

# Caracterización físico-química del polisacárido Vi de *Salmonella typhi*

Ileana Martínez<sup>1</sup>, Yanín Muñoz<sup>1</sup>, Luis Riverón<sup>1</sup>, Milagros Duarte<sup>2</sup>, Christopher Jones<sup>3</sup>, Xavier Lemercinier<sup>3</sup>, Lilian Nápoles<sup>1</sup>, Xenia Muñoz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Instituto Cubano de Investigaciones Nacionales del Azúcar (ICINAZ). Ciudad de La Habana, Cuba

<sup>3</sup> National Institute for Biological Standards and Control (UK).

En este trabajo de caracterización del polisacárido Vi de *Salmonella typhi* se proporcionan algunas herramientas para la determinación de propiedades estructurales que permitan reforzar los estudios de estabilidad (viscosidad, rotación óptica, espectros de resonancia magnético nuclear), de identidad y pureza. Los resultados sugieren que es un producto apirogénico viscoso, con alto contenido de humedad, con alto grado de sustitución de los grupos O-acetilo, con actividad óptica y estructura similar a la de los polisacáridos de referencia internacionales, determinada por resonancia magnético nuclear.

**Palabras claves:** Polisacárido Vi, *Salmonella typhi*, caracterización.

## Introducción

La incidencia mundial anual de la fiebre tifoidea excede los 12,5 millones de casos, muchas veces con una alta mortalidad. El agente causal de esta enfermedad es *Salmonella typhi*, bacteria gramnegativa encapsulada. La infección produce fiebre, hemorragia gastrointestinal, toxemia sistémica y otras implicaciones (1).

Uno de los factores de virulencia más conocidos es el antígeno de superficie Vi (polisacárido capsular Vi), el cual es de gran interés por su empleo potencial en vacunas (1). Está constituido por la unidad repetitiva del ácido (1→4) N-acetil  $\alpha$ -D galactosaminurónico, de manera que se presenta como un homopolímero lineal O-acetilado en la posición del carbono 3 (2).

Se conoce que los grupos O-acetilo de este polisacárido suelen ser dominantes en la respuesta inmune (3); su peso molecular es también importante en la inmunogenicidad y la actividad protectora contra la infección por *Salmonella typhi* (4).

Resultan pocos los métodos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el control del polisacárido Vi vacunal, por lo que continúa la búsqueda incesante y la incorporación de nuevas técnicas que enriquezcan el conocimiento en la caracterización de esta biomolécula. Estos métodos deben ser reproducibles, específicos y sensibles ante cambios estructurales y en muchos casos, deben servir como complemento de los que ya existen para el estudio de la estabilidad del producto.

El objetivo de este trabajo es caracterizar el polisacárido Vi de *Salmonella typhi*, producido en el Instituto Finlay, desde el punto de vista físico-químico, mediante el uso de técnicas como la cromatografía en gel, viscosidad, rotación óptica específica, resonancia magnético nuclear (RMN) y

electroforesis en geles de poliacrilamida (esta última para la determinación cualitativa de lipopolisacárido).

## Materiales y Métodos

**Muestras.** Se emplearon 4 lotes de polisacárido Vi purificado, obtenidos a partir de una cepa de *Salmonella typhi*, cuya fórmula antigénica es 9,12[Vi]:d y conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Instituto Finlay, Cuba). Previo a la caracterización, los lotes 7003, 7004, 7005 fueron evaluados por el Laboratorio de Control de Proceso, según los requisitos recomendados por la OMS (2). Las muestras fueron secadas a vacío sobre  $\text{CaCl}_2$ , a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 24 h y resuspendidas en agua destilada o en el solvente específico para la evaluación.

## Métodos

**Contenido de humedad.** La evaluación se realizó a través del análisis termogravimétrico a  $100^{\circ}\text{C}$  y por secado a vacío con la modificación del empleo de  $\text{CaCl}_2$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  (2).

**Determinación del contenido de grupos O-acetilo.** Se utilizaron soluciones de referencia de cloruro de acetilcolina con un rango de concentraciones de 1,66 a 8,3  $\mu\text{mol}$  de O-acetilo/mL. Se evaluó 1 mL de cada una de las muestras con cantidades de 1,28 a 1,74 mg de peso seco/mL de agua destilada y se procedió según lo recomendado por Hestrin (5).

