

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 846 794**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2015** **PCT/EP2015/076892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016** **WO16079157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2015** **E 15798013 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2020** **EP 3221348**

54 Título: **Anticuerpos policlonales específicos para el serogrupo X de N. meningitidis y usos de los mismos en el diagnóstico**

30 Prioridad:

18.11.2014 EP 14306832

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.07.2021

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (100.0%)
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15, FR**

72 Inventor/es:

**TAHA, MUHAMED-KHEIR;
AGNEMEMEL, ALAIN;
TRAINCARD, FRANÇOIS y
MULARD, LAURENCE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 846 794 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos policlonales específicos para el serogrupo X de *N. meningitidis* y usos de los mismos en el diagnóstico

- 5 La presente invención pertenece al dominio de la detección bacteriana, específicamente detección de *Neisseria meningitidis* (Nm) serogrupo X y kits de diagnóstico que permitan la detección de dicho serogrupo, preferentemente en una muestra biológica.

10 *Neisseria meningitidis* (Nm) es una bacteria encapsulada exclusivamente humana que puede provocar infecciones invasivas graves como meningitis y septicemia (1). La enfermedad meningocócica sigue siendo un problema de salud pública importante debido a la posible propagación de una epidemia. Si bien la enfermedad se presenta esporádicamente en Europa y América del Norte, es responsable de las principales epidemias recurrentes en África, que ocurren generalmente en pequeños grupos, con variación estacional.

15 La mayor incidencia de enfermedad meningocócica se produce en un área del África subsahariana conocida como el cinturón africano de la meningitis (2), que se extiende desde Senegal en el oeste hasta Etiopía en el este. Durante la estación seca, vientos de polvo, noches frías e infecciones del tracto respiratorio superior se combinan para dañar la mucosa nasofaríngea, aumentando el riesgo de enfermedad meningocócica. Además, la transmisión de *N. meningitidis* puede ser facilitada por viviendas superpobladas y por grandes desplazamientos de población a nivel regional debido a peregrinaciones y mercados tradicionales. Esta combinación de factores explica las grandes epidemias que ocurren durante la estación seca en el cinturón de la meningitis.

20 El polisacárido capsular bacteriano determina los 12 serogrupos de Nm actualmente descritos. Seis serogrupos (A, B, C, Y, W y X) son responsables de la gran mayoría de los casos de enfermedad meningocócica en todo el mundo. Sin embargo, difieren en sus frecuencias globales y distribución geográfica (3). Esta distribución afecta a las estrategias de vacunación, que en su mayor parte implican las vacunas establecidas a base de polisacáridos contra los serogrupos A, C, Y y W. Además, recientemente se ha autorizado en Europa y Australia una vacuna innovadora basada en proteínas recombinantes contra los meningococos del serogrupo B (4). Esta vacuna multicomponente se dirige a las proteínas conservadas entre los meningococos independientemente de su serogrupo. Por tanto, tiene el potencial de cubrir aislamientos que no pertenecen al serogrupo B, como los del serogrupo X (5). En el cinturón de la meningitis, el serogrupo A de *N. meningitidis* el (NmA) predominó antes de la introducción de la vacuna conjugada de polisacárido-proteína NmA (MenAfriVac™) (6), mientras que otros serogrupos, principalmente los serogrupos W (NmW) y X (NmX), también fueron detectados y todavía lo son. De particular preocupación, en África se notificaron recientemente brotes debidos a aislamientos de NmW y NmX (7-9). La vigilancia de la distribución de los serogrupos meningocócicos es, por tanto, importante y su exhaustividad se beneficiará de las herramientas de diagnóstico que se pueden utilizar ampliamente junto al enfermo.

35 De hecho, la estrategia de la OMS para el control de la enfermedad meningocócica epidémica, especialmente en el cinturón de meningitis se basa en una detección precoz y precisa y una rápida implementación de la vacunación masiva mediante vacunas contra los serogrupos adecuados. Por tanto, es imperativo identificar de forma rápida y fiable los serogrupos implicados en la infección meningocócica, para seleccionar la vacuna más adecuada. Esta vacunación adecuada permite el control de la propagación clonal epidémica y, por tanto, juega un papel fundamental en la limitación de la incidencia de los brotes. Un error en la detección del serogrupo perjudica y retrasa la eficacia de este control, enfatizando la importancia de la sensibilidad y especificidad de la determinación del serogrupo.

45 Generalmente se aplican dos estrategias para detectar los serogrupos de *N. meningitidis* implicados en una infección meningocócica. El primero es el cultivo clásico con posterior identificación de serogrupos mediante antisueros específicos. El segundo se basa en la detección directa de los serogrupos en una muestra biológica de los individuos diagnosticados o afectados.

50 Con respecto al aislamiento cultural, esta técnica, con serogrupo de cepas mediante antisueros inmunes específicos, se considera generalmente como uno de los estándares de referencia para la identificación de serogrupos de *N. meningitidis*, ya que esta técnica generalmente se considera específica. Sin embargo, necesita un laboratorio bien equipado con técnicos especializados para el cultivo, lo que hace que esta técnica esté mal adaptada a la detección de campo, especialmente en África, donde las instalaciones del laboratorio puedan estar a cierta distancia del área de recolección de muestras, requiriendo condiciones especiales de transporte y conservación de las muestras. El tiempo necesario para la transferencia de la muestra, así como las condiciones cálidas y polvorosas que se experimentan durante la temporada de meningitis, pueden provocar altos niveles de contaminación de la muestra. Además, la antibioterapia precoz recomendada en caso de sospecha de infección disminuye la eficacia de este método. También se ha documentado que los antisueros específicos, utilizados para la identificación de serogrupos en cepas, no detectan con precisión el serogrupo X y/o dan lugar a puntuaciones falsas positivas (informe de Afssaps, 25 de noviembre de 2009, por la Dra. Natacha Charler-Bret).

65 En cuanto a las pruebas sin cultivo, dependen de la detección inmune o de la detección genética. La detección genética se lleva a cabo generalmente mediante el método de PCR multiplexada. Este método es muy específico y muy sensible. Sin embargo, se necesitan varias horas antes de que se pueda obtener un resultado. Además, esta técnica es cara y requiere laboratorios bien equipados con técnicos especializados; por tanto, este método no se adapta bien a las condiciones del campo.

Las pruebas sin cultivo basadas en la detección inmune de *N. meningitidis* hasta hace poco tiempo se limitaban esencialmente a las pruebas de aglutinación de látex en líquido cefalorraquídeo (LCR), tales como Pastorex (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Las pruebas de aglutinación del látex son rápidas, sensibles, menos laboriosas y mucho menos costosas que las pruebas de cultivo de rutina. Sin embargo, estas pruebas no se recomiendan de forma rutinaria, porque no diferencian entre los serogrupos W (anteriormente conocido como W135) e Y, no detectan el serogrupo X, y su desempeño en condiciones de campo que carecen de equipo básico de laboratorio es presumiblemente débil. Además, estos kits requieren almacenamiento en frío y técnicos bien capacitados para la lectura y pueden dar como resultado algunos indeterminados, falsos negativos y falsos positivos.

Recientemente, se ha desarrollado y validado una prueba de diagnóstico rápido (PDR) con tira reactiva de inmunocromatografía para la identificación de *N. meningitidis* serogrupos A, C, Y y W (10-11). Este importante logro fue un primer paso para mejorar el diagnóstico junto al enfermo de la infección meningocócica en Níger, un país dentro del cinturón de la meningitis (10,12). Sin embargo, esta prueba no identifica el serogrupo X.

Si bien NmX sigue siendo poco común en Europa (13), su creciente importancia en el cinturón de la meningitis favorece la autorización de un dispositivo de diagnóstico eficaz contra la infección por NmX, así como los estudios en curso hacia una vacuna basada en polisacáridos NmX (14). Por tanto, existe la necesidad de un método que proporcione la detección fiable del serogrupo X de *N. meningitidis*, y especialmente para un método que es rápido, lo que preferentemente no requiere laboratorios bien equipados con técnicos especializados, y también preferentemente no es costoso, y por lo tanto se puede usar ventajosamente en condiciones de campo. También existe la necesidad de proporcionar anticuerpos que sean capaces de detectar el grupo X de *N. meningitidis* con alta sensibilidad y especificidad.

Los presentes inventores han obtenido inesperadamente anticuerpos policlonales, que son altamente específicos para los polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* serogrupo X y puede detectar estos polisacáridos con una sensibilidad mejorada. Estos anticuerpos son, entre otros, muy adecuados para detectar este serogrupo en los fluidos corporales, sin cultivo, lo que permite una prueba de diagnóstico rápido (PDR) para la detección de aislados de NmX. Este tipo de PDR se puede utilizar para el diagnóstico y la vigilancia de meningitis meningocócica en el cinturón de meningitis.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se dirige, por tanto, a anticuerpos policlonales, que son específicos para los polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* serogrupo X (NmX) tal como se define en las reivindicaciones. Estos anticuerpos policlonales según la invención son, por tanto, adecuados para la detección *in vitro* de *Neisseria meningitidis* serogrupo X en fluidos biológicos, sin requerir ninguna etapa de cultivo. Los anticuerpos policlonales son, por tanto, adecuados para detectar antígenos solubles de NmX, en fluidos biológicos.

Los anticuerpos policlonales pueden comprender al menos dos anticuerpos diferentes dirigidos específicamente a los polisacáridos capsulares de NmX, preferentemente diferentes epítomos de estos polisacáridos característicos de NmX. Los anticuerpos policlonales de la invención comprenden preferentemente más de 10, 20, 50 o incluso 100 anticuerpos distintos, dirigidos a los polisacáridos capsulares de NmX.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, los anticuerpos policlonales tal como se definen son anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG). Mientras que otros tipos de inmunoglobulinas pueden estar presentes, los anticuerpos policlonales según la invención son principalmente inmunoglobulinas G, por ejemplo, más del 80 % de los anticuerpos policlonales según la invención son IgG, preferentemente más del 85 %, 90 % o el 95 %, incluso preferentemente más del 98 % o el 99 % de los anticuerpos policlonales son IgG. Los anticuerpos policlonales se pueden obtener, por ejemplo, por inmunización de un animal, preferentemente un animal no humano. Los animales adecuados según la presente realización son pollos o mamíferos, especialmente conejo, ratón, cabra, cobayas, hámster, caballo, rata, alpaca u oveja. De acuerdo con una realización más preferida de la invención, los anticuerpos son anticuerpos policlonales de conejo, caballo o alpaca, lo más preferentemente anticuerpos policlonales de conejo; los anticuerpos policlonales se aíslan así de un animal no humano inmunizado, que es preferente un conejo, un caballo o una alpaca, y más preferentemente un conejo. Los anticuerpos policlonales se pueden aislar de uno o más de un animal; por ejemplo, los anticuerpos policlonales pueden ser una mezcla de anticuerpos policlonales aislados de 2, 3 o más conejos, o 2, 3 o más ratones. También se prevé en el contexto de la presente invención que los anticuerpos policlonales se aíslan de al menos 2 tipos diferentes de animales, por ejemplo, aislado de una alpaca inmunizada y un conejo inmunizado.

Los anticuerpos policlonales de la invención se pueden obtener mediante la inmunización de un animal, y preferentemente de un mamífero, con bacterias NmX completas, seguido de una purificación del suero aislado de dicho animal, preferentemente un mamífero, por cromatografía de afinidad con polisacáridos capsulares de NmX. De acuerdo con la presente realización, el animal o mamífero que se utilizará para la inmunización es un animal no humano; los animales preferidos son, tal como se desvela anteriormente, entre otros, pollo, conejo, ratón, cabra, cobayas, hámster, caballo, rata, alpaca u oveja.

Las bacterias NmX que se utilizarán para la etapa de inmunización se inactivan antes de la administración a los animales, por ejemplo por calor, química o radiación.

Con respecto a la etapa de cromatografía de afinidad, se lleva a cabo preferentemente con polisacáridos capsulares puros de *Neisseria meningitidis* serogrupo X como ligando, es decir, con polisacáridos NmX en ausencia de polisacáridos de otras bacterias, en ausencia de proteínas y de ácidos nucleicos.

