OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE NEURAMINIDASA DE Vibrio cholerae O1

Mairet Pérez,[1] Hilda M García,[2] José L Pérez,[2] Bárbara Cedré[2] y ✉Luis García[2]

[1]*División Vacunas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, AP 6162, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: Ricardo.Silva@cigb.edu.cu*

[2]*Laboratorio de Bacterias Enteropatógenas. Instituto Finlay, Ciudad de La Habana, Cuba.*

ABSTRACT

Neuraminidase, a secreted enzyme from *Vibrio cholerae* O1, is considered a virulence factor, because it increases the number of cholera toxin's receptors in the gut. Besides, this protein is widely used in investigations involving sialocompounds, in order to know the role of sialic acid residues in different biologic functions. In this work we compared neuraminidase expression levels in 5 *V. cholerae* O1 strains from different biotypes and serotypes. The 569B strain (Biotype Classic, Serotype Inaba) had the highest level and with this strain we designed a purification procedure that included: ammonium sulphate precipitation combined with pH of minimum solubility of the protein, gel-filtration chromatography (Sephacryl S-200HR), and finally ion-exchange chromatography (Q-Sepharose FF). This scheme gave us a 30 % of recovery with 98 % purity as determined by gel-filtration in HPLC. Purified neuraminidase was used for the pre-treatment of human sera previous to a hemagglutination-inhibition test with influenza type B virus. The enzyme was effective in the removal of non-specific inhibitors of the sera and it yielded similar results that a standard neuraminidase from a commercial source.

Key words: neuraminidase, *V. cholerae*, purification

Biotecnología Aplicada 1997;14:256-261

RESUMEN

La neuraminidasa, una enzima secretada por *Vibrio cholerae* O1, es considerada un factor de virulencia por aumentar el número de receptores a la toxina de este microorganismo en los enterocitos. Además, esta enzima es de amplio uso en las investigaciones con sialocompuestos, para el esclarecimiento de la participación de los restos de ácido siálico en diferentes funciones biológicas. En el presente trabajo comparamos los niveles de expresión de esta enzima por 5 cepas de diferentes biotipos y serotipos de *V. cholerae* O1. Se seleccionó la cepa 569B (Biotipo Clásico, Serotipo Inaba) como la más productora, y a partir de ella se estableció un protocolo de purificación que incluyó: precipitación con sulfato de amonio al pH de menor solubilidad de la proteína, y cromatografías de filtración en gel (Sefacril S-200HR) e intercambio iónico (Q-Sefarosa FF). Estos pasos suministraron la enzima con un rendimiento del 30 % y un nivel de pureza del 98 % determinado por gel-filtración en HPLC. La neuraminidasa obtenida fue utilizada para el tratamiento de sueros humanos previo a la prueba de inhibición de la hemaglutinación con virus influenza tipo B. La enzima fue efectiva en la eliminación de inhibidores inespecíficos de los sueros y dio resultados similares a los de una neuraminidasa comercial utilizada como control.

Palabras claves: neuraminidasa, *V. cholerae*, purificación

Introducción

La bacteria *Vibrio cholerae* O1 es el agente etiológico del cólera, una infección intestinal aguda que puede llevar a una rápida deshidratación, acidosis, y a la muerte en el 50 % de los casos graves. En la patogénesis de la enfermedad el evento de mayor importancia es la secreción al lumen intestinal de una enterotoxina cuyo receptor celular es el gangliósido GM_1. La subunidad A de esta proteína posee la actividad ADP-ribosil transferasa que desencadena las reacciones bioquímicas causantes de los síntomas característicos de la enfermedad: activación de adenilato-ciclasa, inhibición del consumo de Na^+, aumento de la secreción de Cl^-, y grandes pérdidas de fluido en general (1).

El *V. cholerae* O1 secreta también otras proteínas consideradas importantes factores de virulencia. Una de estas proteínas es la enzima neuraminidasa, una glicosidasa que actúa a nivel intestinal y convierte los oligosialogangliósidos a GM_1; de esta forma aumenta el número de receptores a la toxina y la cantidad efectiva de toxina acoplada a los mismos (2, 3).