**Cromatografía en gel.** Se realizó según lo recomendado por la OMS (2) y por Tiesjema y col. en 1977 (6). Se empleó una columna de 1,6 x 100 cm de Sepharosa 4B equilibrada con Tris-HCl 0,01 mol/L, NaCl 0,2 mol/L pH 7,4 y un sistema cromatográfico de baja presión (Pharmacia-Biotech, Suecia). Se aplicaron muestras de 1,28 a 1,74 mg de peso seco/mL, disueltas en agua destilada y se determinaron los parámetros de volumen muerto ( $V_0$ , azul dextrana), volumen total ( $V_t$ , acetona), volumen de elución de las muestras ( $V_e$ ) y la constante de distribución cromatográfica ( $K_d$ ). Se determinó

también la cantidad de polisacárido que eluía con un Kd menor o igual que 0,25 (2).

**Determinación de la viscosidad.** Se evaluó el tiempo que demora una solución de polisacárido en agua destilada, en recorrer una distancia en el capilar de un viscosímetro UBBELOHDE (Alemania). Las muestras se disolvieron en agua destilada hasta concentraciones de 0,1 a 0,14 mg de peso seco/ mL, en un volumen de 25 mL. Se determinó la viscosidad reducida (Nred) expresada en mL.mg<sup>-1</sup>, a 25 °C (7).

**Rotación óptica específica.** Se determinó el parámetro rotación óptica ( $\alpha^0$ ) a 589 nm, con lámpara de halógeno y filtro para sodio (8) en un polarímetro Sucromat (Alemania). Las muestras de polisacárido se resuspendieron en agua destilada (1 a 3 mg por peso seco/mL) y se utilizó una cubeta de 0,5 dm con 5 mL de estas soluciones a 22 °C.

**Resonancia magnético nuclear.** Los espectros fueron obtenidos en un espectrómetro Varian Unity 500 NMR equipado con una sonda de triple resonancia y un gradiente de pulso de campo accesorio, a una temperatura de prueba de 50 °C. Se disolvieron 1 a 3 mg de las muestras húmedas y secadas a vacío sobre CaCl<sub>2</sub>, en 0,7 mL de agua deuterada (Apollo Scientific, Ltd., UK, >99,92% de deuterio). Estas muestras también se liofilizaron dos veces en agua deuterada para eliminar residuos de etanol y fenol. Ambos tipos de muestras fueron sometidas a experimentos TOCSY con tiempos de mezcla de 25 y 45 mseg. El material fue tratado además con NaOH 0,5 M durante 5 min, para la determinación del contenido de grupos O-acetilo (9).

**Electroforesis en geles de poli(acrilamida) para la detección de lipopolisacáridos (LPS).** El procedimiento se realizó según lo recomendado por Tsai y Frasch (10). Se utilizó un gel separador de 15% de acrilamida y un gel concentrador de 5% de acrilamida. Se empleó un sistema de tinción por reducción con 0,7% de peryodato de sodio en etanol 40%- ácido acético 5%, reacción con 20% de nitrato de plata en NaOH 0,018 N y NH<sub>4</sub>OH y el posterior revelado con formaldehído 37%, diluido 1/2000 y ácido cítrico 0,05 mg/mL. Se incluyó en las muestras un lote de polisacárido purificado (lote 7002)

obtenido en etapas iniciales de investigación que no cumplió con los requisitos de la prueba en conejos para la determinación de la pirogenicidad. Los geles se evaluaron en un densitómetro (LKB, Suecia) para la determinación aproximada del peso molecular de las bandas, referido a un patrón de proteínas (BioRad).

