

Evaluación de la memoria inmunológica de un prototipo de vacuna contra la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*

Marian Lucero, Edgar Trujillo, Elizabeth Monreal-Escalante, Carlos Angulo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), Grupo de Inmunología y Vacunología. angulo@cibnor.mx

Biotecnología y Ciencias Agropecuarias

Abstract

Some pathogenic strains of the bacteria *Vibrio parahaemolyticus* that inhabit marine surfaces are responsible for causing gastroenteritis when consumed in contaminated seafood. These strains present various virulence factors, such as the hemolysins TDH, TRH, and TLH, provoking the disease. Currently, there are no vaccines against it on the market, and therefore, the present study aimed to evaluate the immunological memory in a mouse model by the administration of the *Schizochytrium*-EPI_Vp vaccine prototype containing epitopes of the TDH, TRH, and TLH. EPI_Vp vaccine prototype was produced in the microalga *Schizochytrium* sp. and administered to mice along with control groups: (-) PBS, *Schizochytrium* sp.-WT, and (+) TRH. The production of specific IgG antibodies on days 28 and 60 demonstrated that the *Schizochytrium*-EPI_Vp vaccine prototype induced and generated an immunological response and memory.

Keywords: gastrointestinal diseases, immunoanalysis, immune memory.

Resumen

Algunas variantes de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*, que habitan en las superficies marinas, son responsables de causar gastroenteritis cuando se consumen mediante alimentos contaminados. Estas bacterias presentan diversos factores de virulencia, como las toxinas TDH, TRH y TLH, que provocan la enfermedad. Actualmente no existen vacunas contra ella en el mercado, por lo que el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la memoria inmunológica a través de la persistencia de anticuerpos en ratones mediante la administración del prototipo de vacuna llamada *Schizochytrium*-EPI_Vp que contiene epítomos (porción de un antígeno al que reconoce y se une el anticuerpo) de TDH, TRH y TLH. El prototipo de vacuna EPI_Vp se produjo en la microalga *Schizochytrium* sp. y se administró a un grupo de ratones junto con los grupos control: (-) PBS, *Schizochytrium* sp.-WT y (+) TRH. La producción de anticuerpos IgG específicos en los días 28 y 60 demostró que el prototipo de vacuna *Schizochytrium*-EPI_Vp indujo una respuesta y generó memoria inmune.

Palabras clave: enfermedades gastrointestinales, vacunas, microalgas.

Problemática

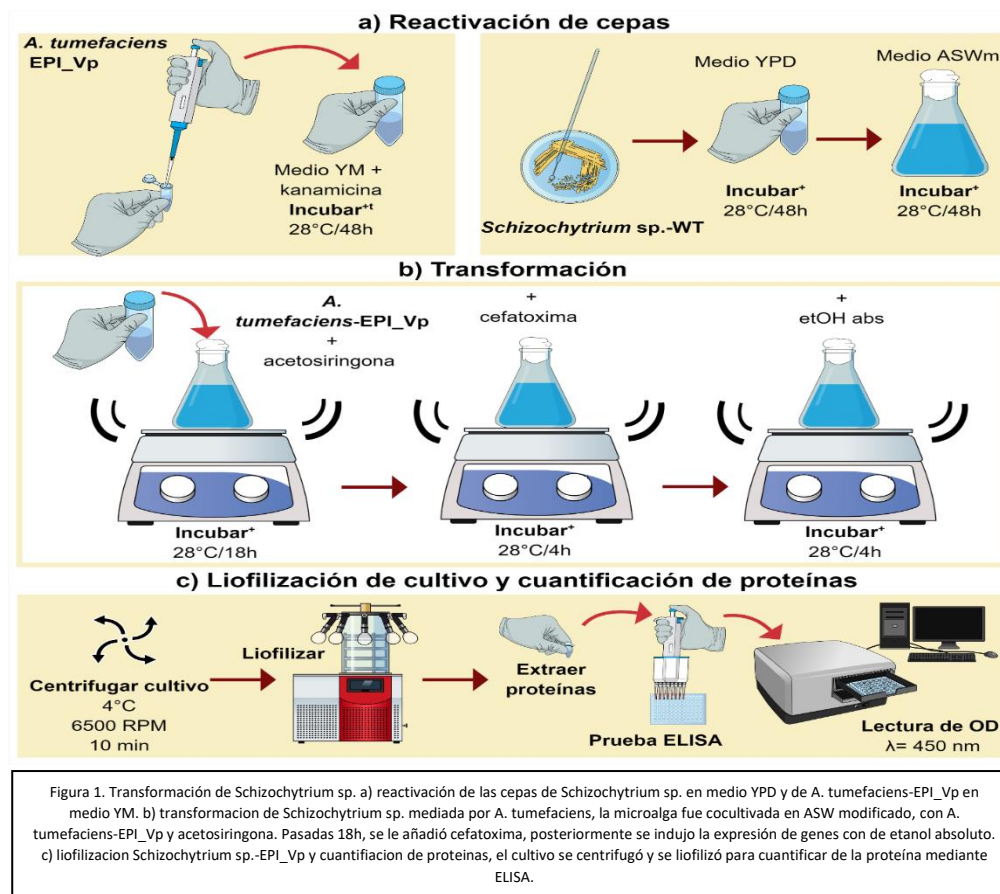
Existen variantes de *Vibrio parahaemolyticus* que causan enfermedades en animales y humanos y no existe una vacuna comercial para su prevención.