Además de su función en la patogenia del cólera, la enzima neuraminidasa es muy usada en la práctica con fines investigativos. La reacción que cataliza es la liberación de los residuos terminales de ácido N- u O- acilneuramínico presentes en oligosacáridos, polisacáridos, mucopolisacáridos, glicoproteínas y glicolípidos. Como dichos residuos de ácido siálico son constituyentes de muchos receptores de toxinas, hormonas y neurotransmisores, así como de moléculas de adhesión celular, los tratamientos con neu-

✉ Autor de correspondencia

1. Spangler BD. Structure and function of the cholera toxin and other related enterotoxins. Microbiol Rev 1992;56:622-636.

2. Kaper JB, Morris JG, Levine MM. Cholera. Clin Microbiol Rev 1994;1(1).

3. Galen JE, Ketley JM, Fassano A, Richardson SH, Wasserman SS, Kaper JB. Role of Vibrio cholerae neuraminidase in the function of cholera toxin. Infection and Immunity 1992;60:406-415.

raminidasa resultan muy valiosos en los estudios básicos sobre glicoconjugados y en el esclarecimiento de la posible participación de estos residuos en la función biológica particular (4, 5).

En el presente trabajo estudiamos la producción de neuraminidasa por 5 cepas pertenecientes a diferentes biotipos y serotipos de *V. cholerae* O1 con el objetivo de seleccionar una cepa buena productora, de la cual obtener la enzima con la mayor pureza y rendimiento posibles. La neuraminidasa de *V. cholerae* ha sido purificada con anterioridad usando la cromatografía de adsorción en hidroxiapatita (6). También ha sido producida en la bacteria *Escherichia coli* y purificada mediante precipitación salina y filtración en gel (7). En nuestro caso, para la obtención de un preparado enzimático de alta pureza combinamos una precipitación salina diferencial con las cromatografías de filtración en gel e intercambio iónico.

La funcionalidad de la enzima purificada se verificó al tratar con ella los sueros que serían evaluados en inhibición de la hemaglutinación viral.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Se utilizaron 5 cepas pertenecientes a la especie *V. cholerae* O1 de diferentes biotipos y serotipos:

- 569B (Biotipo Clásico, Serotipo Inaba), Universidad de Missouri, EE. UU., R.A. Finkelstein.
- 395 (Biotipo Clásico, Serotipo Ogawa), Center for Vaccine Development, EE. UU., J. Kaper.
- T19479 (Biotipo El Tor, Serotipo Inaba), Depto. Microbiología e Inmunología, Universidad de Goteborg, Suecia, A.M. Svennerholm.
- JBK70 (Biotipo El Tor, Serotipo Inaba) y N16961 (Biotipo El Tor, Serotipo Inaba), Centro de Investigaciones de Enfermedades Infecciosas, Cuernavaca, México, J. Sánchez.

Las bacterias crecieron en 500 mL de peptona bacteriológica (OXOID) 3 % (p:v) pH 7,4 durante 8 h a 37 °C, con agitación en zaranda a 200 rpm.

El cultivo se centrifugó a 6 400 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante con la proteína de interés se recuperó.

Actividad enzimática

Las muestras se diluyeron 1:2 (v:v) en solución tampón acetato 0,1 M con cloruro de calcio 0,02 M pH 5,5 (6). A la mezcla de reacción se adicionó el sustrato (GD_{1a} 9 mM en la misma solución tampón) en una relación 1:5 (v:v). Las mezclas se incubaron durante 30 min a 37 °C. Las condiciones para la actividad enzimática (concentración de sustrato y tiempo de reacción) habían sido previamente estandarizadas por nosotros (no se muestran los resultados). La reacción se detuvo calentando 2 min a 100 °C. La cantidad de ácido N-acetil neuramínico (NANA) liberado fue determinado cualitativamente por cromatografía en capa fina empleando Sílica gel 60 (MERCK) como soporte; se reveló con resorcinol-HCl (8), o se determinó cuantitativamente por el método del ácido tiobarbitúrico (9).

La actividad enzimática fue expresada en unidades internacionales, donde:

- 1 unidad internacional (UI) corresponde a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de NANA en 1 min a 37 °C.