## Resultados y Discusión

La selección de un método colorimétrico para la evaluación del contenido de polisacárido Vi de *Salmonella typhi* resulta un tanto difícil, por cuanto la presencia de residuos de ácidos urónicos en su estructura limita el empleo de agentes hidrolíticos que garanticen la formación y estabilidad de derivados de fácil cuantificación. De ahí que se requiera la determinación del contenido de humedad y del peso seco de la materia prima como referencia para el resto de las evaluaciones. El polisacárido Vi purificado presenta un alto contenido de humedad, como se puede observar en la Tabla 1 (92% a 94%) que se elimina a través del secado a vacío sobre CaCl<sub>2</sub>, durante 24 h a 4 °C, para su posterior resuspensión en agua destilada o en el solvente en cuestión

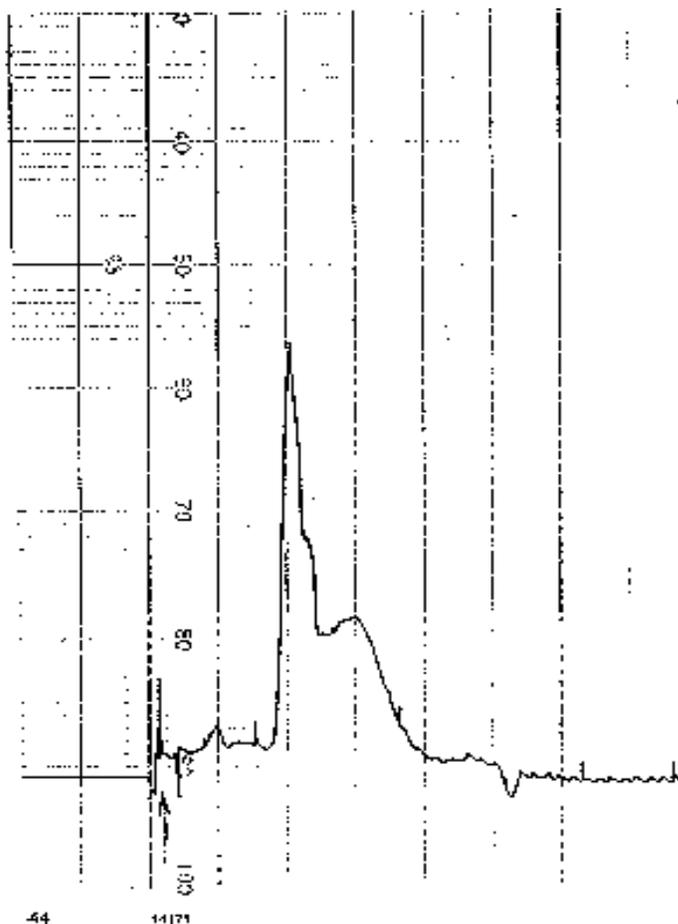
La Tabla 1 muestra también los resultados obtenidos de la evaluación del contenido de grupos O-acetilo por el método colorimétrico, que sugieren un alto grado de sustitución (3,12 a 3,39 mmol/g de peso seco) (Tabla 1), lo cual se corrobora posteriormente con la determinación de este parámetro por RMN.

Por otra parte, la determinación de la integridad molecular cromatográfica permite sugerir la presencia de dos distribuciones de diferentes tamaños moleculares: una mayoritaria de mayor peso molecular y otra minoritaria de menor peso molecular (Tabla 1 y Figura 1), con cantidades de polisacárido superiores al 75% con Kd menores o iguales que 0,25. La manifestación de estas distribuciones es muy frecuente en los polisacáridos (6), así como la presencia de problemas difusionales en matrices de este tipo, dadas por la viscosidad de estas soluciones (11).

**Tabla 1.** Resumen de los parámetros utilizados para la caracterización físico-química del polisacárido Vi de *Salmonella typhi*

Lote	Humedad Residual (%)	Contenido O-acetilos (mmol/g)	Cantidad Polisac. Kd ≤ 0,25 (%)	Viscosidad (mL.mg <sup>-1</sup> )	Rotación óptica específica (° .cm <sup>-2</sup> .g <sup>-1</sup> )
7003	92,9	3,33	79,4	2,06	+ 19,51
7004	91,7	3,18	77,9	1,44	+23,64
7005	93,7	3,12	83,4	1,68	+22,32

**Figura 1.** Cromatograma del polisacárido Vi de *Salmonella typhi* en Sepharosa 4B (Lote 7003)



funcionales importantes en la inmunodominancia (9). La caracterización realizada por este método en los tres lotes de polisacárido Vi indica la presencia de estructuras similares a los polisacáridos de referencia presentes en el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Reino Unido) (Figura 2). En la Figura 3 se muestra el espectro protónico del polisacárido Vi O-desacetilado cuando es tratado con NaOH 0,5 N, lo que permitió la cuantificación del grado de sustitución de los grupos O-acetilo. Los resultados obtenidos en los lotes 7003, 7004 y 7005 corroboran el alto contenido de grupos O-acetilos mayor de 95% y ausencia de señales correspondientes a fragmentos de LPS contaminantes, con cantidades suficientes que pudieran ser detectadas por este método.

