

Marina Cunquero Navarro*. Grau en Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona (Cerdanyola del Vallès).
*marina.cn@gmail.com



Introducció al Mecanisme Infectiu i la Resposta Immune

La immunitat de *Shigella* és serogrup-específica tot i que de vegades fins i tot serotip-específica. Hi ha diverses molècules bacterianes conegudes com immunògens. Els principals són el lipopolisacàrid (LPS) i l'antigen O. El LPS és l'objectiu principal de la immunitat adaptativa mentre que l'antigen O (O-Ag) és l'objectiu de la resposta immune protectora. Els serotips de *Shigella* es defineixen per l'estructura de la unitat de repetició (RU) del O-Ag [4].

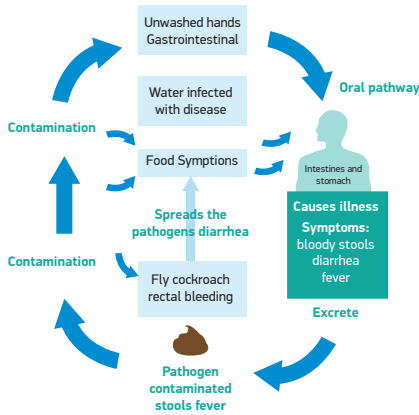


Figura 1. Esquema de la infecció per *Shigella* spp. La transmissió és fecal-oral. *Shigella* entra en el cos humà per ingestió d'aliments o aigües contaminades, arriba a l'estómac, passa per l'intestí prim i finalment arriba a l'intestí gruixut on establirà la infecció, principalment causant problemes al colon.

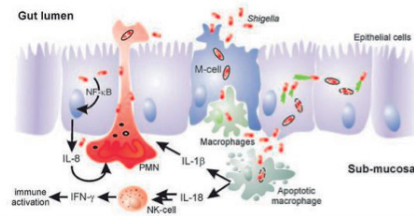
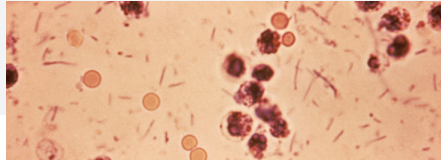


Figura 2 Patogènesi cel·lular de *S. flexneri*. El bacteri travessa la capa de cèl·lules epitelials de l'intestí per translocació a partir de les cèl·lules M. Es troba amb els macròfags i inducte la seva apoptosi. La posterior llisi allibera senyalització proinflamatori com IL-18 i IL-1β, entre d'altres. Aquestes activen la resposta immune innata involucrant els NK i atrauen els PMN. Finalment les PMN destrueixen el teixit epitelial al seu pas, cosa que augmenta la infecció en un principi, però finalment es resol fagocitant i matant els bacils de Shigella [5].

Shigella spp és un dels principals patògens, transmesos per aliments o aigües contaminades, que causen una de les malalties diarreiques més severes, la Shigel·losis. Principalment afecta nens menors de 5 anys en països en desenvolupament, tot i ser tractable i curable. L'existència de múltiples serotips i la emergència de soques resistents a antibiòtics requereix del desenvolupament d'una vacuna efectiva. S'ha vist que la producció de vacunes orals atenuades de *Shigella* confereix protecció creuada contra diferents serotips perquè molts comparteixen grups d'antigen. En aquest projecte s'examina la creació d'una nova vacuna atenuada oral de *S. flexneri* 2a que inclouria les mutacions: (i) *ΔguaBA*, que donaria lloc a una auxotrofia per l'amino àcid guanina, (ii) *ΔvirG*, incapacitant la transmissió a través de l'epiteli mucós de l'intestí, i (iii) *Δiuc*, que codifica per una aerobactina. La combinació d'aquestes mutacions donaria com a resultat una nova vacuna atenuada prometedora com a tractament profilàctic per la Shigel·losis.



Imatge 1. Tinció de Gram de *S. dysenteriae*. *Shigella* és un bacil Gram negatiu sense motilitat, anaeròbic facultatiu i intracel·lular que pertany a la família de les Enterobacteriaceae juntament amb *E.coli*. <http://www.gov.mb.ca/health/publichealth/diseases/shigella.html>



Imatge 2. Imatge presa amb microscopi electrònic de *S. dysenteriae*. *Shigella* spp presenta quatre serogrupos: (A) *S. dysenteriae*, (B) *S. flexneri*, (C) *S. boydii* i (D) *S. sonnei*. Amb excepció de *S. sonnei*, tots els serogrupos presenten diferents serotips, cosa que complica el desenvolupament de vacunes. http://www.cis-science.org/ph_57-Shigella_dysenteriae_Copyright_Dennis_Kunkel_Microscopy