Purificación de la enzima

El sobrenadante libre de células fue concentrado 10 veces usando un equipo Hollow-fiber DC-2 (AMICON) con membrana de poro de exclusión 10 kDa. A continuación se realizó una precipitación con sulfato de amonio al 40 % de saturación durante 2 h a 4 °C. La proteína precipitada se removió por centrifugación a 6 400 g a 4 °C durante 15 min, y al sobrenadante se le añadió sulfato de amonio hasta el 60 % de saturación, y se dejó precipitar durante 30 min a 4 °C; en este segundo paso de precipitación se ajustó el pH a 3,5 con ácido ortofosfórico 17 % (p:v).

El precipitado obtenido se resuspendió a una concentración de proteínas final de 25 mg/mL en solución tampón fosfato 1 mM pH 6,8 y se aplicaron 5 mL en una matriz Sefacril S-200HR (Pharmacia, LKB) equilibrada en igual solución tampón y empacada en una columna XK 16/100 (Pharmacia, LKB). Se colectaron fracciones de 3 mL, a las cuales se les determinó cuantitativamente la actividad enzimática; las fracciones con valores por encima de 0,2 U/mL se reunieron y esta muestra se aplicó en una cromatografía de intercambio iónico empleando la matriz Q-Sefarosa FF (Pharmacia, LKB) equilibrada en solución tampón fosfato 1 mM pH 6,8. Luego de lavar con 10 volúmenes de columna, las proteínas se eluyeron y así aumentó la fuerza iónica hasta 1M de cloruro de sodio. Estas muestras fueron dializadas contra tampón acetato pH 5,5 durante 12 h a 4 °C, y en esas condiciones conservadas a 4 °C.

La pureza e integridad de las muestras se verificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de filtración en gel, con una columna TSK G-3000 (Toyo SODA, Japón).

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (10).

Inhibición de la hemaglutinación

Se realizó el ensayo de inhibición de la aglutinación de eritrocitos con el virus de influenza humano tipo B; para ello se emplearon sueros de individuos antes y un mes después de haber recibido una vacuna antigripal (vacuna viva atenuada adaptada al frío B/14/5/1, del Instituto de Medicina Experimental de San Petersburgo, Rusia).

4. Hulinska D, Volf P, Grubhoffer L. Characterization of Borrelia burgdorferi glycoconjugates and surface carbohydrates. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1992;276:473-480.

5. Rens-Domano S, Reisine T. Strudural and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptors. J Biol Chem 1991;266:20094-20102.

6. Ada GL, French EL, Lind PE. Purification and properties of neuraminidase from Vibrio cholerae. J Gen Microbiol 1961;24:409-421.

7. Taylor G, Vimr E, Garman E, Laver G. Purification, crystallization and preliminary cristallographic study of neuraminidase from Vibrio cholerae and Salmonella typhimurium LT2. J Mol Biol 1992;226:1287-1290.

8. Svennerholm L. Procedure for quantitative isolation of brain gangliosides. Neurochem 1957;24:604-611.

9. Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of N-acetyl neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem J 1961;81: 384-391.

10. Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275.

Para la eliminación de los inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación existentes en los sueros se empleó el siguiente tratamiento enzimático (11):

Los sueros se diluyeron 1:6 (v:v) en tampón acetato incluyendo 2,5 mUI de neuraminidasa de *V. cholerae* por cada muestra, y se incubaron 18 h a 37 °C. En nuestro caso usamos una enzima de referencia (neuraminidase from *V. cholerae*, Boehringer Mannheim 20 UI/mg) así como la enzima purificada en este trabajo.

A continuación se añadieron 8 unidades hemaglutinantes del virus de influenza humano tipo B y se realizó el ensayo de aglutinación con eritrocitos humanos (11).

Los títulos de los sueros fueron considerados como la mayor dilución del suero donde se observó el botón correspondiente a los hematíes no aglutinados, y los títulos superiores a 1:80 fueron considerados positivos.

