

Caracterización del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 18C mediante la combinación de métodos cromatográficos y RMN ^1H

Alain Puyada-Pérez, Anaís Fernández-Villalobo, Lauro Nuevas-Paz, José Alberto Cremata-Álvarez**†, Raine Garrido-Arteaga, Jessy Pedroso-Fernández, Felix Cardoso-San Jorge, Yury Valdés-Balbin, Violeta Fernández-Santana‡ y Vicente Vérez-Bencomo.**

Centro de Química Biomolecular, Código Postal 16042, Avenida 200 y Calle 21, Reparto Atabey, Playa, La Habana, Cuba. *Centro Nacional de Genética Médica, Código Postal 11400, Avenida 31 Esquina a calle 146, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba. ***Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Código Postal 6162, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba. alain@imre.oc.uh.cu

Recibido: 3 de septiembre de 2012

Aceptado: 10 de diciembre de 2012

Dedicado a la memoria de los doctores José Alberto Cremata Álvarez y Violeta Fernández Santana.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*, polisacárido capsular serotipo 18C, métodos cromatográficos, RMN, caracterización.
Key words: *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide serotype 18C, NMR, chromatographic methods, characterization.

RESUMEN: *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) es una bacteria encapsulada y el principal agente causal de enfermedades invasivas como neumonía, meningitis y otitis media aguda. La mayor incidencia de las enfermedades neumocócicas tiene lugar en niños menores de cinco años, por la inmadurez de su sistema inmune, lo que le impide responder ante antígenos polisacáridicos. De los tres agentes bacterianos de mayor incidencia en la población infantil, el único que en Cuba no está cubierto por una vacuna es el *S. pneumoniae*. Por tal motivo, en el Centro de Química Biomolecular (CQB), en colaboración con el Instituto Finlay, se lleva a cabo el desarrollo de una vacuna conjugada multivalente con polisacáridos de *S. pneumoniae*, serotipos 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F, a proteínas portadoras: toxoide tetánico o diftérico. Se necesita la combinación de diferentes métodos analíticos para evaluar los polisacáridos capsulares debido a su complejidad estructural. En el presente trabajo se realizó la caracterización de *S. pneumoniae*, serotipo 18C, mediante la combinación de la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN ^1H) con diferentes métodos cromatográficos. La identidad del polisacárido se comprobó por RMN ^1H . La determinación de la relación molar de los monosacáridos se realizó mediante cromatografía gas-líquido (CGL) y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP/HPLC). Su composición estequiométrica correspondió con la reportada en un trabajo previo. La distribución del peso molecular se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular (HPSEC). La metodología propuesta puede extenderse al resto de los serotipos que componen la vacuna.

ABSTRACT: *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) is an encapsulated bacterium that can cause pneumonia, meningitis, and acute otitis media. The major incidence of the pneumococcal diseases occurs in children below five years old due to their immature immune system that do not respond adequately to polysaccharide antigens. Among the major incidence bacterial agents in Cuban infant population, *S. pneumoniae* is the only one that is not covered by a vaccine. For that reason, a project between the Center of Biomolecular Chemistry (CQB) and Finlay Institute for the production of a conjugate multivalent vaccine candidate is carried out and includes the serotypes: 1, 5, 6B, 14, 18C,

19F, and 23F of *S. pneumoniae*, coupled to carrier proteins such as tetanus or diphtheria toxoids. It is necessary to use a combination of different analytical methods to evaluate capsular polysaccharides. In this work a characterization of the serotype 18C of *S. pneumoniae* was done by the combination of Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) spectroscopy and chromatographic methods. The polysaccharide identity was confirmed by ^1H NMR. The stoichiometric monosaccharide composition was carried out by gas-liquid chromatography (GLC) and reversed phase high resolution liquid chromatography (RP/HPLC) and matched to a previous report. The molecular weight distribution of the polysaccharide was determined by high performance size exclusion chromatography (HPSEC). The proposed methodology could be extended to the rest of the included serotypes in the vaccine.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*),¹ conocido también como neumococo, constituye uno de los principales agentes etiológicos de la neumonía, la meningitis bacteriana, la otitis media y la sepsis. Estas enfermedades, a pesar de que son prevenibles con vacunas, causan anualmente la muerte de más de un millón de niños menores de cinco años.^{2,3} En la actualidad, la incidencia de la meningitis causada por *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* tipo b, ha disminuido como resultado de la introducción de vacunas; mientras se aprecia un aumento de meningitis y septicemia provocada por *S. pneumoniae*.^{3,4}

De los más de 90 serotipos de *S. pneumoniae* que se conocen, aproximadamente 30 son responsables de la mayoría de las enfermedades neumocócicas a nivel mundial.^{5,6} En Cuba, *S. pneumoniae* es uno de los agentes bacterianos invasivos de mayor incidencia en la salud del niño pequeño y del adulto mayor. El serotipo 18C ocupa el primer lugar en incidencia, en los grupos más vulnerables del país. Por eso, se ha incluido en una vacuna heptavalente contra neumococo que incluye los serotipos 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F conjugados a toxoide tetánico o diftérico, la cual se desarrolla actualmente en Cuba en el marco de un proyecto de investigación-desarrollo, liderado por el CQB y el Instituto Finlay.⁷

