

ESTUDIO SOBRE EL POLISACARIDO Cx DEL PNEUMOCOCCUS

Por
Miguel Guzmán U., M.D., M.Sc. *

INTRODUCCION

El presente trabajo fue realizado con el objeto de estudiar algunos aspectos de la constitución bioquímica y de la actividad biológica de un polisacárido obtenido del *Pneumococcus pneumoniae* (24-13-9), el cual será usado en el futuro para intradermorreacciones (4-7-8).

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos: La cepa de *Pneumococcus pneumoniae* usada en este trabajo para obtener el polisacárido Cx fue una cepa rugosa del cepario del Departamento de Microbiología de la Universidad de Tulane.

Medios. El medio de cultivo empleado fue caldo de trypticase adicionado con 0.5% de glucosa, según recomendación de Hornung y Berenson (13); el pH del medio fue mantenido a 7.2 por medio de la solución tampón de McIlvein.

Suero antiproteína C-reactiva. El suero antiproteína C-reactiva usado en

algunas pruebas de control fue obtenido comercialmente de la casa Difco.

Sueros humanos proteína C-reactiva positivos y negativos. El suero humano positivo conteniendo la proteína C-reactiva (6-19-20-12-21), así como también los sueros negativos que se usaron durante este trabajo para las pruebas de actividad biológica del polisacárido Cx obtenido, fueron suministrados por la doctora Hornung.

Suero positivo de conejos para proteína Cx. El suero de conejo conteniendo la llamada proteína reactiva Cx (2-15) fue obtenido en conejos inoculados con suero humano, albúmina humana o globulina humana involucradas en un adyuvante.

Obtención del Polisacárido Cx. Una cepa rugosa y liofilizada del *Pneumococcus pneumoniae* fue reconstituida con agua destilada, sembrada sobre agar sangre e incubada a 37°C. en atmósfera de CO² por 18 horas; después de comprobarse un buen crecimiento, se estudiaron los caracteres morfológicos de la colonia, la producción de hemólisis, las características morfológicas y tintoriales del microorganismo y la sensibilidad a la optoquina, con el objeto de estar seguros de que se trataba de una cepa pura. Realizados es-

* Profesor Asistente de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, Jefe de la Sección de Microbiología.

tos estudios, el microorganismo fue cultivado en fiolas que contenían 100 cc. de caldo de trypticase y se incubaron a 37° C. en atmósfera de CO²; después de 14 horas de incubación, se obtuvieron muestras de estos cultivos y se sembraron sobre agar sangre con el objeto de probar la pureza del cultivo; el resto de los cultivos fue transferido a cuatro recipientes que contenían cada uno 10 litros de caldo de trypticase previamente preparado, esterilizado y mantenido a 37° C. por 18 horas, con el fin de acortar la fase Lag de crecimiento, y a los cuales se les adicionó glucosa en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 0.5%, así como también la solución tampón del McIlvein para mantener el pH a 7.2; estos recipientes fueron incubados a 37° C. por un período de 14 horas, tiempo considerado como óptimo, ya que al final de este lapso es cuando se obtiene el máximo crecimiento del germen. Al igual que en el caso anterior, una muestra de cada uno de estos cultivos fue sembrada en agar sangre para probar la pureza del cultivo. Posteriormente los microorganismos fueron colectados mediante centrifugación continua y las células resuspendidas en solución salina Buffer, centrifugadas nuevamente y resuspendidas con el objeto de remover el medio que pudiera estar presente y obtener así células puras; esta operación fue realizada por lo menos cuatro veces. Finalmente, las células fueron suspendidas en agua destilada hasta completar un volumen de 50 cc.; como paso siguiente, las células fueron tratadas con ultrasonido para destruir la célula bacteriana y así obtener un polisacárido crudo. Esta operación fue realizada con un aparato de ultrasonido a 250 w. y 10 kc. de frecuencia; aproximadamente cada 20 minutos durante esta operación una pequeña muestra del material tratado era retirado, con el objeto de colorearlo y comprobar en

