Frasch, J.C. Huang, et al. 1997. Standardization and a multilaboratory comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup A and C serum bactericidal assays. The Multilaboratory Study Group. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:156–167.
- Maiden, M.C., J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, et al. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:3140–3145.
- Vogel, U., and M. Frosch. 1999. Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol. Microbiol.* 32:1133–1139.
- Mandrell, R.E., R. McLaughlin, Y. Aba Kwaik, A. Lesse, R. Yamasaki, B. Gibson, S.M. Spinola, and M.A. Apicella. 1992. Lipooligosaccharides (LOS) of some *Haemophilus* species mimic human glycosphingolipids, and some LOS are sialylated. *Infect. Immun.* 60:1322–1328.
- Claus, H., R. Borrow, M. Achtman, G. Morelli, C. Kandelberg, E. Longworth, M. Frosch, and U. Vogel. 2004. Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. *Mol. Microbiol.* 51:227–239.
- Edwards, U., A. Muller, S. Hammerschmidt, R. Gerardy-Schahn, and M. Frosch. 1994. Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol. Microbiol.* 14:141–149.
- 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.
- Swartley, J.S., J.H. Ahn, L.J. Liu, C.M. Kahler, and D.S. Stephens. 1996. Expression of sialic acid and polysialic acid in serogroup B *Neisseria meningitidis*: divergent transcription of biosynthesis and transport operons through a common promoter region. *J. Bacteriol.* 178:4052–4059.
- von Loewenich, F.D., E. Wintermeyer, M. Dumig, and M. Frosch. 2001. Analysis of transcriptional control mechanisms of capsule expression in *Neisseria meningitidis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:361–369.
- Hilse, R., J. Stoevesandt, D.A. Caugant, H. Claus, M. Frosch, and U. Vogel. 2000. Distribution of the meningococcal insertion sequence IS1301 in clonal lineages of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol. Infect.* 124:337–340.
- Lemercinier, X., and C. Jones. 1996. Full 1H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. *Carbohydr. Res.* 296:83–96.
- Martin, P., T. van de Ven, N. Mouchel, A.C. Jeffries, D.W. Hood, and E.R. Moxon. 2003. Experimentally revised repertoire of putative contingency loci in *Neisseria meningitidis* strain MC58: evidence for a novel mechanism of phase variation. *Mol. Microbiol.* 50:245–257.
- Anderson, K.L. 1998. Cationized ferritin as a stain for electron microscopic observation of bacterial ultrastructure. *Biotech. Histochem.* 73:278–288.
- 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.
- 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.
- Pluschke, G., J. Mayden, M. Achtman, and R.P. Levine. 1983. Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect. Immun.* 42:907–913.

35. Walport, M.J. 2001. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344:1058–1066.
36. Drogari-Apiranthitou, M., E.J. Kuijper, N. Dekker, and J. Dankert. 2002. Complement activation and formation of the membrane attack complex on serogroup B *Neisseria meningitidis* in the presence or absence of serum bactericidal activity. *Infect. Immun.* 70:3752–3758.
37. Jongerius, I., J. Kohl, M.K. Pandey, M. Ruyken, K.P. van Kessel, J.A. van Strijp, and S.H. Rooijakkers. 2007. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J. Exp. Med.* 204:2461–2471.
38. Borrow, R., P. Balmer, and E. Miller. 2005. Meningococcal surrogates of protection—serum bactericidal antibody activity. *Vaccine.* 23:2222–2227.
39. Bjune, G., E.A. Hoiby, J.K. Gronnesby, O. Arnesen, J.H. Fredriksen, A. Halstensen, E. Holten, A.K. Lindbak, H. Nokleby, E. Rosenqvist, et al. 1991. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet.* 338:1093–1096.
40. Suker, J., I.M. Feavers, M. Achtman, G. Morelli, J.F. Wang, and M.C. Maiden. 1994. The porA gene in serogroup A meningococci: evolutionary stability and mechanism of genetic variation. *Mol. Microbiol.* 12:253–265.
41. Martin, S.L., R. Borrow, P. van der Ley, M. Dawson, A.J. Fox, and K.A. Cartwright. 2000. Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine.* 18:2476–2481.