El polisacárido capsular serotipo 18C es uno de los polisacáridos más complejos de *S. pneumoniae* debido a que posee una unidad repetitiva no lineal constituida por cinco monosacáridos enlazados de diferentes formas y un residuo O-acetilado cuya posición se desconoce (Fig.1)¹

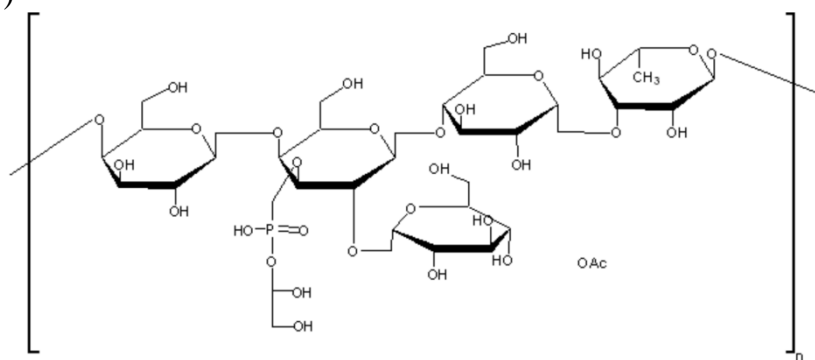


Fig. 1. Estructura de la UR del PsC 18C de *S. pneumoniae*.

Por esta razón, se hace necesario disponer de métodos analíticos que permitan caracterizar y evaluar la identidad de los polisacáridos capsulares de los serotipos seleccionados para integrar el candidato vacunal propuesto.

A partir de este principio, el objetivo de este trabajo fue presentar la combinación de las técnicas cromatográficas y la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN ^1H) para la caracterización del serotipo 18C del *S. pneumoniae*. El empleo de esta combinación de técnicas pudiera ser introducido en el sistema de control de calidad del resto de los serotipos que se incluyen en el preparado vacunal en desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos empleados en este trabajo fueron de calidad puros para análisis y procedentes de Merck (Alemania). Tanto los disolventes como los gases utilizados en las separaciones cromatográficas fueron de calidad para cromatografía. El agua empleada fue de calidad ultrapura (Milli-Q). Las muestras de *S. pneumoniae* serotipo 18C (PsC 18C) fueron suministradas por el Instituto Finlay (La Habana, Cuba). Para el estudio de identidad del PsC 18C por RMN se adquirió el espectro de protones de una muestra de PsC 18C purificado de la American Type Culture Collection (ATCC).

Identidad del PsC 18C por Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN ^1H)

Se empleó una muestra de PsC 18C previamente hidrolizado y des-O-acetilado para su análisis por RMN ^1H . Se tomaron 10 mg de la muestra, se disolvieron en 600 μL de agua deuterada (D_2O), se liofilizaron y se redisolviaron en otros 600 μL de D_2O con la sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-2,2,3,3-tetraduteropropiónico (TSP- d_4) como referencia interna. La muestra se trasvasó a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro interno.⁸ Adicionalmente, para el experimento de RMN cuantitativo de protones se realizó una des-O-acetilación *in situ* adicionando 15 μL de hidróxido de sodio deuterado (NaOD) al 40 %. El espectro de RMN ^1H se obtuvo en un espectrómetro Bruker/Avance DPX-250 (Alemania) a una frecuencia de 250,13 MHz con una sonda de 5 mm de cuatro núcleos (H, C, P y F), 16 barridos, a 52 °C, con presaturación de la señal del residuo de agua no deuterada (HDO). El espectro de RMN ^1H se obtuvo procesando la caída de inducción libre (FID, siglas en inglés) con una transformación de Fourier modulada por una función de doble exponencial (Line Broadening (LB) = 0,20 Hz; Gaussian Factor (GF) = 0,20 Hz).⁹ La señal singlete del TSP- d_4 se referenció a δ 0 ppm. El espectro cuantitativo de RMN ^1H (qHNMR, siglas en inglés), se obtuvo con un pulso de 90°, un tiempo para la relajación espín-red de 25 s, 32 barridos, desacoplamiento de ^{13}C mediante la técnica *Globally Optimized Alternating Phase Rectangular Pulse* (GARP), sin agitación y a la temperatura de 52 °C. El espectro de qHNMR se obtuvo procesando la FID con una transformación de Fourier modulada por una función exponencial (LB = 0,3 Hz).⁹ La señal singlete del TSP- d_4 se referenció a δ 0 ppm. La adquisición y el procesamiento de los datos se realizaron utilizando el paquete de programas *TopSpin*, versión 1.3.