forma aproximada el mínimo de células que habían sido rotas. A los 90 minutos de este tratamiento, la mayoría de las células habían sido destruidas, el material obtenido fue colectado y centrifugado a 5.000 XG. por 60 minutos a 4° C., el sobrenadante fue recolectado, ya que éste contiene la mayor cantidad de polisacárido; el sedimento fue desechado, puesto que Hornung y Berenson (13) demostraron que este sedimento prácticamente no contiene polisacárido.

Los siguientes pasos en la obtención del polisacárido fueron hechos de acuerdo con los estudios de Goebel y colaboradores (9) y Hornung y Berenson (13); el sobrenadante fue tratado con una solución 75% saturada de sulfato de amonio, con el fin de remover las proteínas y el material de la pared celular que pudiera estar presente, después de dejar actuar el sulfato de amonio por 30 minutos, a temperatura ambiente; el material se centrifugó a 5.000 XG. por 30 minutos para remover el precipitado formado; el sobrenadante fue recolectado y el sedimento desechado. El sobrenadante fue dializado posteriormente a 4° C. contra agua destilada, con el objeto de remover el sulfato de amonio, ya que éste puede inactivar el polisacárido Cx; esta operación fue realizada con varios cambios de agua destilada, hasta que al agregarle solución saturada de cloruro de bario, no se presentaba ningún precipitado de sulfato de bario. El material ya dializado y libre de sulfato de amonio, fue colectado y su volumen reducido hasta un 50% del total, con el fin de facilitar los pasos posteriores al trabajar con un volumen más pequeño. Esta reducción de volumen se realizó mediante un ventilador a temperatura ambiente. Posteriormente la sustancia fue tratada con 25 cc. de una mezcla formada por un volumen de alcohol octílico y 8 volúmenes de cloroformo, con el objeto de remover al máximo las proteínas y

lípidos presentes, dejando únicamente el polisacárido Cx, el cual no es soluble en estos solventes orgánicos. La fase acuosa fue colectada y centrifugada a 2.000 R.P.M. durante 10 minutos y el supernadante claro colectado. Este fue posteriormente tratado con 4 volúmenes de alcohol etílico 95% y 1% de carbonato de sodio; el alcohol fue agregado gota a gota dentro del supernadante agitado por medio de un agitador magnético a velocidad media, operación realizada a temperatura ambiente, el polisacárido fue precipitándose; cuando esta operación se consideró terminada, se centrifugó a 5.000 XG. a 4° C. por 30 minutos; luego el precipitado se resuspendió en un pequeño volumen de agua destilada estéril, y la operación de precipitación se realizó nuevamente por 4 veces sucesivas; finalmente, el precipitado fue resuspendido en 50 cc. de agua destilada estéril; de éste se retiró una pequeña cantidad para probar su actividad biológica con sueros positivos para proteína C-reactiva, y el resto de este material fue dializado con agua destilada, con el fin de remover el alcohol que pudiera contener; posteriormente esta sustancia fue liofilizada por 24 horas; el producto obtenido fue pesado y guardado en un desecador.

Pruebas de actividad biológica. Con el objeto de determinar si la sustancia contenía actividad biológica, es decir, si era capaz de reaccionar con sueros que contenían la llamada proteína reactiva Cx o C, la cual puede aparecer en el suero como resultado de diversas condiciones, como ha sido descrito por diferentes autores (2-3-4-5-6-10-11-12-15-17-19-24-25), se diluyó 0,001 gr. de la sustancia en 1 cc. de una solución 0,001 molar de cloruro de calcio, ya que como fue reportado por Abernety y Avery (6) la presencia de iones Ca++ es indispensable para que esta reacción se realice. Diluciones progresivas de esta solución inicial se hicieron al 1:10, 1:32, 1:100, 1:320,