Resultados y Discusión

Obtención de neuraminidasa

La selección de la cepa más productora se hizo por determinación de la actividad enzimática a los sobrenadantes de cultivos de las diferentes cepas utilizadas. Como se muestra en la Tabla 1, la cepa 569B (biotipo clásico, serotipo inaba), fue la de mayor actividad enzimática. Esto coincide con lo planteado por otros autores (12), quienes en general han encontrado que las cepas del biotipo clásico son más productoras de neuraminidasa que las del biotipo El Tor. Coincidentemente, las cepas del biotipo clásico son más productoras de toxina *in vivo*, por lo que se ha especulado sobre la existencia de una correlación entre la secreción de toxina colérica y neuraminidasa. En cualquier caso, el resultado es que las cepas del biotipo clásico provocan pérdidas de fluido que ocasionan un mayor volumen de diarreas, a diferencia de las cepas del biotipo El Tor, las cuales en ocasiones provocan sólo infecciones asintomáticas. La cepa 569B, en particular, es hiperproductora de toxina, y en nuestras condiciones experimentales también resultó ser la más eficiente en producción de neuraminidasa (Tabla 1).

Para cada cepa se evaluó la actividad enzimática cualitativamente para dos tiempos de incubación muestra-sustrato (20 y 80 min de reacción) con el objetivo de ver si se lograba un total agotamiento del GD_{1a}. Como se muestra en la Figura 1, esto se logró con la cepa 569B coincidiendo con el resultado de la determinación cuantitativa anterior.

Con la utilización de la técnica de cromatografía en capa fina se determinó la especificidad de sustrato que presenta la enzima estudiada, y se comprobó que sólo libera el resto de ácido siálico más externo del GD_{1a} (que es el que cuantificamos por el método del ácido tiobarbitúrico). A pesar de tener el GM_1 otro resto de ácido siálico que podría ser liberado, este no es utilizado como sustrato por la enzima pues está inaccesible por impedimentos estéricos en la estructura del gangliósido (13, 14). Como se muestra en la Figura 1, incluso a los 80 min de acción de la neuraminidasa de la cepa 569B, en que el GD_{1a} desapareció completamente, el GM_1 se mantuvo sin ser desialilado por la enzima.

Tabla 1. Relación entre la actividad enzimática y el rendimiento celular.

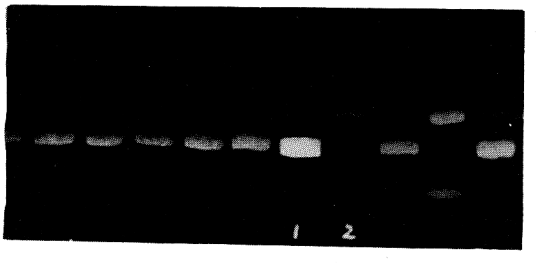
Cepas	N16961	JBK70	T19479	569B	395
Act. enz. cuantitativa (U/mL)	0,06	0,077	0,055	0,112	0,094
Act. enz. cualitativa	+(*)	++	+	+++++	+++
Rend. celular (g/L) Peso húmedo	8,32	10,32	9,94	7,28	8,1
Act. enz. / rend. cel. (U/mg)	0,0072	0,0075	0,0055	0,015	0,011

(*): Un mayor número de signos positivos se corresponde con una mayor actividad enzimática cualitativa.

Purificación de la enzima

Durante el proceso de purificación de neuraminidasa determinamos la actividad cuantitativamente por el método del ácido tiobarbitúrico (9). En el proceso seguido para la purificación partimos de un sobrenadante de cultivo concentrado diez veces para facilitar el trabajo con volúmenes menores. El poro de exclusión de la fibra utilizada fue de 10 kDa, lo que permite la eliminación de contaminantes con pesos moleculares menores de esa talla, así como productos de degradación.

Seguidamente, usando un efecto combinado de la fuerza iónica y el pH de mínima solubilidad de la en-



Ia Ib IIa IIb IIIa IIIb 1 2 IVa IVb Va Vb

Figura 1. Cromatografía en capa fina para la determinación cualitativa de actividad neuraminidasa. Líneas Ia y Ib: Cepa N16961, Líneas IIa y IIb: Cepa JBK70, Líneas IIIa y IIIb: Cepa T19479, Líneas IVa y IVb: Cepa 569B, Líneas Va y Vb: Cepa 395. En todos los casos a) corresponde a 20 min de reacción enzimática y b) a 80 min. Como patrones en 1: GD_{1a} (Sigma), 2: GM_1 (Sigma).