Como se ha desvelado anteriormente, de acuerdo con una realización preferida, es probable que los anticuerpos policlonales de la invención se obtengan mediante la inmunización de uno o varios conejos, preferentemente con NmX completo inactivado, seguido de cromatografía de afinidad sobre polisacáridos NmX purificados, preferentemente en una columna cargada con polisacáridos NmX purificados. Los polisacáridos NmX se pueden purificar tal como se ilustra en la sección experimental, y su pureza se puede comprobar tal como se menciona en los ejemplos siguientes, por ejemplo por RMN.

Los anticuerpos policlonales según la invención no reaccionan de forma cruzada con otros tipos de bacterias; especialmente no reaccionan de forma cruzada con *E. coli*, *H. influenza*, *S. pneumonia*. Los anticuerpos policlonales tampoco reaccionan de forma cruzada con ningún serogrupo de *Neisseria meningitidis* que no sea el serogrupo X. Entre otros, no reaccionan de forma cruzada con ninguno de los otros 11 serogrupos identificados para *N. meningitidis*, a saber, los serogrupos A, B, C, Y, W (anteriormente conocido como W135), Z, E (anteriormente conocido como 29E), H, I, K y L.

Los anticuerpos policlonales de la invención son, por tanto, altamente específicos para el serogrupo X de *Neisseria meningitidis* y permiten así la detección específica de este serogrupo y permiten la distinción entre este serogrupo y cualquier otro serogrupo. En este sentido, cabe mencionar que la especificidad de los anticuerpos policlonales de la invención es una característica compartida por todos los anticuerpos que constituyen estos anticuerpos policlonales, es decir, todas son específicas para NmX y no reaccionan de forma cruzada con ninguna otra bacteria o cualquier otro serogrupo de *N. meningitidis*.

En cambio, los anticuerpos contra NmX conocidos antes de la presente invención, no son completamente específicos para NmX y, por lo tanto, se han desvelado como reactivos cruzados con otros serogrupos de *N. meningitidis* (Afssaps report, 25 de noviembre de 2009, por la Dra. Natacha Charler-Bret).

Además, ninguno de los anticuerpos anteriores fue validado para la detección de antígenos solubles de NmX, siendo así mucho menos sensible que los anticuerpos de la invención.

La invención también está dirigida a un agente de diagnóstico, correspondiente a los anticuerpos policlonales de la invención, específico para NmX, unido a un marcador de detección. El enlace entre los anticuerpos policlonales y el marcador de detección puede ser cualquier tipo de enlace, bien directo o indirecto, por ejemplo a través de otra molécula o soporte. El enlace puede ser un enlace no covalente, por ejemplo, basado en fuerzas electrostáticas, o puede ser un enlace covalente. De acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos policlonales, o al menos el 50 % de dichos anticuerpos, se unen mediante un enlace covalente a un marcador de detección.

Un marcador de detección tal como se usa en el presente documento consiste en o comprende preferentemente un grupo reportero, seleccionado, por ejemplo, de enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, colorantes, radioisótopos, grupos luminiscentes, fluoróforos, indicadores colorimétricos, partículas de oro, partículas de látex y biotina. También se puede utilizar ventajosamente cualquier otro grupo reportero. Tal grupo reportero permite la revelación del marcador de detección y, por tanto, de los anticuerpos unidos a dicho marcador de detección. La forma de revelar el grupo de reporteros depende, por supuesto, del grupo de reporteros.

En el contexto de la presente invención, los anticuerpos policlonales, o al menos la mayoría de los mismos, están preferentemente unidos a partículas de oro, especialmente cuando se van a utilizar en pruebas de diagnóstico rápido, como una prueba con tira reactiva. De esta manera, se pueden visualizar en un soporte sólido sin dificultad, sin necesidad de equipos específicos, y muy rápidamente.

Los anticuerpos policlonales según la invención son de hecho especialmente adecuados para la detección soluble de antígenos de NmX, permitiendo así la detección específica de NmX, es decir, permitir la discriminación del serogrupo X de otros serogrupos.

En el presente documento se desvelan diferentes métodos para la detección de NmX, siendo la detección específica para el serogrupo X, lo que permite la discriminación entre este serogrupo y otros serogrupos de *Neisseria meningitidis*. De acuerdo con una realización preferida de dicho método, la detección se debe realizar en un fluido biológico, entre otros, obtenido de un paciente afectado o sospechoso de estar afectado por una infección por meningitis; es decir, sin una etapa de cultivo. Dicho método comprende la etapa de poner en contacto el fluido con anticuerpos policlonales según la invención o con el agente de diagnóstico de la invención, y la etapa de determinar la presencia o ausencia de antígenos NmX en el fluido.

El método descrito se debe realizar preferentemente *in vitro* o *ex vivo*. Se realiza así la primera etapa de poner en contacto el fluido con los anticuerpos policlonales *in vitro* o *ex vivo*. Los anticuerpos policlonales se enlazan ventajosamente a un marcador de detección, tal como se ha desvelado anteriormente. Los antígenos de NmX son polisacáridos de NmX, específicamente polisacáridos capsulares de NmX. Los antígenos que probablemente

reaccionen con los anticuerpos policlonales de la invención son ventajosamente antígenos solubles de NmX presentes en el fluido biológico.

La presencia o ausencia de antígenos NmX se puede determinar mediante cualquier medio apropiado conocido por el experto en la técnica; esto depende principalmente del marcador de detección adherido a los anticuerpos policlonales de la invención. De acuerdo con una realización preferida, la presencia o ausencia de antígenos solubles de NmX se puede determinar mediante una simple inspección visual, por ejemplo de la muestra de fluido en presencia de los anticuerpos policlonales, o por inspección visual de un soporte sólido previamente puesto en contacto con la muestra biológica y con los anticuerpos policlonales. Como alternativa, se puede utilizar cualquier otro medio apropiado, por ejemplo para cuantificar la interacción entre los anticuerpos policlonales y el fluido biológico.

De acuerdo con una realización preferida del método, la segunda etapa para determinar la presencia o ausencia de NmX se lleva a cabo mediante la detección de la presencia o ausencia de un complejo, específicamente un complejo inmunológico, formado entre los anticuerpos policlonales y los antígenos solubles de NmX.

En una realización, el método comprende el uso de un componente de detección que es específico para los anticuerpos policlonales de la invención y, por tanto, permite la detección de dichos anticuerpos, incluso unidos a sus dianas. Como una ilustración, si se utilizan anticuerpos policlonales de conejo para llevar a cabo la invención, el componente de detección es, por ejemplo, anticuerpos anti-conejo en ratón o cabra, permitiendo así la detección de la presencia de los anticuerpos policlonales de la invención. De acuerdo con la presente realización, los antígenos de NmX presentes en la muestra están preferentemente inmovilizados, de tal manera que la detección de los anticuerpos policlonales de la invención, después de etapas de lavado, es indicativo de la presencia de antígenos de NmX.

En otra realización alternativa, el método comprende el uso de un componente de detección que es específico para los antígenos de NmX, por ejemplo, dicho componente puede comprender anticuerpos policlonales de acuerdo con la invención. Como una ilustración, si se utilizan anticuerpos policlonales unidos a un marcador de detección en la primera etapa de contacto, los mismos anticuerpos policlonales, sin marcar pero inmovilizados sobre un soporte sólido, se pueden usar, por ejemplo, para detectar la presencia del complejo entre los anticuerpos policlonales marcados de la invención y los antígenos solubles de NmX.

El método se utilizará para la detección específica de NmX, es decir, el método permite determinar si los antígenos de NmX están presentes o ausentes en el fluido biológico considerado, independientemente de cualquier otro serogrupo de *Neisseria meningitidis* o cualquier otra bacteria que probablemente también esté presente en dicho fluido.

El fluido biológico que se utilizará para llevar a cabo el método es cualquier fluido biológico apropiado en el que es probable que se encuentren antígenos de NmX en caso de infección por meningitis. Los fluidos apropiados son, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero, orina, líquido articular, líquido pericárdico y líquido pleural. Los medios de detección se deben adaptar al fluido considerado y a la concentración de antígenos de NmX que probablemente estén presentes. Los fluidos biológicos preferidos son el líquido cefalorraquídeo, sangre, suero y orina, y lo más preferentemente, líquido cefalorraquídeo. De acuerdo con una realización preferida, la invención está dirigida a un método *in vitro* para diagnosticar una infección por *Neisseria meningitidis* serogrupo X en un sujeto, que comprende llevar a cabo el método definido anteriormente, en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto. Preferentemente, dicho sujeto está afectado por meningitis o se sospecha que está afectado, ya sea porque el sujeto presenta algunos síntomas indicativos de meningitis, o porque el sujeto ha estado en contacto con personas afectadas.

Según este método de diagnóstico, la presencia de antígenos de *Neisseria meningitidis* serogrupo X en la muestra es indicativo de infección por *Neisseria meningitidis* serogrupo X.

La muestra es preferentemente una muestra de un fluido biológico tal como se detalla anteriormente, y especialmente una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de sangre o una muestra de orina. El volumen de la muestra puede ser muy pequeño, en la medida en que el método de diagnóstico según la invención no requiera ninguna etapa de cultivo de bacterias de dicha muestra, unos pocos ml pueden ser suficientes o incluso una cantidad menor. Por ejemplo, la muestra es 150 µl de fluido biológico cuando el método de diagnóstico se lleva a cabo tal como se describe en los Ejemplos.

La muestra utilizada para llevar a cabo el método de la invención se ha obtenido preferentemente del sujeto en condiciones estériles. Es muy preferido que el método se lleve a cabo en las horas siguientes a la toma de muestras del fluido. Como alternativa, la muestra se puede almacenar en condiciones estériles, preferentemente en el frío, hasta que se lleve a cabo el método de diagnóstico de la invención.

Según un tercer aspecto, la presente invención está dirigida a un kit de diagnóstico para detectar *Neisseria meningitidis* serogrupo X. Dicho kit de diagnóstico comprende anticuerpos policlonales de la invención, o dichos anticuerpos policlonales unidos directa o indirectamente, covalentemente o no covalentemente a un marcador de detección, que se corresponde con un agente de diagnóstico tal como se define anteriormente. Los anticuerpos policlonales de acuerdo con la invención se encuentran en forma libre, soluble, o se inmovilizan sobre un soporte.

De acuerdo con una realización preferida, el kit también comprende un medio para detectar la producción de un complejo inmune entre dichos anticuerpos y antígenos de NmX. Dichos medios pueden ser de cualquier tipo, puede ser, por ejemplo, anticuerpos específicos para uno u otro socio del complejo inmune, es decir, anticuerpos dirigidos a los polisacáridos capsulares de NmX o anticuerpos dirigidos a los anticuerpos policlonales del kit. Los medios adecuados también comprenden cualquier medio que detecte la formación de un complejo basándose en las propiedades del inmunocomplejo formado, por ejemplo su peso, su tamaño, etc. De acuerdo con una realización preferente del kit de diagnóstico de la invención, el kit es para detectar NmX en una muestra de fluido biológico, sin ninguna etapa de cultivo, especialmente sin cultivo de bacterias. Un kit de este tipo se puede utilizar, por ejemplo, inmediatamente después del muestreo, sin el retraso habitual debido al cultivo en caso de detección del serogrupo X, que era estrictamente necesario antes de la presente invención.

Se han detallado anteriormente muestras adecuadas de fluidos biológicos, que incluyen líquido cefalorraquídeo, sangre, suero, orina, líquido articular, líquido pericárdico y líquido pleural. Los fluidos preferidos para los kits de diagnóstico de la invención son el líquido cefalorraquídeo, sangre, suero y orina, y más preferentemente líquido cefalorraquídeo.

Con kits de diagnóstico de la invención, la detección se realiza mediante inmunoensayo, aprovechando una reacción inmunológica de los antígenos NmX con los anticuerpos policlonales de la invención.