1:1.000, 1:3.200, 1:10.000, 1:32.000, 1:100.000, usando pruebas en tubo capilar (1) cada una de estas diluciones se probó con una cantidad igual de suero diluido reconocido como positivo para proteína C-reactiva. Los controles consistieron en una dilución de esta sustancia y suero no diluido negativo para proteína C-reactiva. El control positivo consistió en una dilución de polisacárido Cx de actividad conocida y un suero no diluido positivo para proteína C-reactiva. Los sueros positivos y negativos fueron también probados con el suero específico anti-proteína C-reactiva (20). Este mismo tipo de pruebas fue realizado usando suero de conejos inoculados con suero humano, globulina humana y albúmina humana más adyuvantes, y en los cuales aparece la llamada proteína Cx como uno de los componentes de las llamadas "Proteínas de fase aguda", tal como lo han reportado diferentes autores (12-14-26-27). Con el objeto de saber qué tan específica era la reacción, se tomó 1 cc. del suero positivo obtenido de conejos, y se mezcló con 0,1 cc. de una solución del polisacárido Cx preparada disolviendo, 0,001 gr. del polisacárido en solución molar de Cl₂Ca; la mezcla se incubó a 37° C. por media hora, y luego que el precipitado se formó, éste fue removido por centrifugación. El sobrenadante fue probado con el suero anti-proteína C-reactiva específica; por lo menos tres adsorciones fueron necesarias para remover la proteína Cx reactiva y obtener una prueba completamente negativa con el suero anti-proteína C-reactiva.

Pruebas bioquímicas. Con el objeto de saber si el polisacárido estaba puro, algunas pruebas bioquímicas fueron realizadas: para determinar si algunos de los componentes contenían grupos aminados libres, se realizó la prueba de Nihydrina (23). La prueba del biuret fue realizada con el objeto de demostrar si el polisacárido contenía protei-

nas (23). Para demostrar si el polisacárido estaba contaminado con ácidos nucleicos, se realizó una prueba de absorción a la luz ultravioleta, usando espectrofotómetro de Beckman; para esta prueba se hizo una dilución al 1:10 del polisacárido en agua destilada y se probó a longitudes de onda de 220 a 310 \AA .

La cantidad de proteínas contenida en 0,001 gr. del polisacárido, se determinó mediante la técnica descrita por Lowry (18).

Para conocer con mayor precisión la constitución de la sustancia Cx. se realizaron algunos estudios cromatográficos, para lo cual 0,005 gr. del polisacárido Cx. fueron disueltos en 1 cc. de una solución 6 N del HCL e hidrolizados según los procedimientos usuales; cuando el proceso de hidrólisis

se consideró completo, pruebas cromatográficas fueron realizadas en papel Whatman N° 4 y una muestra de hidrolizado fue probada contra standards de galactosamina, glucosamina, N-acetyl-glucosamina y puesto en el baño de cromatografía ascendente, usando como diluyente butanol piridina-agua 2:2:1; después de 18 horas el papel fue retirado y coloreado, usando el reactivo de bencidina (22); un tipo similar de hidrólisis se realizó con el objeto de identificar los aminoácidos haciendo pruebas cromatográficas de la sustancia contra controles de glicina-alamina-lisina-ácido diaminopimélico-ácido glutámico, usando como solvente N-butanol-piridina-ácido acético-glacial-agua 15:10:3:12; después de 18 horas el papel fue teñido con el reactivo de Nihydrina.

RESULTADOS

El uso del caldo trypticase adicionado de 0.5% de glucosa, produce un buen crecimiento; el pH se mantiene muy bien mediante el uso de la solución buffer, la obtención del polisacárido no es difícil; después de la liofilización se obtuvo como producto final un polvo blanco en cantidad de 44 mgs.; este producto fue soluble en agua destilada, aunque la disolución total del producto tomó algunos minutos.