11. Subi K. The hemagglutinating unit of Influenza virus in the hemagglutination-inhibition test. Rev Roum Med Virol 1984; 35:69-70.

12. Kabir S, Ahmad N, Ali S. Neuraminidase production by Vibrio cholerae O1 and other diarrheagenic bacteria. Infection and Immunity 1984;44:747-749.

13. Portoukalian J, Bouchan B. Hydrolysis of all gangliosides by Vibrio cholerae neuraminidase. J of Chromatography 1986;380:386-392.

14. Ogura K, Ogura M, Anderson RL, Sweley CC. Peroxidase-amplified assay of sialidase activity toward gangliosides. Anal Biochemistry 1992;200:52-57.

zima (determinado por nosotros en experimentos previos no mostrados), logramos enriquecer la proteína de interés a partir del crudo inicial concentrado. En el precipitado obtenido con un 40 % de saturación de sulfato de amonio hubo una mínima pérdida de actividad enzimática, la que quedó mayoritariamente en el sobrenadante. En el otro paso de la precipitación fraccionada no detectamos ninguna actividad neuraminidasa en el sobrenadante y sí en el precipitado, si bien la recuperación no fue total. Esto pudiera deberse a una menor estabilidad de la enzima a pH 3,5, lo que provocaría desnaturalización de una parte de la misma y pérdida de su actividad. No obstante, preferimos este método pues resultó más efectivo en la precipitación total de la proteína que cuando no ajustamos el pH y se precipitaba sólo por el efecto de la sal. Al utilizar sólo una precipitación fraccionada con sulfato de amonio como en trabajos anteriores (15) es necesario en el segundo paso adicionar sulfato de amonio hasta un 80 % de saturación para que precipite completamente la proteína de interés; con ello aumentan también los contaminantes precipitados a esa mayor fuerza iónica. En nuestro caso, al complementar el efecto de la sal con el del pH de mínima solubilidad, se favoreció la precipitación preferencial de la neuraminidasa con un por ciento de saturación de sulfato de amonio inferior (60 %) al anteriormente utilizado.

El precipitado del paso anterior se resuspendió en un volumen mínimo de tampón fosfato 1 mM pH 6,8, aproximadamente 15 mL (concentración de proteínas 25 mg/mL), así se restituyó a la enzima en un valor de pH en el cual resulta más estable, y en estas condiciones se realizaron los pasos cromatográficos siguientes.

Las muestras reconstituidas tras la precipitación quedan con una alta concentración salina, la que es eliminada mediante el paso de filtración en gel que se realiza a continuación. Aunque la cromatografía de exclusión molecular tiene limitación en el volumen de aplicación, pudimos realizar un procesamiento rápido de toda la muestra al resuspender el precipitado en un volumen pequeño. Probamos las matrices Sefacril S-100HR y Sefacril S-200HR, y se obtuvieron cromatogramas similares al mostrado en la Figura 2 en ambos casos. En el Sefacril S-200HR, la actividad enzimática se detectó sólo en la subida e inicio del segundo pico; de este modo se aisló la enzima de los contaminantes que eluían primero (Figura 2). En el caso del Sefacril S-100HR, la actividad se detectaba tanto en el primero como en el segundo pico, por lo que decidimos trabajar con la matriz Sefacril S-200HR en nuestro esquema final de purificación. La neuraminidasa de *V. cholerae* obtenida recombinante en *E. coli*, ha sido purificada por otros autores utilizando una matriz Sefacril-300 (7) que en nuestro caso no consideramos necesario utilizar, pues como ya ha sido mencionado logramos una buena resolución con la matriz Sefacril

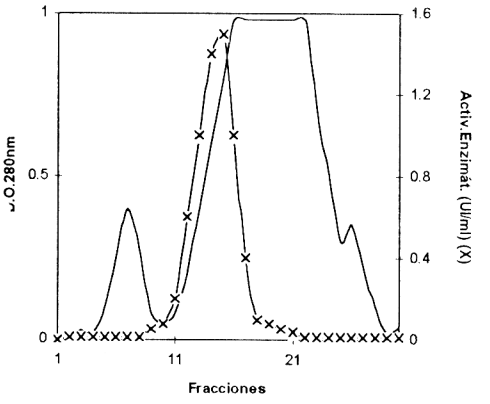


Figura 2. Perfil cromatográfico de la cromatografía de exclusión molecular. Matriz: Sefacril S-200HR; flujo: 9 cm/h; línea continua: D.O.; línea discontinua: actividad enzimática.