En este sentido, se puede usar un inmunoensayo en el contexto de la presente invención, para detectar antígenos de NmX en una muestra de fluido biológico, ya sea de manera cualitativa (positiva o negativa) o cuantitativa (medición de la cantidad). Se han desarrollado muchos inmunoensayos diferentes, que son altamente adaptables y se pueden aplicar a muchos formatos diferentes, dependiendo de las necesidades del usuario final; estas diferentes pruebas son todas aplicables en el contexto de la presente invención, aprovechando la alta especificidad y sensibilidad de los anticuerpos policlonales según la invención.

Además de los anticuerpos que se utilizarán, a saber, los anticuerpos policlonales de la invención, la segunda característica de un inmunoensayo es la tecnología y el sistema que se utilizarán para detectar la unión de los anticuerpos policlonales al analito diana, a saber, antígenos solubles de NmX.

Originalmente, la señal de un inmunoensayo provenía de una enzima, que se unía al complejo formado por los anticuerpos y los antígenos diana, actuando sobre un sustrato para producir una solución coloreada, donde la intensidad de la coloración es indicativa de la cantidad de antígeno diana la solución de prueba.

Más recientemente se han desarrollado nuevos inmunoensayos, que comprimen las muchas etapas de los inmunoensayos diseñados previamente en un formato simplificado para el usuario final. Uno de esos formatos simplificados es la tira reactiva de nitrocelulosa. En este formato, se puede observar directamente la unión del anticuerpo al antígeno diana, a simple vista, debido a la acumulación de microperlas teñidas que se unirán a una ubicación específica en la nitrocelulosa produciendo una línea de color, en caso de presencia de los antígenos diana en la solución a analizar.

Se han desarrollado otros inmunoensayos en los que se ha mejorado la sensibilidad del ensayo, permitiendo la detección de moléculas individuales en una muestra corporal. Para este fin, se añaden perlas microscópicas recubiertas con los anticuerpos a la muestra corporal a analizar, para capturar los antígenos diana; los inmunocomplejos así formados se marcan luego con un indicador enzimático capaz de generar un producto fluorescente (27).

Otros inmunoensayos clásicos que son bien conocidos y se pueden usar en el contexto de la presente invención son el radioinmunoensayo y los inmunoensayos fluorescentes. La variable clave es la técnica bioquímica utilizada para detectar la unión del anticuerpo de "detección", a saber, los anticuerpos policlonales de la invención y los antígenos solubles de NmX. Un inmunoensayo moderno basado en fluorescencia utiliza como reactivo de detección un compuesto fluorescente que absorbe luz o energía en una longitud de onda específica y luego emite luz o energía en una longitud de onda diferente. Recientemente se han producido una serie de mejoras técnicas que han permitido la implementación de un sistema de inmunoensayo fluorescente de alta sensibilidad. Por lo tanto, los inmunoensayos se diseñan en muchos formatos y el experto sabrá cómo determinar los inmunoensayos más adecuados según los tipos de muestras, incluido el suero, plasma, sangre completa, orina o líquido cefalorraquídeo. Los inmunoensayos preferidos son aquellos que se pueden realizar rápidamente y aquellos que son extremadamente sensibles.

Los inmunoensayos que se pueden usar ventajosamente en los kits de diagnóstico según la invención son los que se basan en la aglutinación. En ensayos de aglutinación en el marco de la invención, una partícula (perla de látex o bacteria) se acopla a los anticuerpos policlonales de la invención. El complejo de partículas resultante se mezcla con la muestra de fluido biológico a analizar; si el antígeno diana, a saber, los antígenos solubles de NmX, está presente en la muestra, reticula las partículas, produciendo una aglutinación mensurable.

Si los resultados son positivos, el fluido biológico se diluye y analiza en serie. La aglutinación con soluciones más diluidas indica concentraciones más altas de los antígenos diana, a saber, polisacáridos capsulares de NmX.

Normalmente, las pruebas de aglutinación son rápidas pero menos sensibles que muchos otros métodos.

Una prueba de aglutinación particularmente preferida es la prueba de aglutinación con látex. Esta prueba utiliza partículas de látex, recubiertas o acopladas con los anticuerpos policlonales de la invención. La presencia de polisacáridos de NmX lleva a la aglutinación de las partículas de látex recubiertas, que se puede observar visualmente en unos minutos o incluso menos. Un kit de la invención según la presente realización comprende por tanto los anticuerpos policlonales de la invención, recubiertos en partículas de látex.

De acuerdo con otra realización, los kits de diagnóstico de la invención se basan en una prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En un ensayo ELISA, la muestra que potencialmente comprende antígenos de NmX se inmoviliza sobre un soporte sólido, normalmente una placa de microtitulación de poliestireno. Después de la inmovilización de los antígenos, los anticuerpos policlonales de la invención se utilizan como anticuerpo de detección, formando un complejo con los antígenos de NmX, si están presentes. Los anticuerpos policlonales de detección se pueden unir covalentemente directamente a una enzima o se pueden detectar mediante un anticuerpo secundario, que está unido a una enzima. Entre cada etapa de adición, el soporte sólido se trata para eliminar cualquier proteína o anticuerpo unido de forma no específica. El soporte sólido se desarrolla agregando un sustrato enzimático para producir una señal, generalmente detectable visualmente, que indica la posible presencia de antígenos NmX en la muestra y, si corresponde, la cantidad de los mismos.

En tal caso, los anticuerpos policlonales presentes en los kits de acuerdo con la invención están preferentemente unidos a una enzima, o los kits comprenden anticuerpos específicos de los anticuerpos policlonales de la invención y unidos a una enzima. Según una realización específica, el kit comprende anticuerpos policlonales de conejo según la invención y anticuerpos anti-conejo en cabra, unidos a una enzima.

Según una realización específica, el kit es adecuado para su uso en la tecnología Simoa™ (matriz de una sola molécula) (27). Para tal fin, los anticuerpos policlonales según la invención, utilizados como anticuerpos de captura, están adheridos a la superficie de perlas paramagnéticas. De acuerdo con esta tecnología, estas perlas se ponen en contacto con la muestra, que comprende posiblemente antígenos NmX solubles. A continuación, las perlas se lavan para eliminar las proteínas unidas de forma no específica y se incuban con un anticuerpo de detección unido a una enzima. Un anticuerpo de detección de este tipo son preferentemente anticuerpos policlonales según la invención. En tal caso, los kits de la invención según esta realización comprenden los anticuerpos policlonales de la invención unidos a perlas, preferentemente perlas paramagnéticas, como anticuerpos de captura, y también los anticuerpos policlonales de la invención unidos a una enzima, como anticuerpos de detección.

Además según otra realización, los kits de la invención son adecuados para pruebas de diagnóstico rápido, especialmente ensayos de flujo lateral o vertical, también conocidos como ensayos inmunocromatográficos; más preferentemente, se conciben como pruebas con tira reactiva. De acuerdo con la presente realización, el kit comprende por tanto los anticuerpos policlonales según la invención, unidos a partículas de oro, como anticuerpos de detección, y también los anticuerpos policlonales de la invención no unidos a partículas de oro inmovilizadas en un área específica de un soporte, como anticuerpos de captura.

Los kits de diagnóstico de la invención son preferentemente estables a temperaturas de hasta 30 °C, preferentemente hasta 45 °C como mínimo. Se pueden usar muchas otras tecnologías para las pruebas de diagnóstico de la invención y las tecnologías detalladas anteriormente son solo para fines ilustrativos.

Dependiendo de la tecnología a utilizar para demostrar la presencia de antígenos solubles de NmX en la muestra con los anticuerpos policlonales de la invención, varios componentes adicionales pueden estar presentes en los kits de diagnóstico como se describe.

De acuerdo con una realización preferida, el kit de la invención comprende además un soporte sólido, sobre el cual los anticuerpos policlonales de la invención, unidos a un marcador de detección o no, pueden estar inmovilizados, pero no necesariamente. El kit de diagnóstico según la invención puede comprender, entre otras cosas, una placa de microtitulación, una plataforma de diagnóstico, una membrana de nitrocelulosa o un dispositivo de flujo lateral o vertical miniaturizado.

Con respecto a la plataforma de diagnóstico, tal plataforma puede comprender una membrana, por ejemplo, una membrana cargada, plástico, perlas, tiras, pocillos de microtitulación, microcanales o una combinación de los mismos. Los kits de la invención comprenden una tira de prueba inmunocromatográfica, un dispositivo miniaturizado de flujo lateral o vertical, o plataforma de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

Dependiendo de la tecnología que se utilice para revelar la posible presencia de antígenos solubles de NmX, los kits de la invención también pueden comprender una zona o cámara de recepción de fluido, preferentemente en o sobre la plataforma de diagnóstico.

El experto adaptará sin dificultad los componentes de los kits, dependiendo de la tecnología elegida para detectar la

presencia de polisacáridos solubles de NmX en la muestra de fluido biológico a analizar.

El kit de diagnóstico permite la detección mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas a una concentración subfentomolar, por ejemplo, a una concentración de 1 fM o menos, por ejemplo, a una concentración de 0,5 fM de polisacárido de NmX en la muestra, o incluso por debajo. Para obtener una concentración de detección tan baja, la tecnología a elegir para la detección de antígenos solubles de NmX es preferentemente la tecnología Simoa™ tal como se detalla anteriormente. Las ventajas de esta alta sensibilidad son que se puede realizar una detección muy temprana, por ejemplo antes de la aparición de cualquier síntoma. Esto es especialmente útil para detectar infecciones en personas que han estado en contacto con pacientes afectados.

De acuerdo con una realización particularmente preferida, la presente invención está dirigida a una prueba de diagnóstico con tira reactiva para NmX. Tal prueba comprende una membrana, que es preferentemente una membrana de nitrocelulosa. Una membrana de este tipo comprende ventajosamente las siguientes zonas:

- a. una primera zona que comprende los anticuerpos policlonales de la invención, unidos directa o indirectamente, covalentemente o no covalentemente a un marcador de detección;
- b. opcionalmente una zona de control que comprende un polipéptido de control inmovilizado,
- c. una zona de captura que comprende anticuerpos policlonales inmovilizados de acuerdo con la invención, como anticuerpos de captura.

La muestra de fluido biológico que se va a analizar se pone en contacto con un extremo de la membrana. Luego, la muestra migra a lo largo de la membrana, ya sea vertical o lateralmente según el sistema, primero a través de la 1ª zona donde los antígenos solubles de NmX, si están presentes en la muestra, se unirán a los anticuerpos policlonales. A medida que la muestra fluye a través de la zona de captura, el complejo inmunológico, formado por los anticuerpos policlonales y los antígenos de NmX, se unirá a los anticuerpos policlonales inmovilizados, siempre que haya antígenos solubles de NmX en la muestra, capturando e inmovilizando así el marcador de detección unido a los anticuerpos policlonales en un área específica de la membrana. De lo contrario, los anticuerpos de captura no capturan ningún marcador de detección. A medida que la muestra fluye a través de la zona de control, los anticuerpos policlonales unidos al marcador de detección se unirán a la zona de control, independientemente de si están unidos a antígenos solubles de NmX.

Por tanto, es imperativo que la muestra fluya a través de la primera zona antes de fluir a través de la zona de captura o control; la disposición respectiva de las zonas de captura y control no es crítica.

De acuerdo con una realización preferida, la primera zona tal como se define anteriormente comprende el agente de diagnóstico tal como se define en el contexto de la presente invención. Se prefiere particularmente que los anticuerpos policlonales de acuerdo con la invención estén conjugados, preferentemente por unión covalente, con partículas de oro, para la detección.

Con respecto a la zona de control, los polipéptidos de control inmovilizados son ventajosamente anticuerpos de control, especialmente anticuerpos capaces de reconocer los anticuerpos policlonales de la primera zona independientemente de si dichos anticuerpos están conjugados con partículas de oro, e independientemente de si estos anticuerpos están unidos a su antígeno específico, a saber, unido a polisacáridos de NmX. De acuerdo con una realización preferida, cuando los anticuerpos policlonales según la invención se hayan obtenido por inmunización de un mamífero específico, por ejemplo mediante la inmunización de un conejo, los polipéptidos de control son anticuerpos dirigidos específicamente a anticuerpos de dicho mamífero, por ejemplo, son anticuerpos anti-conejo en cabra o ratón. Por supuesto, dependiendo de los anticuerpos policlonales utilizados en la primera zona de la membrana, los polipéptidos de control deben adaptarse para reconocer estos anticuerpos.