Otra posibilidad del método analizado es la detección de la presencia de residuos de etanol (3,4 a 3,6 ppm) y de fenol (6,9 a 7,4 ppm) a través de los espectros TOCSY (bidimensionales), cuando las muestras no son secadas a vacío o si no se intercambian dos veces en agua deuterada por liofilización.

Como resultado del análisis de estos lotes por electroforesis en geles de poliácridamida con tinción específica para LPS, se presentan bandas electroforéticas con migraciones entre 45 y 54 kDa (si se refiere a un patrón proteico de peso molecular) y un contenido considerablemente menor de lipopolisacárido que el detectado en el lote 7002, el cual resultó pirogénico y no cumplía con los Requisitos del Control de la Calidad (Figura 4). De esta forma podría sugerirse continuar la evaluación de este método para la caracterización cualitativa y cuantitativa de lipopolisacárido.

En resumen, la introducción, desarrollo y validación de estos métodos en el control de la calidad del polisacárido Vi, el establecimiento de los materiales de referencia y estudio de su correlación con métodos de evaluación de su actividad biológica, podrían enriquecer el conocimiento para su posible empleo como antígeno vacunal.

El parámetro viscosidad puede constituir una magnitud de la despolimerización de la molécula de polisacárido Vi. Algunos autores han demostrado esta relación a través de la irradiación ultrasónica como alternativa para la disminución de sus propiedades viscosas en el análisis espectroscópico por RMN (12). En la Tabla 1 se muestran los valores de viscosidad reducida de los diferentes lotes de materia prima con un intervalo de confianza de  $1,65 \pm 0,289 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

Las transiciones "orden-desorden" en las estructuras polisacáridicas son muy rápidas y pueden ser determinadas a través de parámetros susceptibles a estos cambios, como la viscosidad y la rotación óptica específica (8). De ahí que sea importante incluir las propiedades ópticas en la caracterización, si se tiene en cuenta el uso que pueden tener en la evaluación de la estabilidad estructural de la molécula. Los resultados indican propiedades dextrorrotatorias dadas por la desviación del plano de la luz polarizada producida por los residuos derivados de ácido  $\alpha$ -D galactosaminurónico (Tabla 1), comportamiento que puede verse afectado si se incuban las muestras a diferentes temperaturas (25 a 50 °C) con la pérdida de un 56,3% de los valores iniciales de actividad óptica.

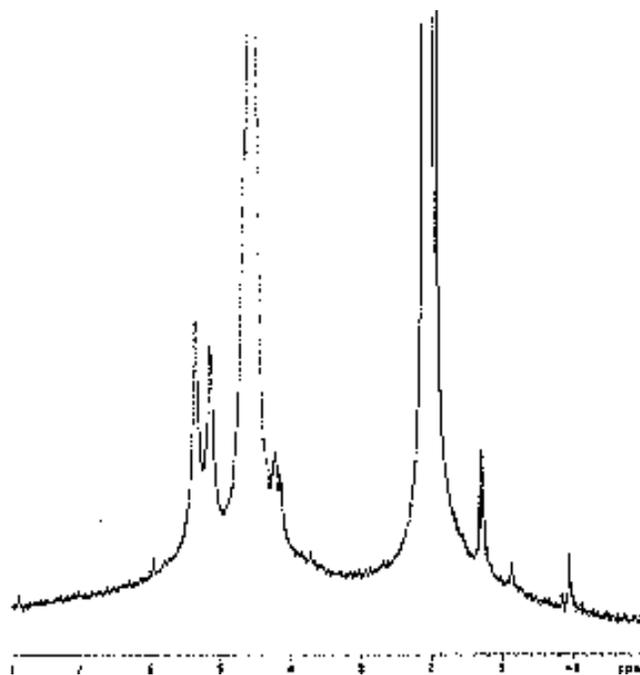
Indudablemente que los espectros obtenidos por resonancia magnético nuclear en los polisacáridos han permitido la determinación de sus estructuras primarias, pureza e incluso, han constituido un indicador de la estabilidad de grupos

