

Estudio de la inmunogenicidad humoral de la Subunidad B de la Toxina del Cólera (CTB) expresada en la cepa *Salmonella typhi* Ty 21a después de su administración a ratones por distintas vías

Acosta A., Díaz J., Sarmiento ME., Hidalgo C., Finalet J., Martínez M., Estévez P., Griñan I., Callis A., Infante JF., Oliva R., Fariñas M., García H., Perez JL., Izquierdo L., Azahares E., Sierra G.

Departamento de Biología Molecular, Instituto Finlay, Cuba

Resumen

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la inmunogenicidad humoral de la Subunidad B de la Toxina del Cólera (CTB) expresada en la cepa *Salmonella typhi* Ty 21a después de su administración a ratones por distintas vías. En el estudio se demostró el efecto sensibilizador de la administración de una dosis del recombinante después de la reinmunización de los animales con el propio recombinante y con CTB purificado.

Introducción

La cepa *Salmonella typhi* Ty 21a, vacuna viva atenuada utilizada para la prevención de la Fiebre Tifoidea (1,2,3), ha sido utilizada como vector de expresión de antígenos heterólogos en diferentes estudios (4, 5, 6, 7, 8, 9).

Su utilización por la vía oral y su capacidad de inducir respuestas inmunes a nivel secretorio (1,2), ha hecho que haya sido utilizada para la expresión de antígenos de *Vibrio cholerae* con el objetivo de desarrollar vacunas experimentales contra el cólera. (7, 8).

En nuestro laboratorio se han desarrollado construcciones genéticas con las cuales se ha logrado la expresión de CTB en *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y la cepa *Salmonella typhi* Ty 21a (9,10), por lo que en el presente trabajo nos propusimos estudiar la inmunogenicidad humoral de la Subunidad B de la Toxina del Cólera (CTB) expresada en la cepa *Salmonella typhi* Ty 21a después de su administración a ratones por distintas vías.

Materiales y Métodos

Cepas: Se utilizó la cepa atenuada de *Salmonella typhi* Ty 21a (Empresa de Producción de Biológicos

“Carlos J. Finlay”) y la misma cepa transformada genéticamente con el plásmido pJF1 que contiene un gen que codifica la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), un promotor inducible por IsoPropyl ThiolGalactósido (IPTG) y un gen de resistencia a la Ampicilina (10).

Antibióticos: Se usó la Ampicilina (Boehringer Mannheim) a una concentración de 50 µg/mL.

Medios de Cultivo: Se utilizó medio LB (Extracto de levadura (Oxoid) 0.5%, Triptona (Oxoid) 1%, Cloruro de Sodio (Farmacia) 1, Medio BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid), Medio Mac Conkey (Oxoid), Medio Kligler Iron Agar (Oxoid), Medio Lisina Iron Agar (Oxoid); los cuatro últimos preparados según las indicaciones del fabricante (11).

Control de las Cepas Vacunales

Estudio microbiológico: Las cepas de *Salmonella typhi* Ty 21a transformadas y no transformadas fueron inoculadas en cuñas de medio Kligler Iron Agar y medio Lisina Iron (11) e incubadas a 37 °C durante 24 horas después de lo cual se evaluó su patrón de crecimiento (11)

Curva de Crecimiento en presencia de Galactosa: Para realizar el estudio de la curva de crecimiento de las cepas en presencia de Galactosa estas se inocularon en medio LB con y sin Galactosa (0.5%) e incubadas a 37 °C, realizándose determinaciones seriadas de la DO de los cultivos a 600 nm con un espectrofotómetro Ultraspec III (Farmacia).

Estudio de la Expresión de CTB: Para llevar a cabo el estudio de la expresión de CTB, fueron inoculados 5 mL de medio LB con y sin ampicilina con la cepa transformada y no transformada respectivamente. A los cultivos obtenidos después del crecimiento durante 16 horas a 37 °C con agitación (200 RPM)

se les determinó la densidad óptica a 550 nm según la siguiente fórmula: $2/DO = \text{mL de cultivo a tomar}$, lo que permitió obtener cantidades equivalentes de células. Los volúmenes tomados de cada cultivo posteriormente fueron centrifugados a 10 000 RPM a 4 °C durante 15 min tomando muestras del sobrenadante y llevando a cabo la sonicación del botón celular en 300 mL de solución salina (NaCl 0.9%), después de lo cual los cultivos restantes fueron inducidos con IPTG (50 μ M) (Boehringer Mannheim) durante una hora a 37°C con agitación (200 RPM) tomándose muestras del sobrenadante y del sonicado del botón celular según la metodología descrita con anterioridad. A 100 μ L de las diferentes muestras de sonicado celular y del sobrenadante se les determinó cualitativamente la presencia de CTB mediante el método de GM1 ELISA (12).