Usuarios

Productores Primarios, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Secretaría de Salud, Secretaría de Economía.

Introducción

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria Gramnegativa, móvil, halófila (que vive en ambientes salinos) que habita en el mar, adherida a superficies vivas o inertes (Zamora y Quiróz, 2005). Es uno de los patógenos (microorganismos capaces de infectar) responsables de provocar vibriosis en animales acuáticos y gastroenteritis en humanos (Wang et al., 2015). Algunos de estos patógenos presentan factores de virulencia, donde destacan las toxinas: la hemolisina termoestable directa (TDH), hemolisina relacionada a TDH (TRH) y hemolisina termolábil (TLH). Estas toxinas forman poros en las células del



intestino y pueden provocar la salida de agua del interior de las células o el rompimiento de la membrana celular (Raghunath, 2015; Wang et al., 2015). El tratamiento indicado contra esta infección es la administración de antibióticos y no existe una vacuna (Heitmann et al., 2005). Recientemente se ha investigado (1) el desarrollo de vacunas contra la infección por *V. parahaemolyticus*, y (2) una plataforma de producción y entrega de vacunas en microalgas (Ramos et al., 2018). En este caso, *Schizochytrium* sp. ha sido estudiada por su capacidad para producir ácidos grasos beneficios (DHA y EPA) y vacunas orales (Castro et al., 2023). Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo evaluar la persistencia de anticuerpos en ratones inmunizados vía oral a con la vacuna *Schizochytrium*-EPI_Vp.

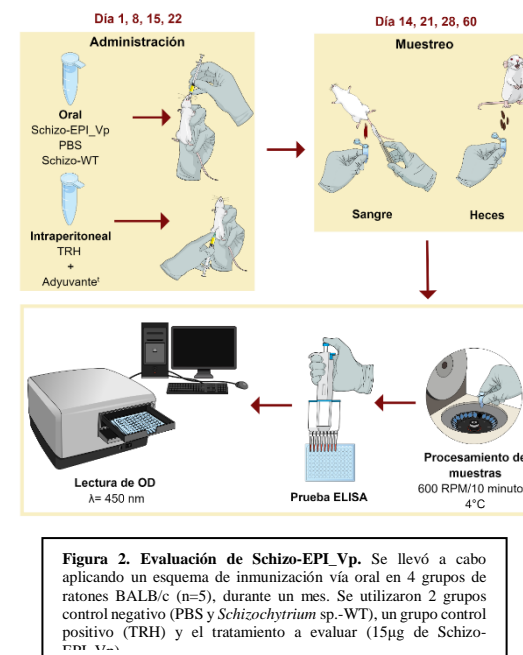
Objetivos

- Desarrollar sueros hiperinmunes (sueros con gran cantidad de anticuerpos específicos) contra las toxinas TDH, TRH y TLH en ratones de la línea BALB/C y cuantificar su inmunorreactividad por la técnica de ELISA.
- Evaluar la inmunogenicidad (capacidad de producir anticuerpos específicos) de la proteína EPI_Vp expresada en *Schizochytrium* sp. mediante un esquema de inmunización vía oral en ratones y determinar su inmunogenicidad a largo plazo.

Materiales y Métodos

Producción y evaluación de sueros hiperinmunes. Los sueros anti-TDH, anti-TRH y anti-TLH se obtuvieron a partir de la administración de los péptidos sintéticos de las toxinas TDH, TRH y TLH (4 dosis separadas por una semana) en ratones BALB/c (n=2). La primera dosis consistió en 10µL del péptido (1µg/µL) y 10µL del Adyuvante Completo de Freund (sustancia que aumenta la respuesta inmune), administradas en el cojinete plantar del ratón. Las dosis posteriores se conformaron de 50µL del péptido junto a 50µL del Adyuvante Incompleto de Freund vía intraperitoneal. Una semana posterior a la última inmunización, al finalizar el mes se tomaron y procesaron muestras de sangre y se llevó a cabo su cuantificación mediante la prueba de ELISA (Trujillo et al., 2024).

Producción de la vacuna en la microalga *Schizochytrium* sp. La producción de la vacuna Schizo-EPI_Vp se realizó siguiendo la metodología de Trujillo et al. (2024) (Figura 1). La transformación genética de *Schizochytrium* sp fue llevada a cabo mediante el método de *Agrobacterium*. Brevemente, se cultivó *Agrobacterium tumefaciens*, conteniendo la construcción genética de la vacuna (EPI_Vp) por 48 h a 28 °C hasta una densidad óptica de 1.0 a 650 nm.