Determinación de la relación estequiométrica de los monosacáridos en la unidad repetitiva del PsC 18C por CGL y por RP/HPLC con detección de fluorescencia

Hidrólisis del PsC 18C

De la muestra de PsC 18C previamente cuantificada por el método de orcinol/sulfúrico,¹⁰ se tomó una alícuota equivalente a 1 mg de polisacárido, se le añadieron 200 μL de ácido fluorhídrico al 40 % y se incubó a 65 °C durante dos horas. La muestra se evaporó a sequedad a 40 °C bajo corriente de N_2 . Se le añadieron 200 μL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 N y se incubó a 100 °C durante dos horas. La muestra así hidrolizada, se liofilizó durante cuatro horas.^{11,12}

Análisis por CGL del PsC 18C como derivado de trimetilsil

La determinación de los derivados de trimetilsil (TMS) se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies System (USA) 7890 A, equipado con un inyector *split-splitless* y un detector de ionización por llama.¹³ La relación de *split* fue de 2 : 1. Como gas portador se utilizó hidrógeno y como mezcla combustible del detector, hidrógeno y aire. El flujo empleado fue 1 mL/min. La temperatura del inyector y el detector se estableció a 280 °C. El programa de temperatura empleado fue: incremento lineal de 140 a 250 °C a 12 °C/min y se mantuvo a 250 °C por tres minutos. La separación tuvo lugar en una columna capilar HP-5 (30 m x 0,32 mm y

0,25 μm de espesor de la fase estacionaria).¹⁴ Los datos primarios se adquirieron y procesaron con el sistema de adquisición *Chem32*, propio del equipo.

Preparación de los patrones de glucosa, galactosa y ramnosa para el análisis por CGL

Se prepararon por separado tres disoluciones patrones de glucosa (Glc), galactosa (Gal) y ramnosa (Rha), 5 mg/mL, en piridina seca con inositol (patrón interno) 0,01 mg/ μL . Los monosacáridos patrones se mezclaron a concentraciones crecientes en cantidades equivalentes teniendo en cuenta la estructura del serotipo 18C (Tabla 1).

Se les añadieron alícuotas iguales de la disolución de inositol. A las mezclas de monosacáridos patrones así preparados, se les añadieron 200 μL de piridina (Py) seca y se evaporaron a sequedad bajo corriente de N_2 a 60 °C. Se les adicionaron 200 μL de Py, 100 μL de hexametildisilazano (HMDS) y 50 μL de trimetilclorosilano (TMCS), se incubaron a 80 °C durante 30 min. Se centrifugaron a 9000 r/min durante 3 min y se les adicionaron 200 μL de Py seca. En el cromatógrafo se inyectó 1 μL del sobrenadante.^{13,15}

Tabla 1. Concentraciones de los monosacáridos en la curva de calibración para el análisis por CGL como derivados TMS.

Mezcla	C (ppm)		
	Glc	Gal	Rha
1	545,45	181,82	181,82
2	818,18	272,73	272,73
3	1045,45	373,74	373,74
4	1272,73	454,55	454,55

Preparación de la muestra hidrolizada del PsC 18C para el análisis por CGL

Al producto de hidrólisis del PsC 18C, descrito con anterioridad, se le añadieron 200 μL de Py seca y se evaporó a sequedad bajo corriente de N_2 a 60 °C. Se le adicionaron 200 μL de Py seca, 100 μL de HMDS y 50 μL de TMCS, se incubó durante 30 min a 80 °C. Se centrifugó a 9000 r/min durante tres minutos. En el cromatógrafo se inyectó 1 μL del sobrenadante.¹³

Análisis del PsC 18C por RP/HPLC con detección de fluorescencia

El análisis se realizó en un sistema cromatográfico LaChrom (Merck–Hitachi, Alemania), constituido por una bomba cuaternaria L–7100, un detector de fluorescencia L–7480, un horno para columnas 655 A–52 y un degasificador en línea. La separación cromatográfica se realizó en una columna TSK ODS–120T (300 x 7,8 mm), con tamaño de partículas de 10 μm , a una temperatura de 30 °C. Se empleó un flujo de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 μL . Se situó la longitud de onda de excitación en 330 nm y la de emisión en 420 nm para monitorear los monosacáridos.^{16,17} Como fases móviles se emplearon: A) ácido trifluoroacético (TFA) 5 mmol/L–acetonitrilo, 75 : 25 (v/v) y B) TFA 5 mmol/L. Se empleó un gradiente lineal de 0 a 60 min con un incremento de 0 a 15 % de A. La adquisición y procesamiento de los datos cromatográficos se realizaron con el programa *ClarityChrom*, versión 2.6.3.313.^{18,19}

Preparación de las disoluciones patrones de Glc, Gal y Rha para el análisis por RP/HPLC con detención por fluorescencia

A partir de disoluciones separadas de Glc, Gal y Rha (5 mg/mL) en dimetilsulfóxido (DMSO)/ácido acético (7 : 3, v/v), se tomaron por separado alícuotas de cada monosacárido y se les añadieron 80 μL de 2–aminobenzamida (2-AB) 0,14 mg/ μL y 160 μL de cianoborohidruro de tetrabutil amonio (TBACNBH₃) 0,408 mg/ μL , disueltos en una mezcla DMSO/ácido acético

(7 : 3, v/v); se dejó reaccionar a 60 °C por cuatro horas. Se adicionaron 200 µL de agua ultrapura y se realizaron cinco extracciones sucesivas con 500 µL de acetato de etilo.^{16,17} Las disoluciones de los patrones se liofilizaron y se reconstituyeron en el volumen adecuado de agua para obtener la concentración de 0,4 µg/µL (C), a partir de la cual se prepararon las disoluciones a las concentraciones de los puntos de la curva de calibración. Cada punto de la curva representa una mezcla de Glc, Gal y Rha en la proporción (1 : 1 : 1) de diferentes concentraciones (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de los monosacáridos en la curva de calibración para el análisis por RP/HPLC con detención de fluorescencia.