En cuanto a la zona de captura de la membrana, comprende anticuerpos policlonales según la invención, que no están unidos al marcador de detección de los anticuerpos presentes en la primera zona. Preferentemente, no están unidos a ninguna molécula de detección de ningún tipo.

Los expertos conocen bien los medios adecuados para inmovilizar los polipéptidos de control de la zona de control y los anticuerpos de la zona de captura. Por definición, los anticuerpos de la primera zona no están inmovilizados sobre la membrana y constituyen una fase móvil.

Las diferentes zonas de la prueba de la tira reactiva son preferentemente distintas y no se superponen antes del uso de la tira reactiva.

La prueba de la tira reactiva de la invención es una operación simple, conveniente, rápida y concisa y no requiere de equipos e instalaciones especiales, así como capacitación profesional. Además, la tira reactiva tiene resultados claros y fáciles de identificar, funcionamiento simple y fácil popularización, es aplicable a matrices, pruebas de campo de emergencia a gran escala y el estudio de la epidemiología y pueden ayudar en el diagnóstico de infecciones.

La prueba de diagnóstico o prueba con tira reactiva según la invención se caracteriza preferentemente por una sensibilidad (Se) de al menos el 90 %, preferentemente al menos el 92 %, al menos el 93 % o al menos el 94 %.

Preferentemente, el intervalo de confianza del 95 % para la sensibilidad está entre el 86 % y el 98 %. Esta sensibilidad se obtiene preferentemente en caso de diagnóstico en muestra de líquido cefalorraquídeo. De acuerdo con otra realización preferida, el kit de diagnóstico o prueba según la invención tiene una especificidad (Sp) que es al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %, especialmente cuando se aplica en condiciones de campo. Preferentemente, el intervalo de confianza del 95 % para la especificidad está entre el 99 % y el 100 %. Esta especificidad se obtiene preferentemente en caso de diagnóstico en muestra de líquido cefalorraquídeo. Se prefiere que el rendimiento de la prueba con tira reactiva de la invención sea una sensibilidad de al menos el 86 % con una especificidad de al menos el 98 %, preferentemente una sensibilidad de al menos el 92 % con una especificidad de al menos el 99 %.

También se prefiere que el kit de diagnóstico tal como se describe, especialmente la tira reactiva, tiene uno o varios de los siguientes parámetros:

- una razón de verosimilitud positiva comprendida entre 32 y 8252; y/o
- una razón de verosimilitud negativa comprendida entre 0,03 y 0,15; y/o
- un valor predictivo positivo comprendido entre 0,96 y 1; y/o
- un valor predictivo negativo comprendido entre 0,95 y 0,99 y/o
- una razón de momios de diagnóstico comprendida entre 379 y 118420.

La razón de verosimilitud positiva RV^+ ($RV^+ = Se/[1-Sp]$) indica cuántas veces es más probable que se observe un resultado positivo en muestras con el trastorno diana (infección por NmX) que en aquellas sin el trastorno diana. La razón de verosimilitud negativa RV^- ($RV^- = [1 - Se]/Sp$) indica cuántas veces es más probable que se observe un resultado negativo en muestras con el trastorno diana (infección por NmX) que en aquellas sin el trastorno diana. Cuanto más precisa es la prueba, más se diferencia la RV de 1. La RV^+ por encima de 10 y la RV^- por debajo de 0,1 se consideran pruebas diagnósticas convincentes.

La razón de momios de diagnóstico (RMD), definida como la proporción de las probabilidades de resultados positivos en las pruebas en muestras con el trastorno diana (infección por NmX) en relación con las probabilidades de obtener resultados positivos en las pruebas en las muestras sin el trastorno diana, se calcula de la siguiente manera: $RMD = (Se/[1 - Se])/([1 - Sp]/Sp)$.

La RMD no depende de la prevalencia y su valor varía de 0 a infinito, con valores más altos que indican un mejor desempeño de la prueba discriminatoria.

El valor predictivo positivo (VPP) representa la proporción de muestras positivas en la prueba que realmente presentan el trastorno diana (infección por NmX), mientras que el valor predictivo negativo (VPN) representa la proporción de muestras con pruebas negativas que realmente no presentan el trastorno diana:

$$VPP = (Prev \times Se) / (Prev \times Se + [(1 - Prev) \times (1 - Sp)])$$

$$VPN = [(1 - Prev) \times Sp] / ([1 - Prev] \times Sp + [Prev \times (1 - Se)])$$

"Prev" es la prevalencia del trastorno diana (infección por NmX) en la población de muestras a las que se aplica la prueba. De acuerdo con otra realización preferida de la invención, el kit de diagnóstico o la prueba tiene un límite de detección del polisacárido capsular NmX de alrededor de 1 ng/ml, preferentemente de menos de 1 ng/ml, especialmente en caso de uso de la tecnología Simoa™.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, el kit de diagnóstico o la prueba tiene un límite de detección de bacterias NmX de alrededor de 10^5 UFC/ml.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención también se refiere al uso de un kit de diagnóstico o prueba tal como se define anteriormente, preferentemente para el diagnóstico *in vitro* de infección por NmX en la muestra biológica de un sujeto. Se puede sospechar que dicho sujeto padezca una infección por meningitis o que haya estado en contacto con pacientes infectados.

La muestra biológica que se puede utilizar en este contexto es tal como se define en los otros aspectos de la invención, entre otras cosas, es preferentemente una muestra de líquido cefalorraquídeo, orina, suero o sangre. Las otras realizaciones preferidas también se detallan anteriormente, con respecto a otros aspectos de la invención. Según un aspecto adicional, la presente invención también está dirigida a un método para producir los anticuerpos policlonales de la invención, es decir, que son altamente específicos y sensibles a los polisacáridos de NmX y que se pueden usar para la detección de NmX sin cultivo. Tal método de acuerdo con la invención comprende preferentemente las siguientes etapas:

- a. inmunizar un hospedador animal con una composición inmunogénica que comprende bacterias *Neisseria meningitidis* serogrupo X; y
- b. aislar del suero de dicho hospedador animal, los anticuerpos específicos para *Neisseria meningitidis* serogrupo

X, por cromatografía de afinidad con polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* serogrupo X.

En dicho método, el animal que se utilizará para la inmunización en la etapa a) es un animal no humano. Preferentemente es un mamífero o un pollo. Los mamíferos preferidos se han detallado en el contexto de otras realizaciones de la invención; los mamíferos más preferidos son caballo, alpaca y conejo, preferentemente conejo.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la etapa de inmunización se lleva a cabo con bacterias completas inactivadas. La inactivación se realiza preferentemente por calor, pero los expertos en la técnica conocen bien otros medios para inactivar NmX.

Con respecto a la segunda etapa, el aislamiento del suero de dicho hospedador animal, de los anticuerpos específicos para *Neisseria meningitidis* serogrupo X, se lleva a cabo con polisacáridos capsulares purificados de NmX, preferentemente cargados en una columna de cromatografía.

El método de la invención no se limita a las etapas descritas anteriormente y puede comprender etapas complementarias, ya sean realizadas antes, después o entre las etapas descritas. El método puede comprender, entre otras cosas, una etapa adicional de aislamiento de las inmunoglobulinas G del suero de dicho hospedador animal. Esta etapa de aislamiento se puede realizar, por ejemplo, mediante una cromatografía de afinidad con ligandos de proteína G tal como se detalla en la sección experimental. Este tipo de aislamiento es bien conocido por el experto y se puede realizar sin dificultad. Preferentemente, tal etapa de aislamiento de IgG se lleva a cabo antes de la etapa de aislamiento b) del método, es decir, entre las etapas a) y b).

Con respecto a la purificación de los polisacáridos de NmX, para ser utilizado en la columna de cromatografía, se lleva a cabo preferentemente hasta una pureza de al menos el 95 %, preferentemente al menos el 99 % antes de cargarse en una columna para la cromatografía de afinidad. La etapa b) consiste, por tanto, en una cromatografía realizada sobre polisacáridos inmovilizados de NmX con una pureza de al menos el 95 %, preferentemente al menos el 99 %. Tal como se ilustra en la sección experimental, el aislamiento de los anticuerpos policlonales de la invención se realiza mediante cromatografía de afinidad en dos etapas. Primero, el suero animal se pasa a través de una columna de proteína G y se eluye con una solución adecuada, por ejemplo glicina-HCl 0,1 M, a pH 2,7. A continuación, las fracciones se recuperan en un tampón, preferentemente Tris-HCl. Las fracciones agrupadas se pasan luego a través de una cromatografía de afinidad de polisacárido capsular NmX, se obtienen por acoplamiento químico de la resina de la columna de cromatografía y los polisacáridos capsulares, y luego se eluyen con una solución apropiada.

Luego, las fracciones eluidas se pueden probar por Elisa contra polisacáridos capsulares purificados de NmX y bacterias NmX inactivadas completas, para verificar.

Los presentes inventores han descubierto que este método proporciona anticuerpos policlonales, específico para los polisacáridos capsulares de NmX, que no tienen reacciones cruzadas con otros serogrupos de meningococos y no tienen reacciones cruzadas con otras bacterias, especialmente cuando el animal es conejo. Además, los inventores han confirmado que dichos anticuerpos policlonales se pueden obtener de forma reproducible repitiendo el método en otro animal. Los anticuerpos policlonales así obtenidos tienen propiedades casi idénticas, lo que confirma la reproducibilidad del método.

Legendas de figuras

Fig. 1. Análisis de transferencia de puntos de sueros de conejo. Se utilizaron sueros de dos conejos antes de la inmunización (día 0) y 7 días después de la inyección de la tercera dosis de la cepa 19504 de NmX (día 28) a diluciones de 1:1000 en inmunotransferencia. Se detectaron cuatro aislados de meningococo a las 2.10^5 unidades formadoras de colonias, UFC/ml (1: cepa 19404, 2: cepa 23557, 3: cepa 24196, 4: cepa 24287).

Fig. 2. Reconocimiento específico de los anticuerpos IgG anti-cpsX de conejo purificados. (A) Análisis de transferencia de puntos contra bacterias completas. Los serogrupos se indican sobre los puntos y las cantidades de bacterias cargadas en cada lugar se indican a la derecha (en unidades formadoras de colonias, UFC). Los anticuerpos se utilizaron a una concentración final de 500 pg/ml. (B) Análisis ELISA utilizando polisacárido capsular purificado recubierto para los serogrupos A, B, C, Y, W y X (Tabla 1). Los datos se expresan como absorción a DO 492 nm para cada concentración de anticuerpos (en pg/ml). Los datos se corresponden con las medias de dos experimentos independientes. Los serogrupos correspondientes se indican a la derecha. (C) Valor de corte de detección para cpsX purificado. Las cantidades se indican en ng encima de cada tira reactiva. A la izquierda se muestra una tira reactiva, antes de su uso. Las dos flechas superiores indican la línea de control de captura correspondiente a anti-IgG de conejo en cabra. Las dos flechas inferiores indican la línea de captura correspondiente a la IgG específica anti-cpsX (línea cpsX).

Fig. 3. Valores predictivos para el diagnóstico de *N. meningitidis*. Los Valores Predictivos Positivos y los Valores Predictivos Negativos (VPP y VPN, respectivamente) para el diagnóstico de NmX se calcularon de acuerdo con una prevalencia de la enfermedad que oscilaba entre el 0 y el 100 %.