Posteriormente, 1 mL del cultivo se añadió a 100 mL de un cultivo exponencial de *Schizochytrium* sp. (OD_{650nm} = 1.0) para su co-cultivo en medio ASWm. A continuación, se agregó 1mL de acetosiringona (100µM) para activar a *A. tumefaciens*, se incubó por 16 h, y se adicionó 1mL del antibiótico cefotaxima (250mg/L) y se incubó por 4 h. Pasado el tiempo se agregó 1 mL de etanol absoluto para inducir la expresión del gen. A las 48 horas post-inducción, el cultivo se centrifugó y liofilizó (proceso de deshidratación) para la posterior cuantificación de la proteína Schizo-EPI_Vp producida en la microalga se realizó por ELISA.

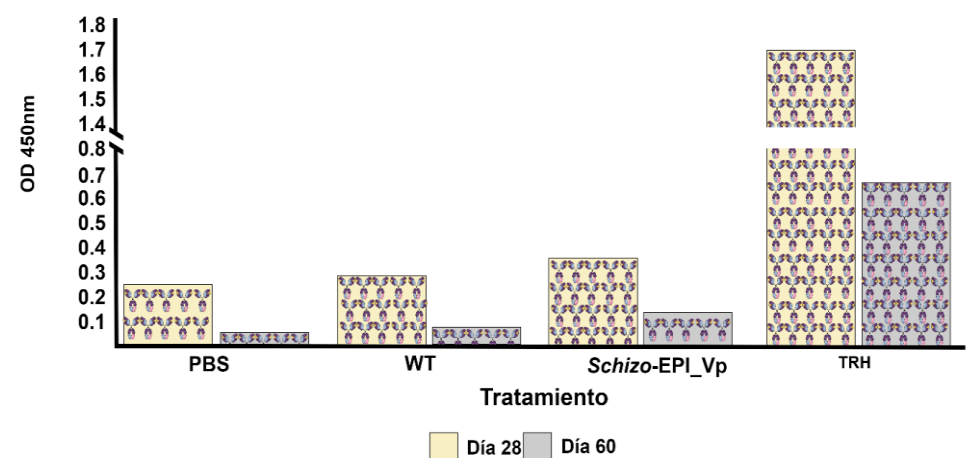


Figura 3. Título de anticuerpos específicos IgG. Se muestra el comportamiento de los niveles de anticuerpos detectados a partir del esquema de inmunización, al día 28 (amarillo) y al día 60 (azul).

Evaluación de la inmunogenicidad a largo plazo de la vacuna Schizo-EPI_Vp. La Figura 2 describe el protocolo de evaluación de la inmunogenicidad a largo plazo en ratones BALB/c. Los ratones fueron inmunizados de manera oral con 200 µL de Schizo-EPI_Vp (15µg), organizados en cuatro grupos con cinco ratones cada uno a los que se le administró: (a) *Schizochytrium* sp. silvestre (WT, Control negativo); (b) Toxina TDH (Control positivo); Solución de fosfatos (Blanco); y Schizo-EPI_Vp (vacuna). Cada grupo recibió administraciones semanales (días 1, 8, 15 y 22). Posteriormente se tomaron muestras de sangre y heces los días 28 y 60 post-inmunización para cuantificar los anticuerpos IgG por el método de ELISA (Trujillo et al., 2024).

Resultados y Discusión

De los sueros hiperinmunes obtenidos, el suero anti-TRH fue el que generó una mayor inmunogenicidad en comparación con anti-TDH y anti-TLH. Por lo tanto, este antisuero se utilizó para las determinaciones inmunológicas subsecuentes en este estudio. Por otro lado, el peso de la biomasa seca obtenida fue de 1.88g la cual presentó 215.98µg de proteína EPI_Vp por gramo. Lo cual concuerda a lo reportado por Trujillo y colaboradores en 2024, donde se obtuvo 218.63µg por gramo de biomasa seca, ambas obtenidas del cultivo recolectado a las 48h. La vacuna Schizo-EPI_Vp administrada vía oral en ratones estimuló la producción de anticuerpos específicos IgG al día 28 demostrando la inmunogenicidad (Figura 3). En comparación, el nivel de anticuerpos en los ratones vacunados con Schizo-EPI_Vp disminuyó, lo cual podría indicar una posible inducción de la memoria inmunológica (Kindt et al., 2007). No obstante, los ratones inmunizados con la TRH produjeron más anticuerpos específicos y por lo tanto tuvieron mayor inmunogenicidad y persistencia a largo plazo.

Conclusiones

El prototipo de vacuna *Schizochytrium*-EPI_Vp administrado vía oral en un modelo de ratón fue inmunogénica al día 28 y a largo plazo al día 60.

Impacto Socioeconómico

Las variantes patógenas de *V. parahaemolyticus* tienen potencial epidemiológico en animales acuáticos y en el ser humano. La utilización de la microalga *Schizochytrium* sp. como plataforma de administración de vacunas podría disminuir los impactos socioeconómicos provocados por este patógeno en la industria acuícola y la salud humana.