Punto	C (µg/µL)		
	Glu	Gal	Rha
C_4	0,1030	0,1032	0,1022
C_3	0,0687	0,0688	0,0681
C_2	0,0343	0,0344	0,0341
C_1	0,0172	0,0172	0,0170

Derivatización con 2-AB del PsC 18C hidrolizado

La muestra hidrolizada y liofilizada se disolvió en una mezcla DMSO/ácido acético (7 : 3, v/v), se le añadieron 20 µL de 2-AB y 40 µL de TBACNBH₃ previamente disueltos en mezcla dimetilsulfóxido-ácido acético (7 : 3, v/v). Se incubó durante 4 h a 60 °C. A la muestra se le adicionaron 200 µL de agua y se les realizaron cinco extracciones sucesivas con 500 µL acetato de etilo. La muestra se liofilizó y se reconstituyó en el volumen necesario para su análisis. Se inyectaron 10 µL en el sistema cromatográfico.^{16,17}

Determinación de la constante de distribución de talla molecular del PsC 18C

La determinación de la constante de distribución (K_D) como medida de la talla molecular se realizó por HPSEC,^{20,21} en el sistema cromatográfico *Smartline* (KNAUER, Alemania) constituido por una bomba cuaternaria, S-1000, un detector de índice de refracción, S-2300, una cámara de mezclado dinámico con desgasificador en línea de cuatro canales, Smartline Manager 5000. Se utilizó una columna TOSOH BIOSCIENCE, TSK G 5000 PW (300 x 7,5 mm), con un tamaño de partícula de 13 µm e intervalo de separación de 21 a 879 kDa y como fase móvil NaCl 0,9 %. Se empleó un flujo de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 µL. La muestra se inyectó en el sistema de HPLC a una concentración aproximada entre 3 y 5 mg/mL. La adquisición de los datos se realizó con el programa *ClarityChrom*, versión 2.4.4.80. El cálculo de K_D se realizó mediante la ecuación siguiente:

$$K_D = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0}$$

donde:

V_R volumen de retención de la columna.

V_t volumen de permeación total de la columna.

V_0 volumen de exclusión total.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identidad del PsC 18C por RMN¹H

Se analizó la región de los protones anoméricos y la zona de señales correspondientes a protones en las posiciones desoxi, localizadas entre δ 5,50-4,60 ppm y δ 1,50-1,00 ppm, respectivamente. A δ 1,34 ppm se observa un doblete, de constante de acoplamiento $^3J_{(5,6)}$ 4,39 Hz, correspondiente a los protones del metilo en posición 6 del residuo de ramnosa (F) (Fig. 2a). Los protones anoméricos de los residuos monosacáridicos (Fig. 2a) aparecen a: δ α -D-Glc(1-, 5,39 ppm (d, 1 H, $^3J_{(1,2)}$ 1,8 Hz; H-1) A; δ 4-) α -D-Glc(1-, 5,12 ppm (d, 1 H, $^3J_{(1,2)}$ 2,4 Hz; H-1) B; δ 3-) β -L-Rha(1-, 4,87 ppm (d, 1 H, $^3J_{(1,2)}$ 0,8 Hz; H-1) C; δ 4-) β -D-Glc(1-, 4,79 ppm (d, 1 H, $^3J_{(1,2)}$ 7,6 Hz; H-1) D; δ 4-) β -D-Gal(1-, 4,70 ppm (d, 1 H, $^3J_{(1,2)}$ 7,2 Hz; H-1) E. Los corrimientos químicos obtenidos experimentalmente para los protones anoméricos y el análisis de las constantes de acoplamiento escalar homonuclear permitieron confirmar la esteoquímica de los enlaces según la estructura reportada por Kamerling para el PsC 18C.¹ En el espectro de qHNMR del PsC en estudio (Fig. 2b) se observó la señal singlete en δ 1,92 ppm perteneciente a los protones del metilo del acetato libre, debido a la des-O-acetilación *in situ*. En δ 1,34 ppm apareció la señal doblete perteneciente a los protones del metilo en posición 6 del residuo de ramnosa, estas señales fueron integradas, observándose entre ellas una relación entre áreas de 1,02 : 1,00, correspondiente al metilo del acetato libre respecto a la señal del residuo de ramnosa en posición 6. Por lo antes observado, se descartó la presencia del PsC serotipo 18F, pues este presenta en su unidad repetitiva (UR) dos residuos O-acetilados.²² Del mismo modo, se puede decir que la estructura no se correspondió con la del PsC serotipo 18B, debido a la ausencia de residuos O-acetilados en su unidad repetitiva.²³