Fig. 4. Fig 4A: estructura del polisacárido capsular del serogrupo X de meningococos: homopolímero de N-acetil-

D-glucosamina 1-fosfato 1 ζ 4-ligado. Fig.B: Espectro de RMN 1H registrado en un espectrómetro tipo Bruck Avance 400, con una frecuencia de 400 MHz. La muestra se disolvió en óxido de deuterio (D₂O). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y la referencia utilizada es el ácido 4,4-dimetil-4-silapentano 1-sulfónico (DSS). Las constantes de acoplamiento se dan en hercios (Hz). Los picos se indican de acuerdo con la posición (1 a 6) en las unidades repetidas del cpsX (véase la Figura 4A).

Fig. 5. Detección de meningococos del serogrupo X en orina y suero utilizando la tira reactiva del serogrupo X. Las tiras reactivas desveladas en el ejemplo 2 se utilizaron para detectar NmX en muestras de orina (arriba) y muestra de suero (abajo) a diferentes concentraciones de meningococos, es decir, a 0 UFC/ml (etiquetado como "negativo" en el lado izquierdo), a 10⁵ UFC/ml (medio) y a 10⁶ UFC/ml (lado derecho). La línea de detección está indicada por una flecha.

Ejemplos

Los inventores han desarrollado y evaluado una nueva prueba de diagnóstico rápido (PDR) para detectar el antígeno del polisacárido capsular (cps) de este serogrupo emergente. Se utilizaron bacterias NmX inactivadas completas para inmunizar conejos. Después de la purificación por cromatografía de afinidad, los anticuerpos IgG específicos de cpsX, se utilizaron para desarrollar una PDR con tira reactiva de inmunocromatografía específica de NmX. La prueba se validó frente a cpsX purificada y cepas meningocócicas de diferentes serogrupos. Su rendimiento se evaluó frente a la PCR en una colección de 369 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenidas de pacientes que vivían en países del cinturón de la meningitis (Camerún, Costa de Marfil y Níger) o en Francia. La PDR fue muy específica para las cepas NmX. Se observó un valor de corte de 10⁵ UFC/ml y 1 ng/ml para la cepa NmX de referencia y cpsX purificada, respectivamente. La sensibilidad y la especificidad fueron el 94 % y el 100 %, respectivamente. Se observó una alta concordancia entre PCR y PDR (coeficiente Kappa de 0,98). La prueba PDR dio una razón de verosimilitud positiva alta y una verosimilitud negativa baja (0,07), lo que indica una probabilidad de casi el 100 % de declarar la enfermedad o no cuando la prueba es positiva o negativa, respectivamente. Esta prueba única específica de NmX podría agregarse al conjunto de pruebas PDR disponibles para la detección de meningitis meningocócica en África como una herramienta importante para reforzar la vigilancia epidemiológica después de la introducción de la vacuna conjugada de NmA.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Muestras y cepas bacterianas

Los aislados de *N. meningitidis* utilizados en el presente estudio fueron aislados de casos de enfermedad meningocócica (véase la Tabla 1 para obtener detalles). Las bacterias se cultivaron en medio GCB (GC Agar Base, Difco, Detroit MI, EE.UU.) suplementado con suplementos de Kellogg (15). El serogrupo se determinó mediante aglutinación con antisueros específicos de serogrupo de acuerdo con el procedimiento estándar (16). Se realizó un fenotipado adicional (serotipado y serosubtipado) usando anticuerpos monoclonales contra las proteínas meningocócicas PorA y PorB tal como se describió previamente (17). Las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) analizadas en el presente estudio se correspondían con casos sospechosos de meningitis bacteriana. Se obtuvieron de los Laboratorios Nacionales de Referencia de Meningococos ubicados en el Institut Pasteur de Côte d'Ivoire y en el Institut Pasteur, París, Francia, así como del Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES) en Niamey, Níger, y del Centro Pasteur de Garoua, Camerún. Estas muestras fueron recibidas en el marco de la misión de estos centros para la vigilancia de las enfermedades meningocócicas en los países correspondientes bajo las aprobaciones del consejo interno del Institut Pasteur para recolectar, caracterizar y utilizar estas muestras que son todas anónimas. El análisis por PCR de estas muestras se utilizó como método de referencia para detectar *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, así como a muestras positivas de meningococo de genogrupo. Las condiciones de PCR y los cebadores fueron los descritos anteriormente (8). No se utilizó cultivo ya que se ha demostrado constantemente que es menos sensible que la PCR (26). Los datos de cultivo estaban disponibles solo para 26 de las 369 muestras de LCR analizadas.

Tabla 1. Cepas utilizadas en el estudio y sus características

Referencia de cepa	Serogrupo:serotipo/serosubtipo
21525*	A:4:P1.9
21526	A:4:P1.9
19256	B:NT: P1.5,2
19257	B:2a: P1.5,2
19324	B:2b: P1.5,2
21721*	B:NT:P1.4
22733	B:15:P1.4
22590	B:14:P1.7,16
22644	C:15:P1.7,16
22639	C:2a:P. 5
20137	C:2b: P1.5,2

(continuación)

Referencia de cepa	Serogrupo:serotipo/serosubtipo
19008	C:2a:P1.5,2
20134	C:NT:P1.10
19456	Y:14:NST
19336*	Y:NT:P1.5
19995*	W:2a:P1.5,2
19481	W:NT:P1.5
19836	W:NT:P1.6
19383	E:NT:P1.5,2
19504*	X:NT:P1.5,2
24196	X:4:P1.12
24287	X:4:P1.16
23557	X:NT:P1.5
NT: no tipificable, NST: No subtipificable	
* Cepas que se utilizaron para la purificación de polisacáridos capsulares	

Purificación del polisacárido capsular de NmX

5 El polisacárido capsular del serogrupo X (cpsX, véase la figura 4A para la definición estructural) se purificó a partir de la cepa NmX, 19504 (que dio el mayor rendimiento cuando se cultivó en medio GCB con suplementos de Kellogg), por el método de extracción Cetavlon tal como se describió anteriormente (18). Brevemente, las bacterias (1 L) en la fase de crecimiento logarítmico tardío se inactivaron con formaldehído (1 % v/v) y luego se trataron con Cetavlon (0,1 % p/v) (Sigma Aldrich, Francia). Tras la centrifugación, el sedimento se disolvió en CaCl₂ acuoso frío (0,9 M). Los

10 materiales solubilizados se eliminaron mediante precipitación en etanol acuoso al 25 % y el sobrenadante restante se precipitó con etanol acuoso al 80 %. El sedimento se disolvió en tampón fosfato (Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, 0,2 M) y se trataron con desoxirribonucleasa y ribonucleasa seguido de tratamiento con proteinasa K (Sigma Aldrich, Francia) y extracción con fenol frío. El extracto se dializó extensamente contra agua destilada y se liofilizó para obtener el polisacárido capsular crudo. Se disolvieron diez mg de la preparación en 2 ml de tampón fosfato K₂HPO₄, KH₂PO₄ (0,05 M), pH 7 y se purificaron mediante filtración en gel en una columna Biosep-SEC-S3000 (300 x 21,2 cm, Phenomenex, Francia) que se equilibró con el mismo tampón. La elución se llevó a cabo con el mismo tampón fosfato a 5 ml/min y se controló a 214 nm y 280 nm. Las fracciones de volumen vacío que contienen cpsX en el intervalo de peso molecular alto se combinaron y dializaron frente a agua destilada a 4 °C, utilizando una membrana de diálisis con un tamaño de corte de 10 K-15 K, y el residuo se liofilizó. El rendimiento fue de aproximadamente 20 mg/l de cultivo. El perfil del cpsX purificado se comprobó mediante resonancia magnética nuclear de protones (¹H RMN) (Fig. 4B) tal como se describió previamente (19). CpsA, cpsB, cpsC, cpsY y cpsW se purificaron de forma similar a partir de cinco cepas de los serogrupos A, B, C, Y y W (cepas 21524, 21721, 22639, 16366 y 19995 respectivamente, Tabla 1).

25 Inmunización de conejo y purificación de anticuerpos IgG anti-cpsX específicos

Se inmunizaron por vía intravenosa tres conejos hembra New Zealand White (3 kg) con dosis de 1 ml de una suspensión de 10⁹ Unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa 19504 de NmX recién inactivada por calor (30 min a 56 °C), en los días 0, 7 y 21. Se tomaron sueros antes de la inmunización y el día 28 después de la primera inyección para evaluar la respuesta inmune mediante ELISA (véase más abajo). Se realizó un análisis por transferencia de puntos con suero de conejo (dilución de suero a 1:1000) usando kits Amersham ECL (GE Healthcare Life Sciences Velizy-Villacoublay, Francia) tal como se describió previamente (20). La inmunización de conejos se realizó de acuerdo con la Directiva de la Unión Europea 2010/63/EU (y su revisión 86/609/EEC) sobre la protección de animales utilizados con fines científicos. El laboratorio de inventores tiene la autorización administrativa para la experimentación animal (Permiso Número 75-1554) y el protocolo fue aprobado por el Institut Pasteur Review Board que forma parte del Comité Regional de Ética de Experimentos con Animales de la región de París (CETEA 2013-0190).

La purificación del anticuerpo IgG se realizó mediante cromatografía de afinidad en dos etapas. En primer lugar, los sueros de conejo se pasaron a través de una columna HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, Francia) y se eluyeron con glicina-HCl 0,1 M, a pH 2,7. Se recuperaron fracciones de 1 ml en 50 µl de tampón Tris-HCl (1 M, pH 9). Se ensayó el contenido de proteínas de las fracciones midiendo su absorbancia a 280 nm. Las fracciones combinadas se pasaron a través de una columna de afinidad cpsX obtenida por acoplamiento químico de las funciones amina de la resina CarboxyLink y las funciones fosfato de cpsX, según las recomendaciones del fabricante (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EE.UU.). Las fracciones eluidas se ensayaron mediante ELISA contra cpsX purificado y bacterias NmX inactivadas completas. Para ello, los pocillos de ELISA se recubrieron durante la noche con 100 µl de una solución que contenía 2 µg/ml de cpsX purificado o 100 µl de una suspensión bacteriana de 3.10⁸ bacterias/ml (cepa NmX 19504). Los anticuerpos purificados (a una concentración de 500 pg/ml) se probaron frente a diluciones seriadas de bacterias del serogrupo A, B, C, Y, W y X en un experimento de análisis por transferencia de puntos, y luego se probaron diluciones en serie de los anticuerpos en ELISA en cps recubiertos de contraparte a una concentración de 2 µg/ml.

Producción y validación de una PDR contra NmX

Se instaló una tira reactiva de inmunocromatografía de flujo vertical de una sola etapa utilizando cpsX-pAbs purificados que se conjugaron con partículas de oro (British Biocell International, Cardiff, Reino Unido) tal como se describió anteriormente (21). Se utilizaron cpsX-pAbs no conjugados como anticuerpos de captura y anti-IgG de conejo en cabra (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, Estados Unidos) se utilizaron como anticuerpos de control. Ambos tipos de anticuerpos se rociaron sobre nitrocelulosa (Schleicher & Schuell Bioscience, Ecqueville, Francia) a 2 µg y 1 µg por centímetro de línea, respectivamente. Para la evaluación de la prueba, se sumergieron las tiras reactivas, durante un período de 10-15 minutos a temperatura ambiente, en 100 µl de PBS que contiene suspensiones bacterianas o muestras de LCR.

Análisis de datos

La sensibilidad (Se), la especificidad (Sp), el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) se calcularon utilizando una tabla de contingencia de 2 x 2. Las razones de verosimilitud positiva $VR^+ = Se/[1-Sp]$ y la RV negativa $RV^- = [1-Se]/Sp$, también se calcularon (22). Estos valores dan una indicación de la probabilidad de que la muestra sea positiva o negativa antes de la prueba. La razón de momios de diagnóstico (RMD), definida como la relación entre las probabilidades de resultados positivos de la prueba en muestras con NmX y las probabilidades de resultados positivos de la prueba en muestras negativas para NmX, se calculó como sigue $RMD = (Se/[1 - Se])/([1 - Sp]/Sp)$ (23). Finalmente, se calculó el estadístico kappa (j) de Cohen para medir la concordancia entre PCR y RMD (24). K puede oscilar entre 0 y 1, y se cree que un valor j superior a 0,8 refleja casi perfecto.