GM1 ELISA: Para la realización de la técnica de GM1 ELISA (12) se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo en "U" (Nunc). Las placas se recubrieron con GM1 (1 μ g/mL) suministrado por el Dpto de Cólera del Instituto Finlay y el bloqueo fue con leche descremada (Oxoid) al 1%. El CTB (1 μ g/mL) utilizado como control positivo en el método cualitativo y como recubrimiento secundario para la detección de anticuerpos anti-CTB fue suministrado por el Departamento de Cólera del Instituto Finlay. El anticuerpo monoclonal (AcM) anti-CTB (Dpto de Monoclonales del Instituto Finlay) utilizado como control positivo para la detección de anticuerpos anti-CTB y como primer anticuerpo en el ensayo cualitativo para estudiar la expresión de CTB. Se usó un conjugado anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa obtenido en el Dpto. de Biología Molecular del Instituto Finlay utilizado a una dilución de 1:8000.

Las placas fueron leídas a 492 nm en un lector de ELISA (Multiskan. Multisof. LabSystems).

Animales: Para este estudio se emplearon un total de 149 ratones machos de la línea isogénica Balb/c suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) con un peso entre 22 y 28 g.

Esquema de Inmunización:

Primera Inmunización: Los animales fueron divididos en dos grupos: Grupo Recombinante (n=98) y Grupo Control (n= 51).

El Grupo Recombinante fue dividido en tres subgrupos los cuales fueron inmunizados con la cepa de

Salmonella typhi Ty21a transformada con el plásmido pJF1.

El Grupo Control fue dividido en los mismos subgrupos que el Grupo Recombinante, pero fue inmunizado con la cepa de *Salmonella typhi Ty21a* no transformada.

Para preparar los inóculos se obtuvo cultivos de *Salmonella typhi Ty21a* transformada y no transformada en medio LB con y sin ampicilina respectivamente después de una incubación a 37 °C con agitación (200 RPM) durante 18 horas, los cuales fueron centrifugados a 3000 RPM durante 15 min a 4 °C, después de lo cual el botón celular fue resuspendido en solución salina para obtener la concentración celular deseada.

El primer subgrupo del Grupo Recombinante (n= 28) fue inmunizado con 10⁹ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) del recombinante por la vía oral, utilizando una cánula intraesofágica en un volumen de 0.1 mL; previamente estos animales se habían mantenido en ayuno durante 12 horas, recibiendo 0.1 mL de una solución al 8% de bicarbonato de sodio por la misma vía 10 minutos antes de la inmunización. El segundo subgrupo (n=36) fue inmunizado con 10⁶ UFC del recombinante en un volumen de 0.1 mL por la vía endovenosa utilizando la vena dorsal de la cola y el tercer subgrupo (n=34) fue inmunizado con 10⁶ UFC del recombinante en un volumen de 0.1 mL por la vía intraperitoneal. Estos subgrupos se denominaron respectivamente Oral Recombinante (OR); Endovenoso Recombinante (ER) e Intraperitoneal Recombinante (IR).

El Grupo Control fue subdividido en los mismos subgrupos que el Grupo Recombinante, inmunizándose los animales con la misma metodología, pero con la cepa no transformada. Estos subgrupos se denominaron: Oral Control (OC) (n= 17); Endovenoso Control (EC) (n= 17) e Intraperitoneal Control (IC) (n = 17).

Reinmunizaciones: A las 6 semanas de la primera inmunización fueron reinmunizados por vía intraperitoneal con CTB (30 μ g) en Adyuvante Incompleto de Freund en un volumen de 0.1 mL 8 animales del subgrupo OR; 10 del subgrupo ER; 7 del subgrupo IR y 2 animales de los subgrupos OC, EC e IC.

Paralelamente, a las 6 semanas de la primera inmunización fueron reinmunizados por vía intraperitoneal con 10⁷ UFC de la cepa recombinante en un volumen de 0.1 mL 8 animales del subgrupo

OR; 16 del subgrupo ER; 14 del subgrupo IR y 2 animales de los subgrupos OC, EC e IC.

Estudio de la respuesta inmune humoral contra CTB:

La presencia de anticuerpos anti-CTB en los ratones inmunizados por diferentes vías se determinó por el método del GM1-ELISA ya descrito. Los sueros analizados se tomaron de los animales sacrificados semanalmente después de la primera inmunización. A los animales reinmunizados con CTB más AIF, así como a los ratones reinmunizados con *Salmonella typhi* recombinante se les tomó muestras de suero a los 15 y 21 días después de la segunda inmunización. Los sueros obtenidos después de la primera inmunización fueron diluidos 1:100, mientras que los obtenidos de los animales reinmunizados con CTB más AIF y con la cepa recombinante fueron estudiados en diluciones de 1:600 y 1:100 en PBS-Tween 20 (0.05%) respectivamente. Como controles negativos se usaron sueros de ratones no inmunizados (CN). Todas las muestras fueron montadas por duplicado obteniéndose la media de las DO de los duplicados para su posterior procesamiento estadístico.