**Figura 2.** Espectros protónicos de resonancia magnético nuclear (250 MHz) del polisacárido de *Salmonella typhi*.

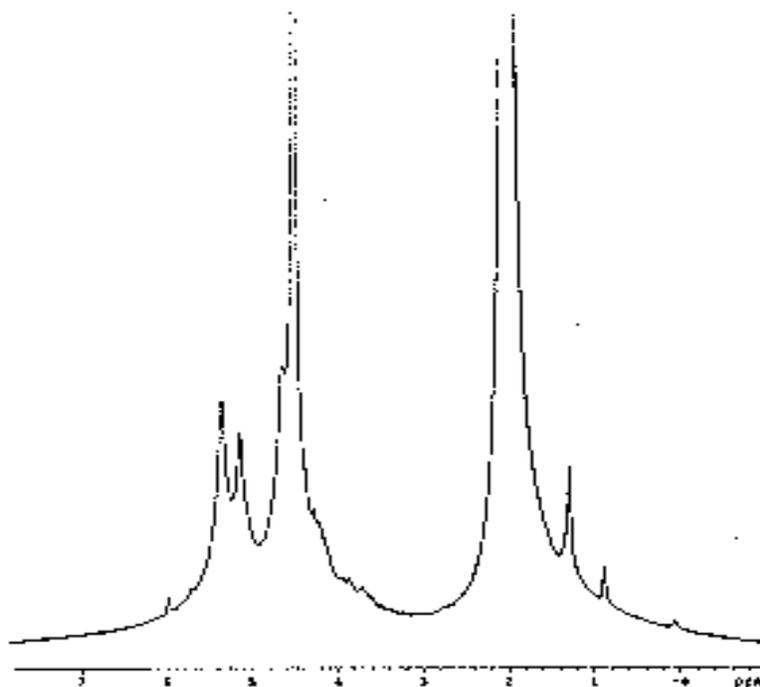
A. Polisacárido de referencia

B. Polisacárido lote 7004

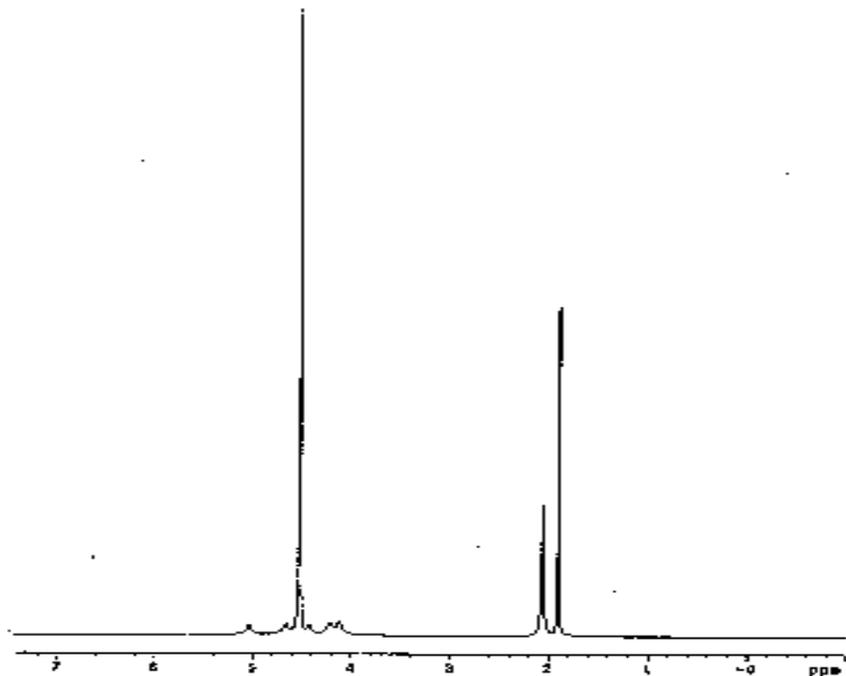