Ejemplo 2: resultados y discusión

Caracterización del suero de conejo antimeningocócico del serogrupo X de conejo

Siguiendo el régimen de inmunización de tres dosis con bacterias NmX completas, los sueros de conejo se probaron en análisis por transferencia de puntos contra bacterias punteadas. Si bien no se obtuvo detección de bacterias con sueros preinmunes de control, se obtuvo una fuerte detección con los sueros de conejos inmunizados (Figura 1). Se combinaron los sueros de los dos conejos que respondieron y se purificó IgG específica anti-cpsX mediante cromatografía de afinidad en una columna activada NmX cps. El análisis del diagrama de puntos de la respuesta de IgG purificada contra el número decreciente de bacterias (de 5×10^5 hasta 5×10^3 células por punto) de los serogrupos A, B, C, Y, W y X mostraron que los anticuerpos solo reconocían la cepa del serogrupo X (Fig. 2A). La ausencia de reconocimiento de los otros serogrupos (A, B, C, Y y W) se confirmó además de forma independiente mediante análisis ELISA de la respuesta del anticuerpo contra cps purificados recubiertos (1 µg/ml) correspondientes a los seis serogrupos (Fig. 2B).

Se elaboró una prueba de diagnóstico rápido con tira reactiva para NmX (consulte Material y métodos) y se establecieron sus límites de detección. Para el cpsX purificado, este límite fue de 1 ng/ml (Fig. 2C) y fue de 10^5 UFC/ml para bacterias NmX (cepa 19504). El análisis de corte se repitió 3 veces con hallazgos idénticos que no se vieron afectados por el almacenamiento de la tira reactiva durante 3 semanas a 25 °C. Los inventores también probaron la PDR en una colección de suspensión bacteriana (Tabla 1) a 10^6 UFC/ml. Solo fueron detectables los aislados del serogrupo X.

El límite de detección de 1 ng CpsX/ml es similar al de los ensayos ELISA e inferior al de los ensayos de aglutinación con látex (10-100 ng CpsX/ml), lo que explica las mayores especificidades y sensibilidades de las PDR en comparación con el kit de aglutinación.

Uso de las tiras reactivas de NmX en muestras clínicas

La tira reactiva de NmX se probó en un panel de 369 LCR seleccionados de colecciones históricas mantenidas en el Centro/Laboratorio Nacional de Referencia de cuatro países diferentes, que difieren en términos de incidencia de meningitis (Camerún, Côte d'Ivoire, Francia y Níger). Evidentemente, tres de los cuatro laboratorios están ubicados en países del cinturón de la meningitis. Las muestras de LCR se correspondieron con casos sospechosos de meningitis bacteriana aguda. Se caracterizaron por PCR para el diagnóstico etiológico (Tabla 2). Los resultados del cultivo solo estaban disponibles para 26 muestras (8 muestras positivas para *S. pneumoniae*, 4 positivas para *N. meningitidis* (2 de serogrupo B y 2 de serogrupo W), 1 positiva para *H. influenzae*, 1 positiva para *S. agalactiae* y 12 muestras de LCR fueron estériles por cultivo).

Entre estos aislados, el 52 % (n = 191) fueron positivos para Nm, el 8 % (n = 28) fueron positivos para otras especies bacterianas, a saber *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *S. agalactiae*, y el 40 % (n = 150) fueron negativos por PCR para estas especies. Entre el LCR positivo a Nm, los seis grupos capsulares meningocócicos implicados en infecciones meningocócicas invasivas estuvieron representados: grupo A (n = 27), grupo B (n = 8), grupo C (n = 7), grupo Y (n = 2), grupo W (n = 38) y grupo X (n = 92). Además, 17 muestras de LCR fueron positivas para Nm por PCR aunque fueron negativas para los grupos A, B, C, Y, W y X. Todas las muestras que fueron negativas para NmX por PCR también fueron negativas para este grupo por la nueva PDR específica de NmX. Entre los 92 LCR positivos para NmX

por PCR, 86 también fueron positivos por PDR. Las 26 muestras de LCR con datos de cultivo resultaron negativas mediante la PDR específica de NmX.

Esta validación en condiciones de laboratorio se llevó a cabo durante la temporada epidémica en los tres laboratorios ubicados en países del cinturón de meningitis. Por tanto, los inventores aprovecharon la temporada epidémica y probaron la nueva PDR específica de NmX en las 153 muestras de LCR que se recibieron en los tres laboratorios de Camerún, Côte d'Ivoire y Níger. No se detectó NmX por PCR o PDR en ninguna de las muestras. Por el contrario, varias muestras dieron positivo por PCR para *S. pneumoniae* (14 %), NmW (7 %) y *H. influenzae* (3 %).

Tabla 2 Resultados de muestras de LCR obtenidas por PCR y por PDR

PCR	Origen geográfico				PDR		
	IP Paris	CERMES	CP Garoua	IP Côte d'Ivoire	Total	NmX ⁺	NmX ⁻
NmA	6	15	6	0	27	0	27
NmB	6	0	0	2	8	0	8
NmC	7	0	0	0	7	0	7
NmY	2	0	0	0	2	0	2
NmW	6	10	4	18	38	0	38
NmX	7	80	5	0	92	86	6
Nm NG	0	0	16	1	17	0	17
<i>S. pneumoniae</i>	0	0	10	13	23	0	23
<i>H. influenzae</i>	0	0	1	3	4	0	4
<i>S. agalactiae</i>	1	0	0	0	1	0	1
Negativa*	10	0	77	63	150	0	150
Total	45	105	119	100	369	86	283

* PCR negativa para *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*
 LCR: Líquido cefalorraquídeo; PDR: Prueba de diagnóstico rápido; IP, Instituto Pasteur; CP: centro Pasteur; Nm: Neisseria meningitidis; NG: no agrupable

Rendimiento de la PDR específica de NmX: sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud y valores predictivos

Los datos de PDR mostraron una buena correlación con los datos de PCR, lo que indica un coeficiente de correlación Kappa del 98 %. Los datos de sensibilidad, especificidad e IC (intervalo de confianza) del 95 % de la PDR obtenidos para las 369 muestras de LCR documentadas se resumen en la Tabla 3. La especificidad de la PDR para el LCR infectado por NmX fue del 100 %, mientras que la sensibilidad alcanzó el 94 %. Calcular la probabilidad positiva RV⁺ y RMD no fue factible debido a un valor de Sp del 100%. Los valores de RV⁺ y RMD, por lo tanto, se calcularon utilizando un valor para la especificidad que correspondía al intervalo de confianza del 95 % más bajo para la especificidad (0,99) (Tabla 3).

Tabla 3 Rendimiento de la PDR para NmX

Parámetro de ensayo	Valor	Intervalo de confianza al 95 %
Sensibilidad (Se)	0,94	0,86 hasta 0,98
Especificidad (Sp)	1	0,99 hasta 1
Razón de verosimilitud positiva (RV ⁺) *	94	32 hasta 8252
Razón de verosimilitud negativa (RV ⁻)	0,07	0,03 hasta 0,15
Valor predictivo positivo (VPP)	1	0,96 hasta 1
Valor predictivo negativo (VPN)	0,98	0,95 hasta 0,99
Razón de diagnóstico impar (RMD)*	1567	379 hasta 118420
Dividiendo entre cero; los valores de RV ⁺ y RMD se calcularon utilizando un valor de especificidad que correspondía al intervalo de confianza del 95 % inferior (0,99).		

La prevalencia de NmX entre los 369 LCR analizados fue del 25 %. Por tanto, el VPN y el VPP se muestran en la Tabla 3 bajo este valor de prevalencia. Sin embargo, las muestras analizadas se seleccionaron de las colecciones de los laboratorios participantes y es posible que no reflejen la prevalencia real de la enfermedad. Además, la frecuencia de la meningitis por NmX también puede variar a lo largo del tiempo y los países dentro del cinturón de la meningitis y en otros lugares. Por tanto, los presentes inventores calcularon los valores predictivos negativos y positivos (VPN y VPP) según una prevalencia que varía del 0 al 100 %, utilizando la Se y Sp obtenidos de las muestras de LCR en este estudio (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Las pruebas fiables para la identificación de casos de meningitis meningocócica y la determinación de serogrupos son cruciales para garantizar una adecuada gestión individual (caso por caso) y colectiva de los casos y la vigilancia epidemiológica. Cultivar *N. meningitidis* puede fallar con frecuencia debido al tratamiento antibiótico temprano y la fragilidad de esta especie bacteriana (25). Durante las últimas dos décadas, se han desarrollado métodos sin cultivo basados en PCR, permitiendo una mejora significativa del tratamiento y la vigilancia de la meningitis bacteriana (26).

Los métodos basados en PCR requieren equipo de laboratorio específico y personal capacitado y no se pueden utilizar como método de uso junto al enfermo (es decir, para que los médicos tomen una decisión sobre el tratamiento individual). No obstante, la tecnología de PCR se implementó en varios laboratorios de referencia ubicados en países del cinturón africano de la meningitis (26). Sin embargo, es posible que la PCR no esté lo suficientemente establecida para garantizar la vigilancia en todo el país, especialmente en poblaciones que se van a áreas remotas. Otros ensayos, tales como los kits de aglutinación de látex disponibles actualmente, requieren personal capacitado y una cadena de frío ininterrumpida para el almacenamiento y distribución de los kits. La reciente implementación de PDR para meningococos del serogrupo A, C, Y y W supusieron un gran avance para el diagnóstico individual y para la vigilancia de enfermedades meningocócicas en el cinturón africano de la meningitis (12). Estas pruebas son estables a una temperatura de hasta 45 °C como mínimo. Son fáciles de usar e interpretar en ausencia de una formación extensa y, por lo tanto, están adaptados para su uso junto al enfermo. La aparición de aislamientos meningocócicos del serogrupo X instó al desarrollo de una prueba PDR para este serogrupo para completar las actuales herramientas de PDR. Primero, los presentes inventores analizaron la calidad inherente de tal prueba específica del serogrupo X. Los parámetros de especificidad y sensibilidad se evaluaron en condiciones de laboratorio utilizando un panel seleccionado de muestras de LCR relevantes. La buena calidad de la nueva PDR se reflejó en su alta sensibilidad y especificidad para NmX con una razón de verosimilitud muy alta para la prueba positiva (Tabla 3). Los inventores también evaluaron su utilidad que depende no solo de la calidad de la prueba sino también de la prevalencia de la meningitis por NmX en la población probada. La prevalencia de NmX dentro del panel de muestras de LCR que se utilizó para evaluar la especificidad y sensibilidad de la PDR fue del 25,7 %. Es posible que no refleje adecuadamente la prevalencia real de NmX en áreas de riesgo. La utilidad generalmente se evalúa usando dos parámetros, el VPP y el VPN. Cuando la prevalencia de NmX se vio obligada a variar entre 0 y 100 %, el VPP se mantuvo estable en 1, lo que indica que la prueba siguió siendo muy competente en la resolución de un caso. Además, el VPN mantuvo valores altos cuando la prevalencia de NmX fue muy baja. Además, la prueba seguía siendo competente (VPN de 0,95 o superior) si esta prevalencia aumentaba al 50 %. Estas consideraciones parecen realistas y reflejan la situación epidemiológica actual en el cinturón de la meningitis después de la introducción de MenAfriVac™ que se asoció con una disminución significativa de NmA (9). De hecho, el uso prospectivo a pequeña escala de la nueva PDR en los tres centros ubicados en esta área (Abidjan, Garoua y Niamey), que se desvela en el presente documento, sugiere, basándose en las sensibilidades de la PDR y la PCR (que son inferiores al 100 %), que NmX puede estar presente aunque no como un patógeno dominante. Por el contrario, NmW fue la especie Nm aislada con mayor frecuencia, mientras que la mayoría de los casos se asociaron a *S. pneumoniae*. Sin embargo, un estudio prospectivo de múltiples sitios a gran escala que compara la PCR y todas las PDR disponibles (A, C, Y, W, Y y X) está garantizado en el futuro. La nueva PDR descrita en el presente documento será crucial en la toma de decisiones de vacunación para implementar la vacunación a gran escala con la vacuna de amplia cobertura de serogrupo disponible que puede dirigir a NmX (5) o con vacunas específicas de NmX en desarrollo (14).