Procesamiento Estadístico: Para el análisis estadístico se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA) de Clasificación Simple con la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tuckey (HSD), además se realizó un análisis exploratorio de los datos mediante un Diagrama de Caja (Box Plot) para lo cual se utilizó el paquete estadístico SPSS para Windows Versión 5.0.

Resultados y Discusión

Control de las Cepas Vacunales

Se obtuvo un patrón de crecimiento típico de *Salmonella typhi* en los medios utilizados (11) tanto para la cepa transformada como no transformada.

En cuanto a la curva de crecimiento en presencia de Galactosa se obtuvo una disminución de la DO de los cultivos de la cepa transformada y no transformada después de 5 horas en cultivo, lo que constituye uno de los métodos de identificación de la cepa atenuada (1).

Solo se evidenció la presencia de CTB en el botón celular de la cepa recombinante. La expresión de CTB en dicha cepa se duplicó después de la inducción con IPTG.

A pesar de que se utilizó una construcción genética con promotor inducible, el hecho de que se

comprobara la expresión constitutiva es un elemento que justifica la utilización "in vivo" del vector recombinante.

Estudio de la respuesta inmune humoral contra CTB:

En este estudio se demostró que no existen diferencias significativas entre los subgrupos inmunizados en ninguna de las semanas después de la primera inmunización.

Otros grupos han obtenido respuestas de anticuerpos anti-CTB después de la administración de la misma cepa vacunal expresando CTB como proteína de secreción (13) y después de la administración de una cepa de *Salmonella dublin* expresando un epítotope de CTB insertado en la Flagelina (14). Sin embargo, en esos trabajos se utilizaron tres dosis del recombinante por vía intraperitoneal a diferencia de nuestro experimento en el cual se utilizó solo una dosis de inmunización.

Otro antígeno de *Vibrio cholerae* expresado en este sistema fue el lipopolisacárido, esta vacuna recombinante fue administrada a humanos, por vía oral, obteniéndose valores bajos de seroconversión (8).

Con la cepa *Salmonella typhi* Ty 21a expresando antígenos de *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* han sido inmunizados ratones demostrándose un efecto protector después del reto con la cepa salvaje (4,15).

Como se muestra en la Figura 1 se encontraron diferencias significativas ($p = 0$) de la respuesta anti-CTB con respecto al grupo no inmunizado, 15 días después de la reinmunización con CTB más AIF en los grupos inmunizados con el recombinante (OR, ER, IR). A los 21 días de la reinmunización con la cepa transformada, en los subgrupos inmunizados con la *Salmonella Typhi* recombinante, por las vías endovenosa e intraperitoneal (ER, IR) se obtuvo un aumento significativo ($p < 0.0001$) de la respuesta de anticuerpos con respecto al grupo no inmunizado (Figura 2).

Los resultados estadísticamente significativos obtenidos a los 15 días después de la reinmunización con CTB purificado más AIF (Figura 1) y 21 días después de la reinmunización con la cepa transformada (Figura 2) entre los animales inmunizados con el recombinante y el grupo no inmunizado pudieran interpretarse como una prueba indirecta del efecto sensibilizante sobre la respuesta inmune de la administración del recombinante en su primera dosis. Estos resultados pudieran considerarse

Cólera. Selección de Publicaciones

también como una demostración indirecta de la expresión "in vivo" de la proteína recombinante ya que en este experimento no fue estudiada, lo que se recomienda para trabajos futuros. A pesar de los resultados significativos obtenidos, debe tenerse en cuenta el tamaño muestral y la presencia de dispersión de los valores en los distintos subgrupos por lo que la demostración definitiva de estos aspectos dependen de la realización de experimentos futuros utilizando otros esquemas de inmunización con el empleo de dosis más elevadas del recombinante con una frecuencia mayor. La mayoría

de los trabajos realizados en este campo utilizan esquemas de inmunización con la administración de inóculos mayores en dosis repetidas independientemente del antígeno heterólogo expresado (1, 2, 4, 7, 14, 15, 16).

Otro aspecto a considerar, no abordado en el presente trabajo, es la evaluación de la respuesta secretoria de IgA anti-CTB en los animales inmunizados por la vía oral con el recombinante, lo que podría resultar de interés para el desarrollo de vacunas de nueva generación contra el Cólera.