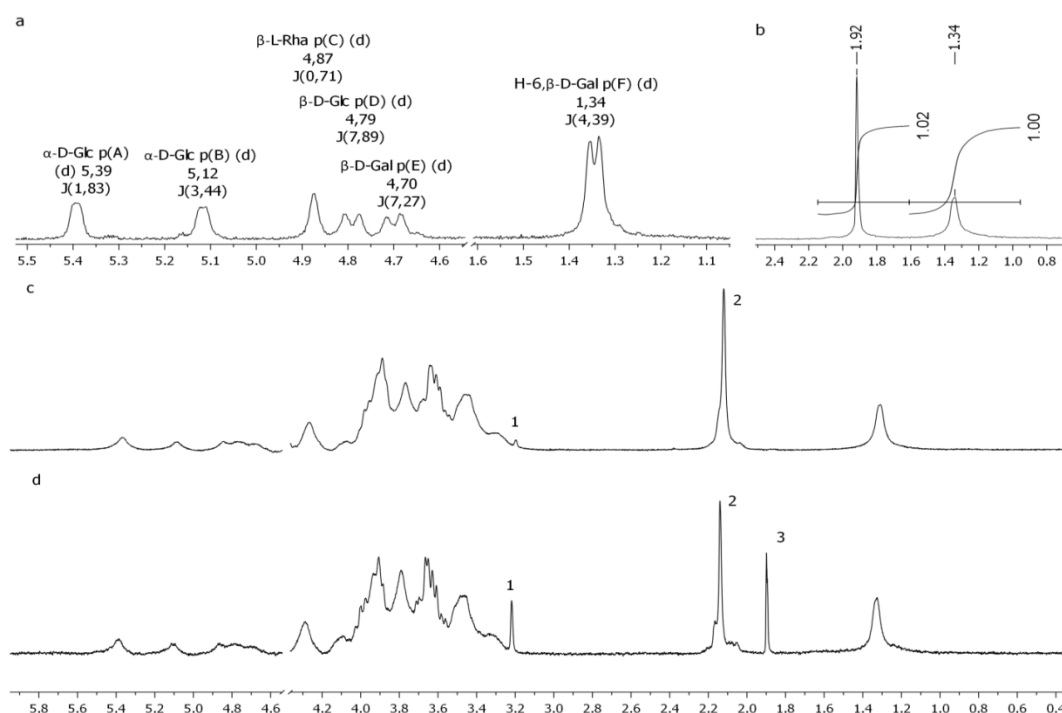


Fig. 2. Espectros de RMN del PsC 18C. a) regiones de los protones anoméricos y de los protones en las posiciones desoxi de un polisacárido hidrolizado y des-O-acetilado. b) fragmento del espectro de qHNMR. c) espectro RMN ¹H del PsC 18C. d) espectro RMN ¹H del PsC 18C purificado (ATCC). 1. Polisacárido C²⁴. 2. Grupo O-acetato perteneciente a la estructura del PsC 18C. 3. Grupo O-acetato libre.

Adicionalmente, se compararon los corrimientos químicos obtenidos para un espectro del PsC 18C desfosforilado con los resultados reportados por Jansson y cols. para el PsC serotipo 18A igualmente desfosforilado.²⁴ Del análisis realizado, se encontraron marcadas diferencias entre los corrimientos químicos de los protones anoméricos del residuo de α -D-Glcp y de α -D-GlcpNAc del PsC serotipo 18A por lo que se descartó también su presencia. Mediante el análisis del espectro RMN ^1H obtenido a partir de una muestra del PsC 18C (Fig. 2c) y su espectro similar del PsC 18C purificado (ATCC) (Fig. 2d), se comprobó la no existencia de cambios significativos entre los corrimientos químicos de las señales de los protones anoméricos ni en los singletes de la región entre δ 2,50 y 1,80 ppm. Tomando en consideración todo lo anterior, se pudo confirmar la identidad del PsC perteneciente al serotipo 18C.

Análisis de los monosacáridos del PsC 18C por CGL

Cada monosacárido presenta al menos tres picos cromatográficos y el inositol solo uno. La ramnosa eluye en tres picos a los 5,70; 5,76 y 6,26 min; la galactosa lo hace a los 7,26; 7,54 y 7,81 min y la glucosa a 7,88; 8,44 y 8,74 min, respectivamente. El inositol muestra un solo pico aislado a los 9,34 min. Aun cuando entre los picos 3 de la galactosa y 1 de la glucosa no existe una separación hasta la línea de base, es posible realizar una integración adecuada de estos. La evaluación de carbohidratos por CGL como derivados TMS es una técnica ampliamente difundida.¹³ Los derivados TMS se obtienen a partir de los monosacáridos obtenidos por la hidrólisis, los cuales se silanizan directamente con TMCS/HMDS. Este tipo de derivatización tiene el inconveniente de producir cromatogramas que presentan más de una señal por monosacárido. Cada señal representa a cada una de las formas en que los derivados silanizados se encuentran en disolución, anómeros α o β de las formas furanósica y piranósica. No obstante, resulta un método relativamente sencillo y brinda resultados confiables en un corto período de tiempo. Por esta razón, la CGL con el empleo de los derivados TMS, se aplicó para comprobar la relación estequiométrica de los monosacáridos del PsC 18C,¹³ con lo que se obtuvieron los cromatogramas de los derivados TMS para la mezcla de los monosacáridos patrones e inositol (Fig. 3a) y la muestra hidrolizada del PsC 18C e inositol (Fig. 3b).