Las pruebas realizadas para probar la actividad biológica del producto en la forma que fueron descritas anteriormente cuando se hicieron usando sueros humanos positivos para proteína C-reactiva, se obtuvo una reacción muy poco positiva, con un título de 1:1000, antes de la liofilización del producto; después de la liofilización, el título fue bajo 1:100. Cuando estas pruebas fueron realizadas con sueros de conejos, las reacciones fueron positivas con títulos 1:10.000, con positividad valorable en + + + +; esto

cuando se usaron sueros de conejo inoculados con albúmina humana más adyuvantes de Freund.

Después de la adsorción de la proteína Cx reactiva con el polisacárido Cx obtenido por nosotros, los sueros dieron una reacción negativa, tanto con el polisacárido C usado como control, como con el polisacárido Cx y con el suero anti-proteína C-reactiva.

Las pruebas bioquímicas realizadas dieron los siguientes resultados: la reacción de Nihydrina fue positiva; la reacción del biuret fue ligeramente positiva; la curva de absorción en el espectrofotómetro dio una banda de adsorción mayor a los 260, pero prácticamente no se aprecia absorción a 280; esta absorción a 260 probablemente se debe a la presencia de uridina monofosfato (UMP), como lo han reportado Hornung y Berenson (13); el contenido de proteína analizado espectrofotométricamente por el método de Lowry (18) demostró que nuestro producto contenía por lo menos 25

gammas de proteína por cada miligrama del producto.

Los aminoácidos identificados por cromatografía de papel, fueron: alamina, glicina y ácido diaminopimélico.

Los azúcares identificados por cromatografía y mediante la reacción de bendidina (22) mostraron que por lo menos galactosamina y glucosamina son los azúcares predominantes.

DISCUSION

Como fue descrito por Anderson (2), el polisacárido obtenido en la forma detallada anteriormente parece ser altamente polimerizado; puede reaccionar tanto con la proteína C-reactiva presente en sueros humanos, como con la proteína Cx reactiva presente en el suero de conejos, aunque la reacción es mucho más aparente en este último caso; por ese hecho Anderson (2) llama a este polisacárido "Polisacárido Cx".

La obtención realmente no ofrece mayores problemas, pero es convenient-

te probar la actividad biológica del producto después de cada paso realizado durante su obtención, ya que esta actividad puede perderse y obtenerse al final un producto biológicamente inactivo. Es posible que con técnicas más refinadas, como por ejemplo la cromatografía de gas, este polisacárido sea un producto más complejo y contenga más azúcares de los que fue posible reconocer con la cromatografía de papel en el presente trabajo

SUMARIO

La obtención del polisacárido Cx a partir de una cepa rugosa de *Pneumococcus pneumoniae* y sus propiedades

químicas y biológicas son presentadas en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, H. G., and McCarty, M.—Determination of C. Reactive protein in the blood as a measure of activity of the disease process in acute Rheumatic fever. *Am. J. Med.* 8: 446-445, 1950.
2. Anderson, H. G., and McCarty, Maclyn. The occurrence in rabbit of an acute phase protein analogous to human C. Reactive protein. *J. Exp. Med.* 93: 25-36, 1951.
3. Ash, Rachel.—Non Specific precipitins for pneumococci fraction C in acute infections. *J. Inf. Dis.* 53: 89-97, 1933.
4. Abernethy, I. J., and Francis, J.—Studies on the Somatic C-polysaccharide of pneumococcus. I Cutaneous and serological reactions in pneumonia. *J. Exp. Med.* 65: 59-73, 1937.
5. Abernethy, I. J.—Studies on the Somatic C-polysaccharide of pneumococcus. II The precipitation Reaction in animals with experimentally induced pneumococci infection. *J. Exp. Med.* 65: 75-89, 1937.
6. Abernethy, I. J., and Avery, O. T.—The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. I Distribution of the reactive protein in patients sera and the effect of calcium in the flocculation reaction with C-polysaccharide of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 73: 173-182, 1941.
7. Finland, M., and Dowling, F. H.—Cutaneous reactions and antibody response to intracutaneous infections of pneumococcus polysaccharide. *J. Immunol.* 29: 285-299, 1935.