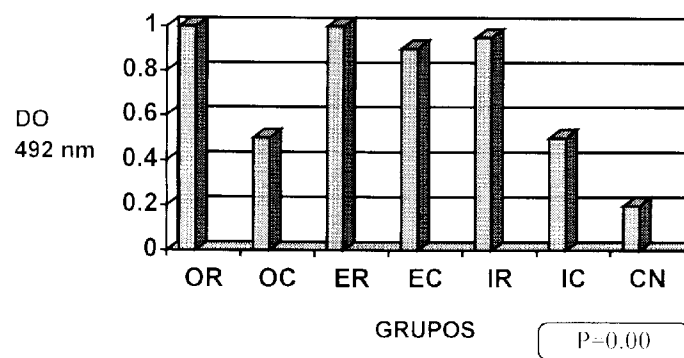


Figura 1: GM-1 ELISA. Respuesta de anticuerpos contra CTB 15 días post-reinmunización con CTB más AIF. Pares significativos: OR-CN; ER-CN; IR-CN.

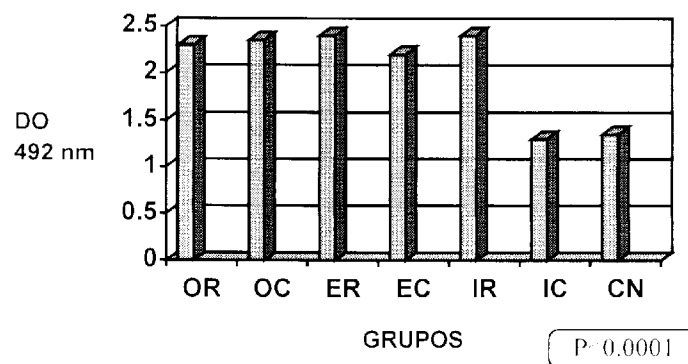


Figura 2: GM-1 ELISA. Anticuerpos contra CTB 21 días post-reinmunización con *Salmonella typhi* recombinante. Pares significativos: ER-CN; IR-CN.

Bibliografía

1. Germanier R, Furrer E. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: A candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *Journal Infect Dis* 1975; 131:553.
2. Levine MM. Clinical and fields trials with attenuated *Salmonella typhi* as live oral vaccines and a carrier vaccines. *Res Microbiol* 1990; 141: 807.
3. Hackett J. *Salmonella* based vaccines. *Vaccine* 1990; 8:5.
4. Formal SB. Construction of a potential bivalent vaccine strain: Introduction of *Shigella sonnei* Y antigens genes into the Gal E *Salmonella typhi* Ty 21a typhoid vaccine strain. *Infection and Immunity* 1981; 34(3): 746-750.
5. Clements JD, Morshidy S. Construction of a potential live oral bivalent vaccine for typhoid fever and cholera-*E. coli* related diarrheas. *Infect Immun* 1984; 46:564.
6. Curtiss R III, Goldschmidt, Pastian R, Lyons M, Mestecky J. Cloning virulence determinants form *Streptococcus mutans* and the use of recombinant clones to construct bivalent oral vaccine strains to confer protective immunity against *S. mutans*- induced dental caries. En: Hamada S, Michalek SM, Kiyono H, Menaker I, Mc Ghee JR; eds. *Molecular Microbiology and Immunology of Streptococcus mutans*. New York: Elsevier Publishers, 1986:173.
7. Manining PA. Avirulent salmonella expressing cloned vibrio genes as a potential bivalent typhoid cholera oral vaccine. En: Woodrow GC, Levine MM; eds. New York; Marcel Dekker Inc; 1990: 311-322.
8. Tacket CO. Safety, immunogenicity and efficacy against cholera challenge in humans of a Typhoid- cholera hybrid vaccine derived form *Salmonella typhi* Ty 21a. *Infection and Immunity* 1990; 58(6):1620-1627.
9. Acosta A. Comunicación personal.1995.
10. Martinez M, Hidalgo C, Finalet J, Estevez P, Acosta A, Sarmiento M, Aguila A, Arencibia I. Expresión de la subunidad B de la toxina del Cólera en *Escherichia coli* y *Vibrio cholera*. *Avances en Biotecnología Moderna* 1994;2:30.
11. Bridson EY. *The Oxoid Manual. Culture Media*, 2-1;2-235. England: Unipath Limited, 1990.
12. Holgrem J, Svennerholm AM. Enzyme Linked Immunosorbent Assays for cholera serology. *Infect Immun* 1973;7:753-757.
13. Burlein JE, Stover CK, Offut S, Hanson MS. Expression of foreign genes in mycobacteria. En: Bloom B; eds. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Washington: American Society for Microbiology, 1990:239-251.
14. Sacete M. Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella flagelin*. *Science* 1989;244(4):70-72.
15. Baron LS. Introduction of *Shigela flexneri* 2a type and group antigen genes into oral typhoid vaccine strain *Salmonella typhi* Ty 21a. *Infect Immun* 1987; 55(11):2795-2801.
16. Cao Y, Wen Z, Lu D. Construction of a recombinant oral vaccine against *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* 1992;60(7):2823-282.