S-200HR. Por demás, el peso molecular de la proteína a purificar (aproximadamente 85 kDa), se encuentra en el rango de separación de las dos matrices probadas en este trabajo.

En el segundo pico del cromatograma obtenido en la filtración en gel, la absorbancia a 280 nm se mantuvo elevada durante 10 fracciones aproximadamente. Esto pudiera deberse a la fuerte pigmentación de la muestra aplicada en la columna, aportada probablemente por componentes del medio de cultivo que no se habían logrado eliminar aún, y que absorben también a esta longitud de onda. Tratamos de variar el medio de cultivo, pero los rendimientos en la actividad enzimática obtenidos fueron significativamente menores, por lo que continuamos el trabajo con peptona bacteriológica 3 %. No obstante, las fracciones que eluyeron con altos valores de actividad neuraminidasa (inicio del segundo pico), no resultaron pigmentadas.

Posteriormente, la muestra (fracciones de la 11 a la 17, Figura 2) fue aplicada en un intercambiador aniónico al cual debe fijarse la neuraminidasa al encontrarse por encima de su pH isoeléctrico (pI < 5) en las condiciones de la corrida (tampón fosfato 1 mM pH 6,8). En este paso se pudo procesar un volumen grande de muestra por la alta capacidad de la matriz empleada (Q-Sefarosa FF). Para la elución, se fue aumentando gradualmente la concentración de cloruro de sodio, y a las fracciones colectadas se les determinó actividad enzimática. Finalmente, decidimos utilizar 0,15 M NaCl para la eliminación de los contaminantes que se pegaban más débilmente a la matriz; 0,23 M NaCl para eluir la neuraminidasa en una sola fracción, y 1 M NaCl para el lavado final de la columna. El cromatograma típico obtenido con estas condiciones de elución aparece en la Figura 3.

Un resumen de los parámetros controlados durante el proceso de purificación aparece en la Tabla 2.

15. Vimr E, Galen J, Lawrisuk L, Kaper JB. Cloning and expression of the Vibrio cholerae neuraminidase gene nanH in Escherichia coli. J Bacteriology 1988; 170:1495-1504.

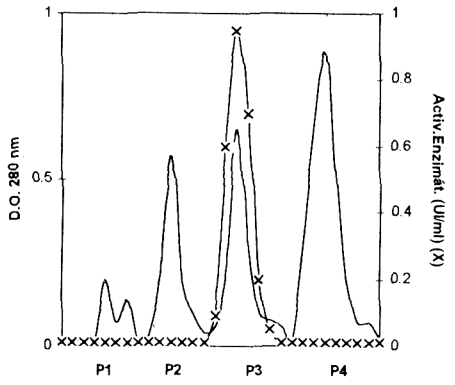


Figura 3. Perfil cromatográfico de la cromatografía de intercambio iónico. Matriz: Q-Sefarosa FF. Flujo de aplicación: 24 cm/h; Flujo de elución: 90 cm/h; P1: No fijado a l matriz; P2: Eluido con NaCl 0,15 M; P3: Eluido con NaCl 0,23 M; P4: Eluido con NaCl 1 M.

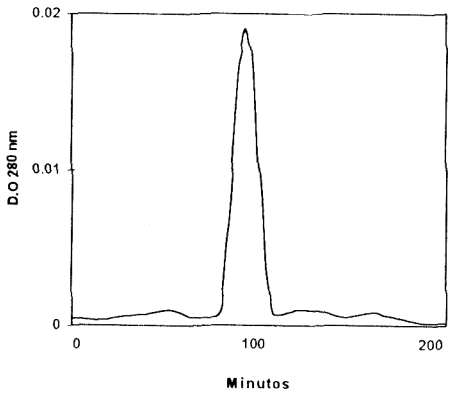


Figura 4. Perfil cromatográfico de HPLC; matriz: TSK G-3000; flujo: 12 cm/h.