8. Francis, T., Jr., and Abernethy, I. J.—Cutaneous reactions in pneumonia to the C-polysaccharide of pneumococcus. *J. Clin. Invest.* 13: 692, 1934.
9. Goebel, F. W., Shedlovsky, T., Lavin, I. G., and Adams H. M.—The Heterophile antigen of pneumococcus. *J. Biol. Chem.* 148: 1-15, 1943.
10. Hedlund, P.—The production of the acute phase protein after non specific stimulation. *Act. Med. Escand.* 118: 329-394, 1944.
11. Hedlund, P., and Löfström, C.—Serologic Studies in experimentally produced polyarthrits. *Act. Med. Escand.* 124: 535-544, 1946.
12. Hedlund, P.—The appearance of acute phase protein in various diseases. *Act. Med. Escand. Supp.* 196: 579-601, 1947.
13. Hornung, M. O., and Berenson, G. S.—Some biochemical and serological properties of the pneumococcal C-polysaccharide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 114: 31-37, 1963.
14. Kushner, I., and Kaplan, M. H.—Studies of acute phase protein. III Elicitation of Cx-reactive protein in relation to immune elimination of antigen and appearance of circulating antigen antibody complexes. *J. Immunol.* 92: 55-60, 1964.
15. Löfström, Gunnar.—Acute phase serum in rabbits. I The capacity of pneumococcus strains which react specifically with type 16 anti-pneumococcus serum to cause non specific capsular swelling with acute phase serum from rabbits. *Act. Med. Escand. Supp.* 196: 575-578, 1947.
16. Löfström, Gunnar.—Comparison between the reactions of acute phase serum with pneumococcus C-polysaccharide and with pneumococcus type 27. *Brit. J. Exp. Pat.* 25: 21-26, 1944.
17. Löfström, Gunnar.—Non specific capsular swelling in pneumococci. A serological and clinical study. *Act. Med. Escand. Supp.* 141: 10-98, 1943.
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.—Protein measurements with FoLin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-75, 1951.
19. Macleod, C. M., and Avery, O. T.—The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. II Isolation and properties of the reactive protein. *J. Exp. Med.* 93: 183-190, 1941.
20. Macleod, C. M., and Avery, O. T.—The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. III Immunological properties of the C-reactive protein and its differentiation from normal blood proteins. *J. Exp. Med.* 73: 191-200, 1941.
21. McCarty, Maclyn.—The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. *J. Exp. Med.* 85: 491-498, 1947.
22. Smith, Ivor. *Chromatographic techniques.* Intersciences Publishers. New York, 1958.
23. Sumner, J. B., and Somers, F. G.—*Laboratory Experiments in biological Chemistry.* Academic Press Inc. Publishers New York. Second Ed. 1949.
24. Tillet, W. S., Goebel, F. W., and Avery, O. T.—Chemical and immunological properties of a species specific carbohydrate of pneumococci. *J. Exp. Med.* 52: 895-900, 1930.
25. Tillet, W. S., and Francis, T.—Serological Reactions in pneumonia with a non protein somatic fraction of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 52: 561-591, 1930.
26. Wood, H. F.—The relationship between the acute response and antibody production in rabbit. I Correlation between the early appearance of Cx-reactive protein and subsequent antibody production. *J. Exp. Med.* 98: 311-319, 1953.
27. Wood, H. F.—The relationship between the acute phase response and antibody production in rabbit. II The Stimulation of Cx-reactive protein response by certain adjuvants and the responses to the enhancement of antibody formation. *J. Exp. Med.* 98: 321-329, 1953.