Metodologia

Es proposa la producció d'una vacuna atenuada oral que presenta una nova combinació de mutacions que dona com a resultat una nova soca atenuada de *S. flexneri* 2a. Conté les següents mutacions: *ΔguaBA*, *ΔvirG* i *Δiuc*, totes elles delecions de gens que confereixen la capacitat infectiva del bacteri. A partir d'un sistema de doble selecció positiva i negativa es seleccionen les soques mutants (Diagrama 1). Les mutacions s'introdueixen per cassettes que contenen: (i) la resistència a kanamicina (Km^R), per la selecció positiva, (ii) regions flanquejants dels gens a deleccionar per doble recombinació, i (iii) el gen *rpsL^{WT}*, que dona lloc a la sensibilitat per l'estreptomicina (Sm^S) possibilitant la selecció negativa. Per tant, la soca de *S. flexneri* 2a haurà de ser *rpsL⁻* i, conseqüentment, estreptomicina resistent (Sm^R).

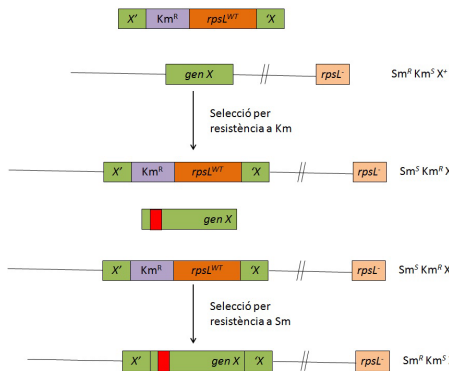


Diagrama 1 Diagrama del sistema de doble selecció positiva i negativa que es seguirà per l'obtenció dels mutants. *rpsL* i *rpsL^{WT}* representen, respectivament, una copia mutant del gen que confereix resistència a la estreptomicina (Sm^R) i una copia salvatge que dona lloc a la sensibilitat per l'estreptomicina (Sm^S). El sistema es basa en el fet que una cèl·lula merodiploide pel gen *rpsL* és Sm^S mentre que una cèl·lula *rpsL⁻* és Sm^R . Finalment, step by step, s'hauran introduït les mutacions desitjades per resistència a la kanamicina i després aquestes s'hauran eliminat [1], [2].

Una vegada creat el mutant s'avalua la seva estabilitat per cultiu en línia cel·lular HeLa i es confirmen els mutants per PCR i seqüenciació de la regió cromosòmica [6]. Després de la confirmació es mesura la capacitat immunogènica en ratolins BALB/c amb una dosi de vacuna oral diferent. Passats 35 dies de la immunització es duu a terme la infecció experimental intranasal a partir d'una dosi letal de 1×10^7 UFC de *S. flexneri* 2a crescuda en fase logarítmica i suspesa en PBS. El nombre de morts s'anota diàriament i es controla també el pes dels ratolins [8]. Es recullen mostres de sang i es mesura la resposta d'anticossos a partir d'un assaig ELISA en el qual es fixen O-Ag de la coberta de *S. flexneri* 2a que han sigut prèviament purificats per SDS-PAGE [7].

Beneficis

La creació d'una vacuna atenuada per l'infecció per *S. flexneri* 2a que combini les mutacions esmentades anteriorment permet obtenir una soca fortament atenuada que seria: (i) auxotrofa per l'amino àcid guanina (*ΔguaBA*), (ii) incapaç de difondre intra i intercel·lularment per l'epiteli (*ΔvirG*) i (iii) incapaç de captar el ferro (*Δiuc*).

La combinació d'aquestes mutacions ha sigut provada anteriorment i ha donat resultats significatius [3]. La seva combinació proporcionaria més seguretat en l'atenuació de la soca. Amb aquesta vacuna s'aconseguiria protecció creuada front diferents serotips, ja que *S. flexneri* comparteix grups d'antigen amb d'altres serotips. A més, l'aplicació oral proporciona molts avantatges, com la facilitat en l'administració.

Referències

- [1] J. Lederberg (1951). Journal Bacteriology. 61(5):549.
- [2] J.M. Rayat, V. Pelicic, B. Gicquel i R. Rappuoli (1998). Infection and Immunity. 66:4011-4017.
- [3] M.M. Levine (2000). Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 31:336-355.
- [4] A. Phalipon, L.A. Mulard i P.J. Sansonetti (2008). Microbes and Infection. 10:1057-1062.
- [5] G.N. Schroeder i H. Hilbi (2008). Clinical Microbiology Reviews. 21:134-156.
- [6] T.W.C. Grassel, M.M. Levine i E.M. Barry (2011). Infection and Immunity. 79:4912-4922.
- [7] A.I. Camacho, J. de Souza, S. Sánchez-Gómez, M. Pardo-Ros, J.M. Irache, C. Gamazo (2011). Vaccine. 29:8222-8229.
- [8] A.I. Camacho, J. Souza-Rebouças, J.M. Irache, C. Gamazo (2012). Methods. 1046-2023.