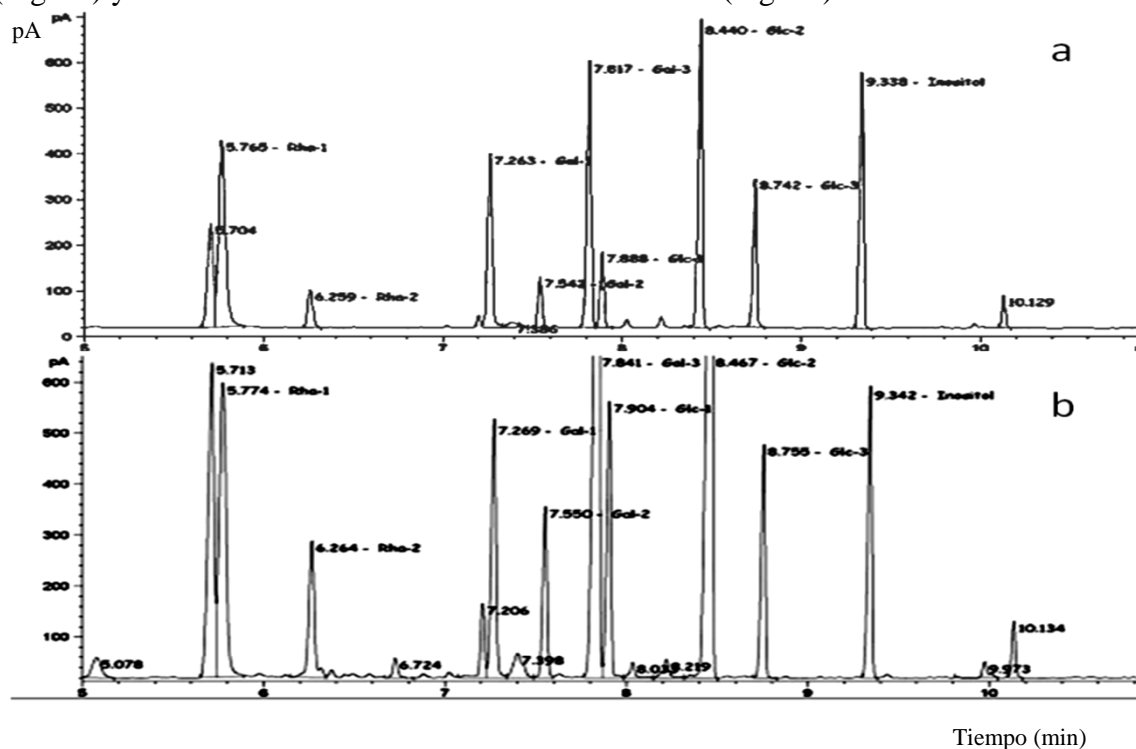


Fig. 3. a) Cromatograma por CGL de los derivados TMS de la mezcla de los monosacáridos Gal, Glc, Rha patrones. b) Cromatograma por CGL de los derivados TMS de los monosacáridos de la muestra de PsC 18C hidrolizada.

La muestra se evaluó mediante el uso de la curva de calibración obtenida para cada monosacárido para obtener la relación de los monosacáridos presentes en el PsC 18C. Se pudo apreciar, que en todos los casos se obtuvieron coeficientes de correlación mayores que 0,98 y pendientes significativamente diferentes de cero [$p(b) < 0,05$]. Se obtuvieron interceptos no significativos para la glucosa y la galactosa, ya que el intervalo de confianza ($a \pm \Delta a$) de estos incluye al cero por lo que puede decirse que el método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado. En el caso particular de la ramnosa, el intercepto sí fue diferente de cero, lo que constituyó un error sistemático al aplicar el método, por lo que este valor se tuvo en cuenta en la cuantificación de este monosacárido, no obstante, el método es lineal (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros estadísticos de la curva de regresión ajustada al modelo lineal por el método de los mínimos cuadrados obtenida por CGL para la mezcla de monosacáridos presentes en el PsC 18C.

Parámetro	Glu	Gal	Rha
b	0,0032	0,0077	0,0057
$p(b)$	0,003	0,009	0,002
a	0,46	0,92	1,20
$-a \pm \Delta a$	-0,24 – 1,17	-0,12 – 1,97	0,15 – 2,24
r	0,997	0,991	0,984

Partiendo de estos resultados, se determinó que la relación de monosacáridos presentes en el serotipo 18C fue: 0,94 : 1 : 3,05 (mol/mol/mol), a partir de la relación entre la sumatoria de las áreas de cada monosacárido respecto al inositol y la suma de todas las áreas del cromatograma. Este resultado está en concordancia con la estructura de la UR del PsC 18C (tres unidades de Glc, una de Gal y una de Rha).^{Error! Marcador no definido.} Los resultados permitieron concluir que la CGL con el empleo de los derivados TMS es adecuada para el análisis estructural del PsC 18C.

Análisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase invertida con detección de fluorescencia

El análisis de los cromatogramas de la mezcla de monosacáridos patrones presentes en el serotipo 18C (Fig. 4a) y de una muestra de PsC 18C hidrolizada y marcada con 2-AB (Fig. 4b) permitió corroborar la relación estequiométrica de la UR del PsC 18C mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución en fase invertida con detección de fluorescencia.