Ejemplo 3: detección de meningococos del serogrupo X en orina y suero utilizando la tira reactiva del serogrupo X

Las muestras de orina no infectadas y las muestras de suero se enriquecieron con la cepa de *Neisseria meningitidis* del serogrupo X (LNP19504) a una concentración final de 10^5 y 10^6 UFC/ml; de hecho, esta técnica se utiliza con frecuencia para la validación de kits para la detección bacteriana, incluyendo kits para la detección de *N. meningitidis*, ya que se sabe que los datos de sensibilidad obtenidos con muestras enriquecidas se correlacionan bien con los datos de sensibilidad obtenidos en los fluidos corporales correspondientes de pacientes infectados. A continuación, estas muestras se analizaron con la tira reactiva que se ha descrito previamente en el ejemplo 2 para detectar el serogrupo X meningocócico (véase también 28).

Tal como se muestra en la figura 5, el serogrupo X fue detectable para ambas concentraciones en la orina y no se detectó ninguna banda en la orina no infectada. Estos datos son similares a los obtenidos en muestras de LCR en el ejemplo 2.

En el suero, el serogrupo X se detectó a la concentración de 10^6 UFC/ml pero no a 10^5 UFC/ml, lo que sugiere menor sensibilidad en suero.

Estos resultados demuestran la viabilidad de diagnosticar la infección por *N. meningitidis* en muestras de suero y orina de las personas que se van a analizar.

REFERENCIAS

1. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. 2001. Meningococcal disease. *N Engl J Med*. 344: 1378-1388.
2. Harrison LH, Pelton SI, Wilder-Smith A, Hoist J, Safadi MA, Vazquez JA, Taha MK, LaForce FM, von Gottberg A, Borrow R, Plotkin SA. 2011. The Global Meningococcal Initiative: recommendations for reducing the global burden of meningococcal disease. *Vaccine*. 29: 3363-3371.
3. Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. 2009. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 27 Suppl 2: B51-63.
4. O'Ryan M, Stoddard J, Toneatto D, Wassil J, Dull PM. 2014. A multi-component meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): the clinical development program. *Drugs*. 74: 15-30.
5. Hong E, Giuliani MM, Deghmane AE, Comanducci M, Brunelli B, Dull P, Pizza M, Taha MK. 2013. Could the multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) control *Neisseria meningitidis* capsular group X outbreaks in Africa? *Vaccine*. 31: 1113-1116.

6. Frasch CE, Preziosi MP, LaForce FM. 2012. Development of a group A meningococcal conjugate vaccine, MenAfriVac(TM). *Hum Vaccin Immunother.* 8: 715-724.
7. Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I, Mainassara HB, Tenebray B, Kairo KK, Giorgini D, Chanteau S. 2007. Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. *Clin Infect Dis.* 44: 657-663.
8. Taha MK, Parent Du Chatelet I, Schlumberger M, Sanou I, Djibo S, de Chabalier F, Alonso JM. 2002. *Neisseria meningitidis* serogroups W135 and A were equally prevalent among meningitis cases occurring at the end of the 2001 epidemics in Burkina Faso and Niger. *J Clin Microbiol.* 40: 1083-1084.
9. Collard JM, Issaka B, Zaneidou M, Hugonnet S, Nicolas P, Taha MK, Greenwood B, Jusot JF. 2013. Epidemiological changes in meningococcal meningitis in Niger from 2008 to 2011 and the impact of vaccination. *BMC Infect Dis.* 13: 576.
10. Terrade A, Collard JM, Nato F, Taha MK. 2013. Laboratory evaluation of a rapid diagnostic test for *Neisseria meningitidis* serogroup A. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*
11. Chanteau S, Sidikou F, Djibo S, Moussa A, Mindadou H, Boisier P. 2006. Scaling up of PCR-based surveillance of bacterial meningitis in the African meningitis belt: indisputable benefits of multiplex PCR assay in Niger. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 100: 677-680.
12. Chanteau S, Darteville S, Mahamane AE, Djibo S, Boisier P, Nato F. 2006. New rapid diagnostic tests for *Neisseria meningitidis* serogroups A, W135, C, and Y. *PLoS Med.* 3: e337.
13. European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. Annual Epidemiological Report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC.
14. Nicoli F, Romano MR, Tontini M, Cappelletti E, Gavini M, Proietti D, Rondini S, Swennen E, Santini L, Filippini S, Balocchi C, Adamo R, Pluschke G, Norheim G, Pollard A, Saul A, Rappuoli R, MacLennan CA, Berti F, Costantino P. 2013. Development of a glycoconjugate vaccine to prevent meningitis in Africa caused by meningococcal serogroup X. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110: 19077-19082.
15. Kellogg DS, Jr., Peacock WL, Jr., Deacon WE, Brown L, Pirkle DI. 1963. *Neisseria gonorrhoeae*. I. Virulence Genetically Linked to Clonal Variation. *J Bacteriol.* 85: 1274-1279.
16. Ballard TL, Roe MH, Wheeler RC, Todd JK, Glode MP. 1987. Comparison of three latex agglutination kits and counterimmunoelectrophoresis for the detection of bacterial antigens in a pediatric population. *Pediatr Infect Dis J.* 6: 630-634.
17. Abdillahi H, Poolman JT. 1988. *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. *Microb Pathog.* 4: 27-32.
18. Nato F, Mazie JC, Fournier JM, Slizewicz B, Sagot N, Guibourdenche M, Postic D, Riou JY. 1991. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against group A, B, and C capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* and preparation of latex reagents. *J Clin Microbiol.* 29: 1447-1452.
19. Xie O, Bolgiano B, Gao F, Lockyer K, Swann C, Jones C, Delrieu I, Njanpop-Lafourcade BM, Tamekloe TA, Pollard AJ, Norheim G. 2012. Characterization of size, structure and purity of serogroup X *Neisseria meningitidis* polysaccharide, and development of an assay for quantification of human antibodies. *Vaccine.* 30: 5812-5823.
20. Taha MK, Giorgini D. 1995. Phosphorylation and functional analysis of PilA, a protein involved in the transcriptional regulation of the pilin gene in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* 15: 667-677.
21. Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, Carniel E, Nato F. 2003. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet.* 361: 211-216.
22. Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. 1994. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA.* 271: 703-707.
23. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossel GJ, Bossuyt PM. 2003. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol.* 56: 1129-1135.
24. Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Edu Psychol Measur.* 20: 37-46.
25. Cartwright KA, Reilly S, White D, Stuart J. 1992. Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease. *Bmj.* 305: 143-147.
26. Parent du Chatelet I, Traore Y, Gessner BD, Antignac A, Nacro B, Njanpop-Lafourcade BM, Ouedraogo MS, Tiendrebeogo SR, Varon E, Taha MK. 2005. Bacterial meningitis in Burkina Faso: surveillance using field-based polymerase chain reaction testing. *Clin Infect Dis.* 40: 17-25.
27. Rissin DM., et al. 2010. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at sub-femtomolar concentrations. *Nat. Biotechnol.* 28: 595-600.
28. Agnemelel A. et al. 2015. Development and evaluation of a dipstick diagnostic test for *Neisseria meningitidis* serogroup X. *J Clin Microbiol* 53: 449-454.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpos policlonales, específicos para los polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* serogrupo X (NmX), en donde dichos anticuerpos son adecuados para la detección *in vitro* de *Neisseria meningitidis*, serogrupo X, por ensayo inmunocromatográfico, en fluidos biológicos sin cultivo, en donde dichos anticuerpos no reaccionan de forma cruzada con *Neisseria meningitidis*, serogrupos A, B, C, Y, W, Z, E, H, I, K y L, y en donde dichos anticuerpos se pueden obtener mediante la inmunización de un mamífero con *Neisseria meningitidis*, serogrupo X, seguido de la purificación del suero de mamífero por cromatografía de afinidad con polisacáridos capsulares purificados de *Neisseria meningitidis*, serogrupo X.
2. Anticuerpos policlonales de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos anticuerpos se aíslan de un suero de mamífero no humano inmunizado, preferentemente, suero de conejo.
3. Un agente de diagnóstico caracterizado por que comprende anticuerpos policlonales tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, unidos directa o indirectamente, covalente o no covalentemente a un marcador de detección.
4. Un método para detectar *in vitro* o *ex vivo* *Neisseria meningitidis*, serogrupo X, en un fluido biológico, comprendiendo dicho método
 - a. poner en contacto *in vitro* dicho fluido con anticuerpos policlonales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o con un agente de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 3, y
 - b. determinar la presencia o ausencia de antígenos de *Neisseria meningitidis*, serogrupo X, en dicho fluido.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la etapa b) se lleva a cabo detectando la presencia o ausencia del complejo formado entre los anticuerpos policlonales y los antígenos solubles de NmX, preferentemente mediante un componente de detección específico para los anticuerpos policlonales.
6. Un método *in vitro* para diagnosticar una infección por *Neisseria meningitidis*, serogrupo X, en un sujeto, que comprende llevar a cabo el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto, en donde la presencia de antígenos de *Neisseria meningitidis*, serogrupo X, en dicho fluido es indicativo de infección por *Neisseria meningitidis*, serogrupo X.
7. Un kit de diagnóstico para detectar *Neisseria meningitidis*, serogrupo X, que comprende anticuerpos policlonales de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y/o un agente de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 3, y medios para detectar la producción de un inmunocomplejo entre dichos anticuerpos y antígenos de NmX.
8. El kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 7, para detectar NmX en una muestra de fluido biológico sin cultivo, preferentemente de líquido cefalorraquídeo, sangre, suero u orina.
9. El kit de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, que permite la detección por inmunoensayo, en donde dicho inmunoensayo es preferentemente una prueba de diagnóstico rápido, una prueba de aglutinación o una prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
10. Una prueba de diagnóstico con tira reactiva para NmX, que comprende una membrana, preferentemente una membrana de nitrocelulosa, en donde dicha membrana comprende:
 - a. una primera zona que comprende anticuerpos policlonales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, conjugados con un marcador de detección o un agente de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 3;
 - b. una zona de control que comprende un polipéptido de control inmovilizado, preferentemente anticuerpos de control,
 - c. una zona de captura que comprende anticuerpos policlonales inmovilizados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, como anticuerpos de captura.
11. La prueba de diagnóstico con tira reactiva de acuerdo con la reivindicación 10, en donde los polipéptidos de control inmovilizados son anticuerpos que reconocen los anticuerpos policlonales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
12. La prueba de diagnóstico con tira reactiva de acuerdo con la reivindicación 11, en donde los anticuerpos policlonales son anticuerpos de conejo y en donde los polipéptidos de control inmovilizados son anticuerpos anti-conejo, preferentemente anticuerpos anti-conejo en cabra o ratón.
13. El kit o ensayo de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, caracterizado por una sensibilidad de al menos el 90 %, preferentemente al menos el 92 %, 93 % o 94 %, y una especificidad de al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, 98 % o 99 %.

14. Uso de un kit o prueba de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, para el diagnóstico *in vitro* de infección por NmX en la muestra biológica de un sujeto.

5 15. Un método para producir anticuerpos policlonales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende:

a. inmunizar un hospedador animal no humano con una composición inmunogénica que comprende bacterias *Neisseria meningitidis* serogrupo X;

10 b. aislar del suero de dicho hospedador animal, los anticuerpos específicos para *Neisseria meningitidis* serogrupo X, por cromatografía de afinidad con polisacárido capsular purificado de *Neisseria meningitidis*, serogrupo X.

