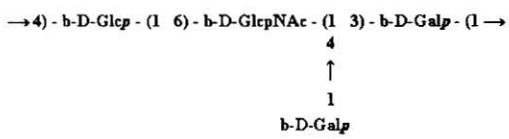
PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR DE Streptococcus pneumoniae CEPA 14

Fernando Ferreira,[1] Laura Franco-Fraguas,[2] Ana Cantera,[2] Ester Texeira,[3] Hugo Massaldi,[3] Norma Suárez[1] y Mónica Altez[1]

[1]*Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados, Facultad de Química/Instituto de Higiene, Av. Alavarro 3051, Montevideo, Uruguay. E-mail: fferreir@bilbo.edu.uy*
[2]*Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, General Flores 2124, Montevideo, Uruguay.*
[3]*División de Producción, Instituto de Higiene, Av. Navarro 3051, Montevideo, Uruguay.*

Muchas bacterias patogénicas producen polisacáridos capsulares que son esenciales para la virulencia. La cápsula constituye la capa más externa de la célula bacteriana, y con frecuencia representan los principales determinantes antigénicos tipo-específicos. Es de particular interés la obtención de polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* puros, ya que pueden ser empleados en la inmunización de adultos y niños mayores de 5 años. La obtención de polisacáridos capsulares puros también es importante ya que pueden ser empleados en la preparación de conjugados polisacáridos-proteina, que al ser administrados actúan como antígenos T-dependientes capaces de conferir inmunidad a todos los grupos etarios y personas con compromiso inmune.

La cepa 14 de *S. pneumoniae* es particularmente importante tanto por su alta incidencia en la región, y en particular en Uruguay, así como por ser la más frecuente en los aislamientos de neumococos resistentes a penicilina en casos clínicos de pneumonía y meningitis. La cápsula de *S. pneumoniae* cepa 14 está constituído por un polisacárido neutro formado por unidades repetitivas de un tetrasacárido con la siguiente estructura:



Para la obtención del polisacárido con alta pureza y en pequeñas cantidades se ha desarrollado un método de purificación empleando lectinas inmovilizadas. La lectina de soja (*Gliciñe max*) reconoce específicamente residuos de b-D-galactosa y b-D-N-acetil-galactosamina. Lisados de medios de cultivo de la cepa 14 de *S. pneumoniae*, luego de dializados y liofilizados fueron disueltos en buffer acetato 0,1 M, pH 6,0, suplementado con iones divalentes y aplicados a una columna de afinidad de origen comercial, preparada con lectina de soja inmovilizada sobre Sepharose-4B. La muestra se aplicó directamente, la columna fue lavada con el mismo buffer y el polisacárido eluído selectivamente con una solución de galactosa 0,1 M. Luego de dializar y liofilizar el eluído, la identidad y pureza del producto fueron ensayados por un reactivo de látex específico, por análisis de azúcares y proteínas, y ^{1}H- y ^{13}C-NMR. El método propuesto es mas rápido y sencillo que los tradicionales, y el producto obtenido posee una elevada pureza, que lo hace adecuado para la purificación de este polisacárido en pequeña escala.

Para la obtención del polisacárido capsular en mayores cantidades, se desarrolló un método de purificación a partir de medios de cultivos inactivados y lisados de la cepa 14 de *S. pneumoniae*. El sobrenadante luego de la centrifugación es concentrado por diafiltración a 1/10 del volumen, y se agrega etanol hasta una concentración del 20 %. Luego de centrifugar, se adiciona etanol al sobrenadante límpido hasta una concentración final del 65 %. La mezcla se deja reposar a 4 °C durante toda la noche, y el crudo de polisacárido precipitado se separa del líquido madre por centrifugación. El precipitado se suspende en buffer fosfato 0,01 M, pH 7,0 y se trata con 1,000 UI de proteasas microbianas. La mezcla se incuba toda la noche a 37 °C, se dializa contra agua destilada, y liofiliza. El residuo liofilizado se retoma en buffer fosfato 0,01, pH 8,0, y se aplica a una columna de DEAE Sepharose equilibrada con el mismo buffer. Luego de eluir la columna con el mismo buffer, el polisacárido se recupera inmediatamente luego de eluído el volumen muerto, se dializa contra agua destilada y liofiliza. El producto obtenido se ensaya como antes, empleando un reactivo de látex específico, análisis de azúcares y proteínas, y ^{1}H- y ^{13}C-NMR. El producto obtenido presenta una pureza del 95-97 %, dando un producto adecuado para su empleo en inmunización y en la preparación de conjugados polisacárido-proteína.

Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias al apoyo del International Program for the Chemical Sciences (Uppsala, Suecia), la Organización Panamericana de la Salud y PEDECIBA (Uruguay).