La cuantificación tuvo lugar por el método de la curva de calibración ajustada al modelo lineal por el método de los mínimos cuadrados.

Como se puede apreciar, los picos de la Gal y la Glc se separan con una resolución de 1 mientras que la Glc y la Rha, lo hacen con una resolución de 1,5 en el cromatograma del PsC 18C (Fig. 4b), lo cual permite realizar la integración adecuada de los picos de los monosacáridos presentes en el PsC 18C y realizar la cuantificación.

La muestra se evaluó mediante el uso de la curva de calibración obtenida para cada monosacárido para obtener la relación de los monosacáridos presentes en el PsC 18C. Como se puede apreciar, en todos los casos, se obtuvieron coeficientes de correlación mayores que 0,99; pendientes significativamente diferentes de cero [$p(b) < 0,05$] e interceptos no significativos, ya que sus

intervalos de confianza ($a \pm \Delta a$) incluyen al cero, lo que indica la ausencia de errores sistemáticos al aplicar el método (Tabla 4).

A partir de estos resultados, se determinó que la relación de los monosacáridos presentes en el PsC 18C fue Rha : Gal : Glc 1 : 0,70 : 3,46 mol/mol. Este resultado está en concordancia con los reportes publicados acerca de la estructura del serotipo 18C que establecen para la UR del PsC 18C Rha : Gal : Glc 1 : 1 : 3 mol/mol.¹

Las diferencias de la relación de monosacáridos de la UR del PsC 18C encontradas por ambos métodos puede estar determinada por sus errores sistemáticos. Los dos métodos brindan el mismo resultado y pueden ser usados indistintamente.

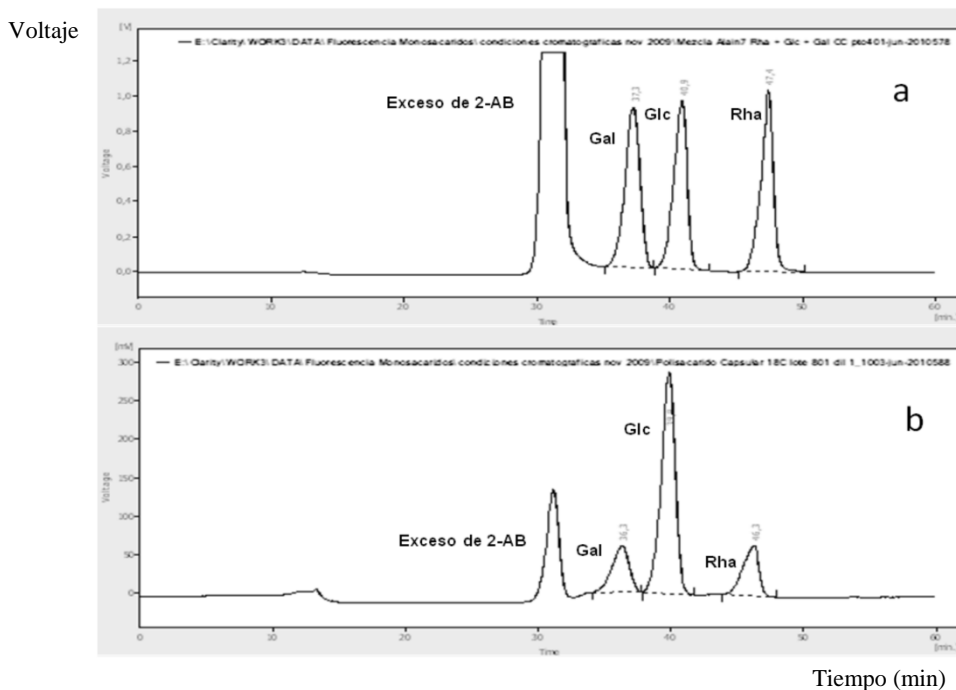


Fig. 4. a) Cromatograma por RP/HPLC con detección de fluorescencia de la mezcla de los monosacáridos Gal, Glc, Rha patrones. b) Cromatograma por RP/HPLC con detección de fluorescencia de la muestra del PsC 18C hidrolizada en medio ácido.

Tabla 4. Parámetros estadísticos de la curva de regresión ajustada al modelo lineal por el método de los mínimos cuadrados obtenida por RP/HPLC para la mezcla de monosacáridos presentes en el PsC 18C.

Parámetro	Glu	Gal	Rha
b	664 543,19	662 890,34	689 247,84
$p(b)$	$5 \cdot 10^{-12}$	$1 \cdot 10^{-11}$	$5 \cdot 10^{-11}$
a	133,97	1221,38	-846,02
$a \pm \Delta a$	-1832,64 – 2100,59	-952,15 – 3394,92	-3556,35 – 1864,32
r	0,999	0,998	0,998

Análisis por HPSEC. Determinación de la constante de distribución (K_D)

La K_D se determinó a partir de la evaluación de los parámetros obtenidos mediante el análisis del cromatograma del PsC 18C (Fig. 5). Como se puede apreciar, se obtuvo un pico homogéneo a los 5,82 min, correspondiente al PsC 18C.