**A**



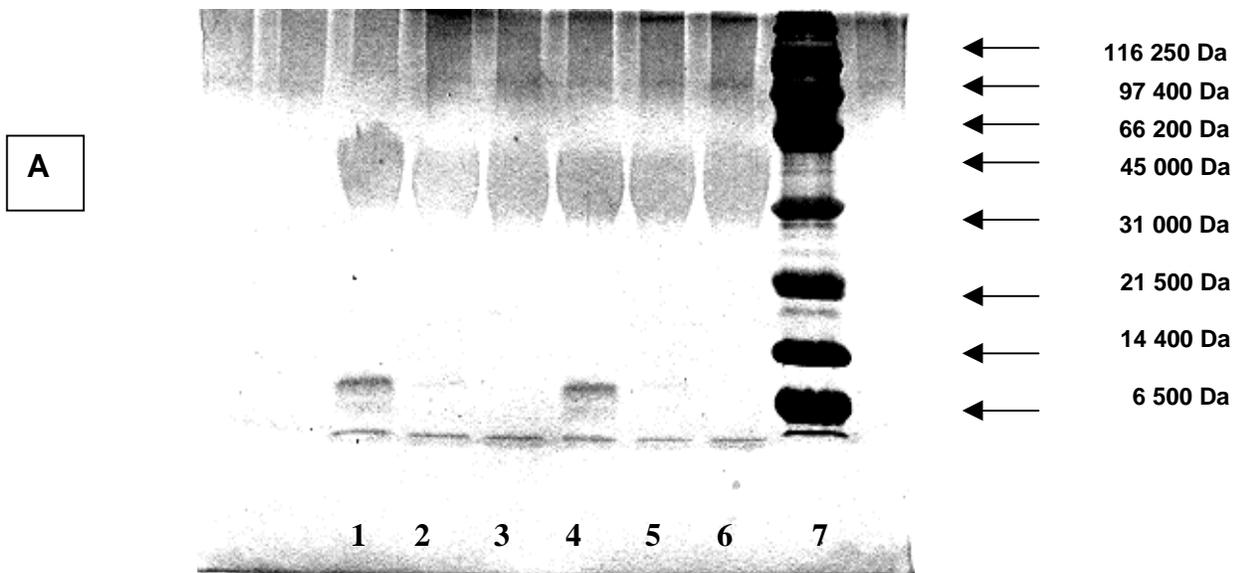
**B**

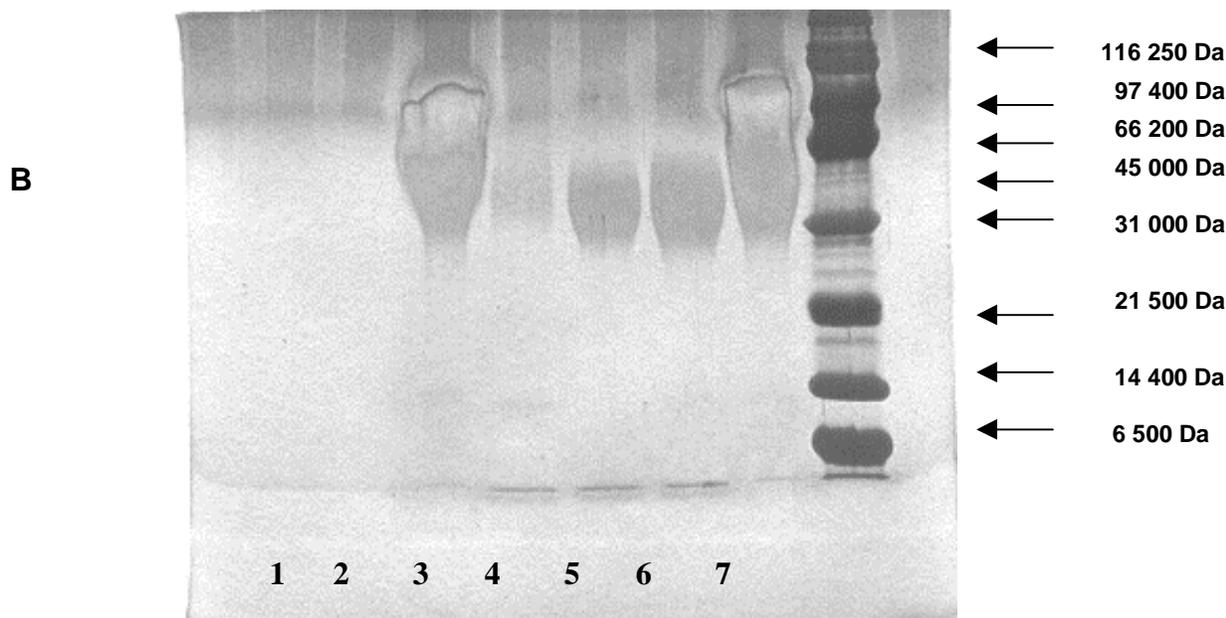


**Figura 3.** Espectros protónicos de resonancia magnético nuclear (250 MHz) del polisacárido de *Salmonella typhi* tratado con NaOH 0,5 N (Lote 7004)