En la Figura 4 se muestra la evidencia (filtración en gel HPLC) del alto grado de pureza (98 %) alcanzado tras los dos procesos cromatográficos. La recuperación global de la actividad de la enzima fue del 30 % tomando como referencia la actividad inicial existente en el sobrenadante de cultivo. Resultados similares en cuanto a rendimiento han sido obtenidos en trabajos de purificación anterior tanto para la neuraminidasa natural purificada por cromatografía de adsorción en hidroxiapatita (6) como para la recombinante producida en *E. coli* y purificada por Sefacril-300 (7).

Sin embargo, consideramos que el grado de pureza (98 %) obtenido con nuestro protocolo de dos pasos cromatográficos debe ser superior al alcanzado en ambos casos, aunque en ninguno de ellos se cuantificó el por ciento de pureza logrado.

La actividad enzimática de nuestra preparación purificada se mantuvo invariable durante al menos 6 meses de conservación a 4 °C (no se muestran los resultados), lo que sugiere que la misma está libre de proteasas contaminantes secretadas al medio por *V. cholerae* (16), las que en cantidades trazas pudieran degradar en largos períodos de tiempo a la enzima obtenida.

Por último, nuestro protocolo ha resultado ser de excelente reproducibilidad en nuestras condiciones experimentales, y en principio resulta escalable para la producción de cantidades mayores de la enzima.

Inhibición de la hemaglutinación

En los sueros humanos normales existen inhibidores no específicos de la reacción de aglutinación del virus de la influenza con los eritrocitos. Estos inhibidores que se suponen sean sialocompuestos pueden ser eliminados mediante tratamientos químicos o enzimáticos, se obtienen menos frecuencia de falsos seropositivos y por tanto, valores más reales en estos ensayos (11). Con el método enzimático, en el que se aplica el tratamiento con la enzima neuraminidasa, se obtiene una mayor especificidad que con la oxidación química con periodato, por lo que generalmente es preferible para este propósito.

En nuestro trabajo los sueros fueron tratados enzimáticamente como se menciona en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 3. En ambos casos se aprecia que después de la vacunación aumenta el número de seropositivos. La comparación de los resultados obtenidos empleando la neuraminidasa purificada en este trabajo y la disponible comercialmente (Boehringer-Mannheim) reflejó un comportamiento muy similar de las dos enzimas.

Tabla 2. Resumen del proceso de purificación.

Pasos de la purificación	Unidades totales (U)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Sobrenadante	258	14	35 000	0,0074	1	100
Concentrado	240	27	6 750	0,035	4,7	93
Sulf. de amonio	170	25	725	0,23	31	66
Sefacril S-200HR	150	0,4	150	1	135	58
Q-Sefarosa FF	78	0,2	24	3,25	439	30

16. Schneider DR, Parker CD. Isolation and characterization protease deficient mutants of Vibrio cholerae. J Infect Dis 1978;138:143-149.

Tabla 3. Resultados de la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

Vacunación		Tratamientos	
		A	B
Antes	SP	3	3
	SN	25	25
Después	SP	9	10
	SN	19	18

A: tratamiento enzimático de los sueros (neuraminidasa comercial); B: tratamiento enzimático de los sueros (neuraminidasa purificada en este trabajo); SP: seropositivos; SN: seronegativos.

Conclusiones

La neuraminidasa de *V. cholerae* O1 puede ser obtenida hasta con un 98 % de pureza mediante el procedimiento descrito en este trabajo, el cual es escalable y repetible. La neuraminidasa obtenida resulta completamente funcional para ser utilizada en trabajos con sialocompuestos, por ejemplo en la eliminación de inhibidores inespecíficos del ensayo de la hemaglutinación viral.

Recibido en diciembre de 1996. Aprobado en julio de 1997.

Agradecimientos

Agradecemos al doctor Rodrigo Felipe Varela del Laboratorio de Medios Diagnósticos de la División de Virología del Instituto Finlay, por su asesoramiento para la realización de la prueba de inhibición de la hemaglutinación. También al licenciado Enrique Muñoz de la Unidad Analítica del propio Instituto, por su ayuda en la cromatografía de alta resolución, y a Orlando L Pardo por la revisión del manuscrito.