El valor obtenido fue de 0,08, lo cual está en correspondencia con un polisacárido cuya talla molecular es cercana a los 879 kDa.^{20,21}

CONCLUSIONES

La combinación de la RMN ^1H y los métodos cromatográficos utilizados en este estudio permitieron complementar la caracterización del PsC 18C a ser incluida en el proceso productivo de una vacuna heptavalente en desarrollo. Con el empleo de la RMN se pudo confirmar la identidad del PsC 18C de *Streptococcus pneumoniae*. Los métodos cromatográficos aportaron información valiosa para evaluar también la identidad del PsC 18C. La metodología propuesta puede ser empleada y hacerse extensiva al resto de los serotipos incluidos en el candidato vacunal para su control analítico.

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente (CITMA) por el financiamiento de esta investigación. Al Ing. Domingo González Díaz del Instituto Finlay, por suministrar el polisacárido capsular empleado en este trabajo. Al Dr. Hermán Vélez Castro por todo el asesoramiento brindado durante la revisión de este documento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kamerling JP. Pneumococcal polysaccharide: A Chemical View-*Streptococcus pneumoniae*-Molecular Biology & Mechanisms of Disease (A. Tomasz, ed), Mary Ann Liebert, Inc., Larchmont NY, USA. 2000; 81-114.
2. Jones C. Capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. Carbohydr. Eur. 1998; 21:10-16.
3. WHO Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines. Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, 2009; 1-57.
4. Organización Mundial de Salud. Technical Report Series. 2005; No. 927; 1-40.
5. Talaga P, Vialle S, Moreau M. Development of a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates. Vaccine. 2002; 20:2474-2484.
6. Sniadak DH, Schwatz B, EtLipman H. Potencial intervention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children implications for vaccines strategies. Pediatr Infect. Dis. 1995; 14:503-10.
7. Verez V. Proyecto de investigación-desarrollo No 00501195: Desarrollo de una Vacuna Conjugada contra los Neumococos. Sistema de Programas y Proyectos del CITMA. Ciudad de La Habana. 2006.
8. Abeygunawardana Ch, Williams TC, Sumner JS, Hennessey Jr JP. Development and Validation of an NMR-Based Identity Assay for Bacterial Polysaccharides. Anal. Biochem. 2000; 279:226-240.
9. Bharti SK, Roy R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy. Trends Anal.Chem. 2012; 35:5-26.
10. Chaplin MF, Kennedy JF. Carbohydrate analysis. A Practical approach. Second Edition. 1994; 5-53.
11. Canaán-Haden L, Cremata J, Chang J, Valdés Y, Cardoso F, Vérez V. High-performance reverse phase chromatography with fluorescence detection assay for characterization and quantification of pneumococcal polysaccharides. Vaccine. 2006; 24S2: S2/70-S2/71.
12. Yu IP CC, Manam V, Hepler R, Hennessey Jr JP. Carbohydrate composition analysis of bacterial polysaccharides: optimized acid hydrolysis conditions for HPAEC-PAC analysis. Anal Biochem. 1992; 201:343-349.

13. Sweeley CC, Bentley R, Makyta M, Wells WW. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substance. J Am Chem Soc. 1963; 85:2497-2507.
14. Storch de Gracia JM. Fundamentos de la cromatografía de gases. Madrid: Editorial Alambra S.A Primera edición; 1968;1-209.
15. Kim JS, Laskowich ER, Arumugham RG, Kaiser RE, MavMichael GJ. Determination of saccharide content in pneumococcal polysaccharides and conjugate vaccines by GC – MSD. Anal. Biochem. 2005; 347:262-274.
16. Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB. Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-aminobenzamide and anthranilic acid. Anal Biochem. 1995; 230:229-238.
17. Neville DC, Coquard V, Priestman DA, teVruchte DJ, Sillence DJ, Dwek RA, *et al.* Analysis of fluorescently labeled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labeling. Anal Biochem. 2004; 331:275-282.
18. Dasgupta A. Advances in Chromatographic Techniques for Therapeutic Drug Monitoring. University of Texas Health Sciences. Houston. Taylor & Francis Group. 2010.
19. Manzi AE. Carbohydrates and Their Analysis, Part One. Carbohydrate Chemistry. Bioprocess Technical. 2008; 54-60.
20. Quatrochi O, Abelaira S, Felipe R. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Editor Artes Gráficas. Farro SA, Argentina. Segunda edición; 1992; 1-381.
21. Dierksmeier G. Métodos cromatográficos. Editorial Científico-Técnica. Instituto Cubano del Libro. Primera edición; 2005; 1-412.
22. Karlsson C, Jansson PE, Widmalm GUB, Sorensen S. Structural elucidation of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 18B. Carbohydr. Res. 1997; 304:165-172.
23. Jansson PE, Lindberg B, Lindberg J, Henrichsen J. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 18F. Carbohydr Res. 1988; 173:217-225.
24. Karlsson C, Jansson PE, Skov Sorensen UB. The pneumococcal common antigen C-polysaccharide occurs in different forms mono-substituted or di-substituted with phosphocholine. Eur J Biochem. 1999; 265:1091-1097.
25. Jansson PE, Kumar NS, Lindberg B, Widmalm G, Henrichsen J. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 18A. Carbohydr Res. 1988;173: 227-233.