**Figura 4.** Electroforesis en geles de poliacrilamida de muestras de polisacárido Vi de *Salmonella typhi* para la detección de lipopolisacárido





**A: Muestras secadas**  
 1 y 4. Lote 7003,  
 2 y 5. Lote 7004,  
 3 y 6. Lote 7005,  
 7. Patrón de PM

**B: Muestras sin secar**  
 1 y 4. Lote 7002,  
 2. Lote 7003,  
 3. Lote 7004,  
 5. Patrón de PM

## Conclusiones

- El polisacárido Vi purificado con un alto contenido de humedad (92% a 94%) presenta un alto grado de sustitución de los grupos O-acetilo (3,12 a 3,39 mmol/g de peso seco), lo que equivale a más de un 95% de los residuos sustituidos del ácido (1→4) N-acetil α-D galactosaminurónico y presencia de estructuras

determinadas por RMN, similares a los polisacáridos de referencia internacionales.

- Presenta características viscosas y actividad óptica que puede afectarse con el incremento de la temperatura.
- La presencia de trazas de lipopolisacárido (como contaminante) detectadas por electroforesis no afecta sus propiedades apirogénicas.

## Referencias

- Jennings HJ. Polysaccharide vaccines against disease caused by *Haemophilus influenzae*, group B *Streptococcus* and *Salmonella typhi*. *Carboh in Europe*. 1998; 21:17-23.
- WHO. Requirements for Vi polysaccharide typhoid vaccine (Requirements for Biological Substances No. 48). *WHO Tech Rep Series* 1994; 840:14-33.
- Szu SC, Bystricky S, Hinojosa-Ahumada M, Egan W, Robbins JB. Synthesis and some immunological properties of an O-acetylpectin [poly (1-4)-α-D-GalpA]-protein conjugate as a vaccine for typhoid fever. *Infect Immun*. 1994;62:5545-5549.
- Szu SC, Zon G, Schneerson R, Robbins JB. Ultrasonic irradiation of bacterial polysaccharides. Characterization of the polymerized products and some applications of the process. *Carboh Res*. 1986;152:7-20.
- Hestrin S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytic applications. *J Biol Chem*. 1949;180:249-261.

6. Tiesjema RH, Beuvery EC, Pas BJ. Enhanced stability of meningococcal polysaccharide vaccines by using lactose as a menstruum for liophylisation. *Bull WHO*. 1977;55:43-48.
7. Swenson HA. Intrinsic viscosity and its conversion to molecular weight. *Methods in Carb Chem*. 1963;III:84-91.
8. Dea ICM. Polysaccharide conformation in solutions and gels. *Food Carboh*. 1982;3(3):420-457.
9. Lemercinier X, Jones C. Full <sup>1</sup>H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. *Carboh Res*. 1996; 296:83-96.
10. Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1982;119:115-119.
11. Dubin PL, Edwards SL, Kaplan JI, Metha MS, Tomalia D, Xia J. Carboxylated Starburst Dendrimers as Calibration Standards for Aqueous Size Exclusion Chromatography. *Anal Chem*. 1986;152:7-20.

## Physico-chemical Characterization of *Salmonella typhi* Vi polysaccharide

### Abstract

In the characterization of *Salmonella typhi* Vi polysaccharide, presented in this paper, some tools for the determination of the structural properties that could strengthen the stability studies (viscosity, optical rotation, nuclear magnetic resonance), identity and purity are discussed. The results suggest that it is a pyrogen-free, viscous product, with a high humidity content, a high degree of O-acetyl group substitution, with optical activity and structure similar to those of international standard polysaccharides, as determined by nuclear magnetic resonance.

**Keywords:** Vi polysaccharide, *Salmonella typhi*, characterization