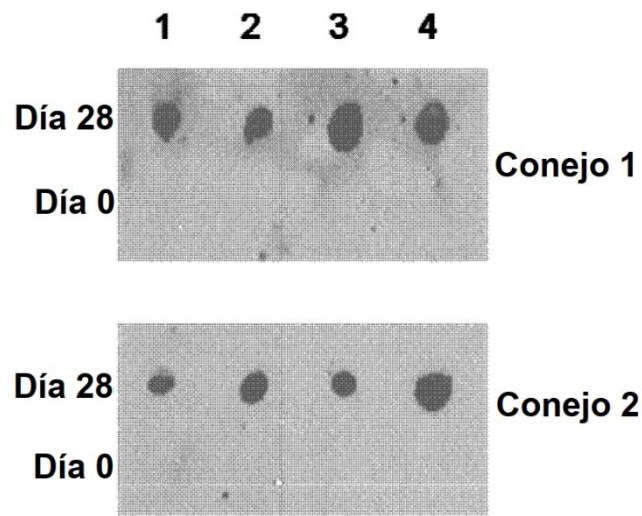


FIG. 1

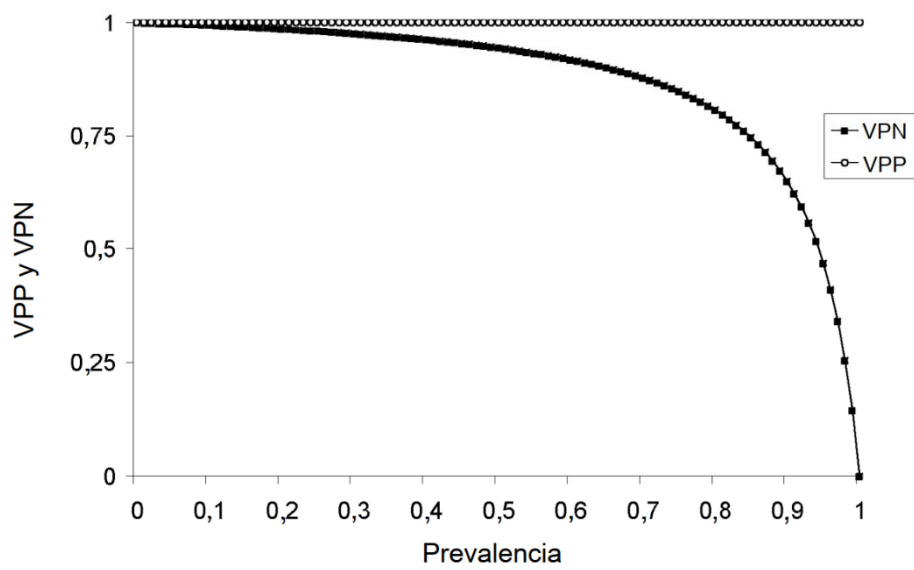
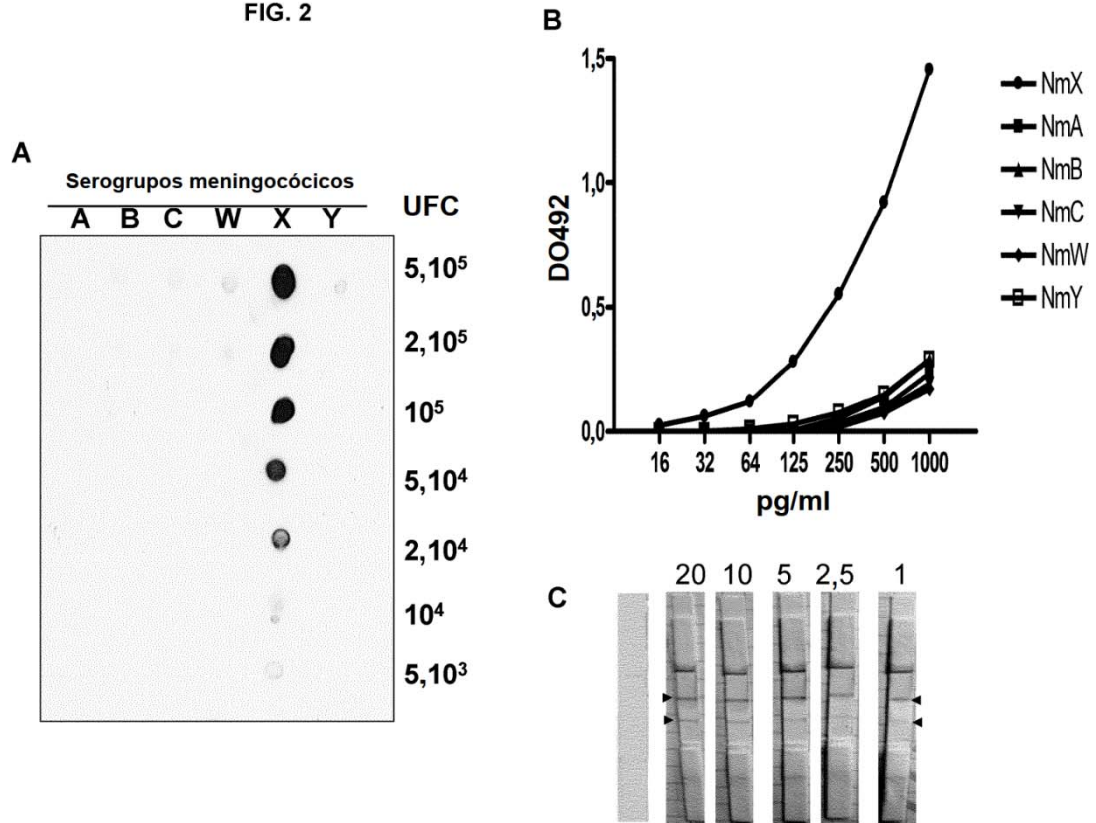
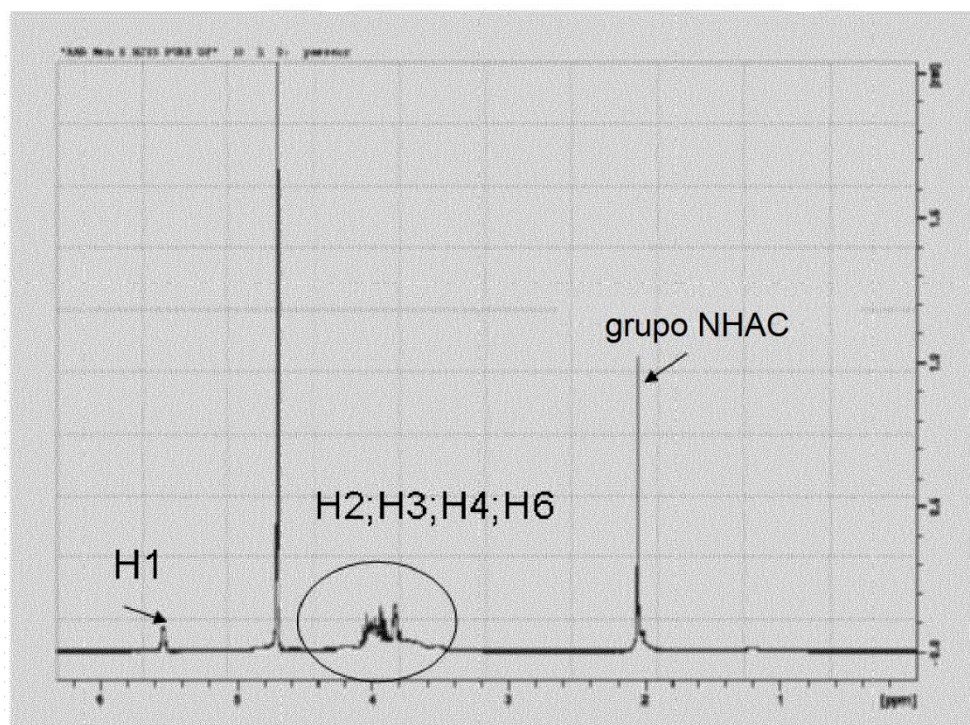
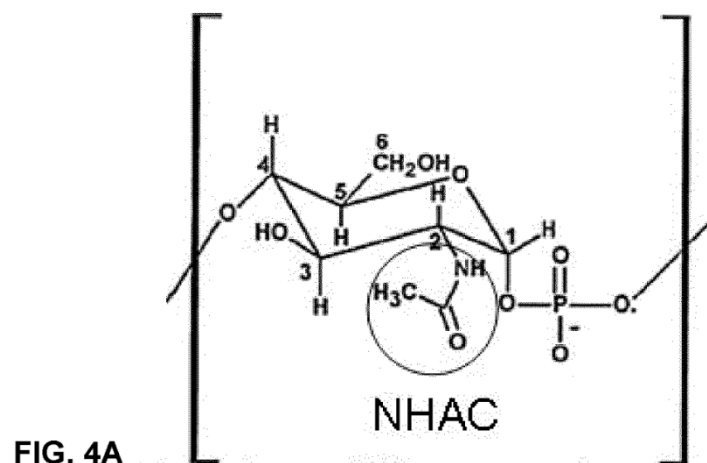


FIG. 3

FIG. 2





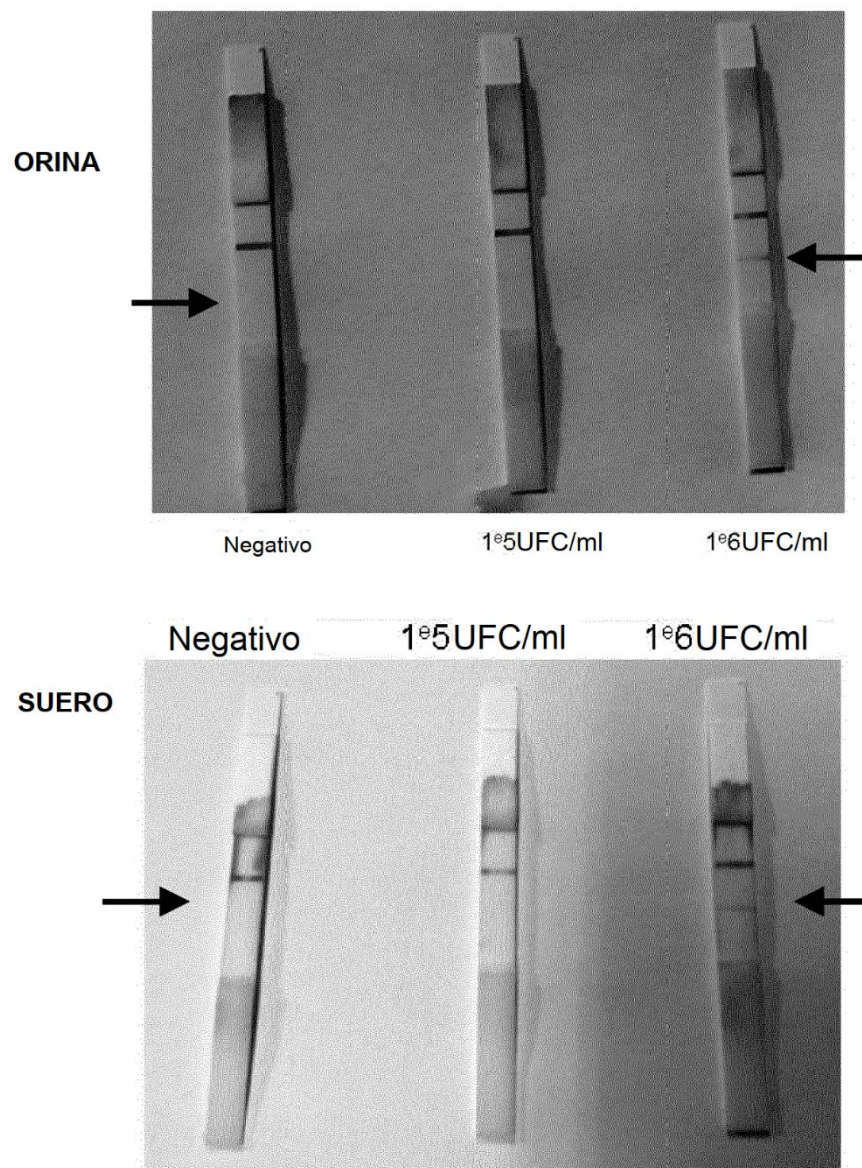


FIG.5