42. van der Ende, A., C.T. Hopman, and J. Dankert. 2000. Multiple mechanisms of phase variation of PorA in *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 68:6685–6690.
43. Joiner, K.A., M.A. Schmetz, M.E. Sanders, T.G. Murray, C.H. Hammer, R. Dourmashkin, and M.M. Frank. 1985. Multimeric complement component C9 is necessary for killing of *Escherichia coli* J5 by terminal attack complex C5b-9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:4808–4812.
44. Mitchell, C., L. Gao, and D.R. Demuth. 2003. Positive and negative cis-acting regulatory sequences control expression of leukotoxin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 652. *Infect. Immun.* 71:5640–5649.
45. Hammerschmidt, S., R. Hilde, J.P. van Putten, R. Gerardy-Schahn, A. Unkmeir, and M. Frosch. 1996. Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J.* 15:192–198.
46. Newcombe, J., K. Cartwright, S. Dyer, and J. McFadden. 1998. Naturally occurring insertional inactivation of the porA gene of *Neisseria meningitidis* by integration of IS1301. *Mol. Microbiol.* 30:453–454.
47. Tribe, D.E., A.M. Zaia, J.M. Griffith, P.M. Robinson, H.Y. Li, K.N. Taylor, and G.G. Hogg. 2002. Increase in meningococcal disease associated with the emergence of a novel ST-11 variant of serogroup C *Neisseria meningitidis* in Victoria, Australia, 1999–2000. *Epidemiol. Infect.* 128:7–14.
48. Tsang, R.S., C.M. Tsai, P. Zhu, L. Ringuette, M. Lorange, and D.K. Law. 2004. Phenotypic and genetic characterization of a unique variant of serogroup C ET-15 meningococci (with the antigenic formula C:2a:P1.7.1) causing invasive meningococcal disease in Quebec, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 42:1460–1465.
49. Chiu, W. 1986. Electron microscopy of frozen, hydrated biological specimens. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15:237–257.
50. McEllistrem, M.C., J.A. Kolano, M.A. Pass, D.A. Caugant, A.B. Mendelsohn, A.G. Fonseca Pacheco, K.A. Shutt, J. Razeq, and L.H. Harrison. 2004. Correlating epidemiologic trends with the genotypes causing meningococcal disease, Maryland. *Emerg. Infect. Dis.* 10:451–456.
51. Jolley, K.A., C. Brehony, and M.C. Maiden. 2007. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:89–96.
52. Welsch, J.A., and D. Granoff. 2004. Naturally acquired passive protective activity against *Neisseria meningitidis* Group C in the absence of serum bactericidal activity. *Infect. Immun.* 72:5903–5909.
53. Ganguli, S., G. Zapata, T. Wallis, C. Reid, G. Boulnois, W.F. Vann, and I.S. Roberts. 1994. Molecular cloning and analysis of genes for sialic acid synthesis in *Neisseria meningitidis* group B and purification of the meningococcal CMP-NeuNAc synthetase enzyme. *J. Bacteriol.* 176:4583–4589.
54. 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.
55. Virji, M., K. Makepeace, I.R. Peak, D.J. Ferguson, M.P. Jennings, and E.R. Moxon. 1995. Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol. Microbiol.* 18:741–754.
56. Exley, R.M., J. Shaw, E. Mowe, Y.H. Sun, N.P. West, M. Williamson, M. Botto, H. Smith, and C.M. Tang. 2005. Available carbon source influences the resistance of *Neisseria meningitidis* against complement. *J. Exp. Med.* 201:1637–1645.
57. Maslanka, S.E., J.W. Tappero, B.D. Plikaytis, R.S. Brumberg, J.K. Dykes, L.L. Gheesling, K.B. Donaldson, A. Schuchat, J. Pullman, M. Jones, et al. 1998. Age-dependent *Neisseria meningitidis* serogroup C class-specific antibody concentrations and bactericidal titers in sera from young children from Montana immunized with a licensed polysaccharide vaccine. *Infect. Immun.* 66:2453–2459.
58. Jones, C., and X. Lemercinier. 2002. Use and validation of NMR assays for the identity and O-acetyl content of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine manufacture. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30:1233–1247.