

VACUNACIÓ VERS *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÀGICA ATAcant A DUES DIANES



Silvia Herrezuelo Pellicer

Grau en microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona, juny 2013.

1. Antecedents

Escherichia coli enterohemorràgica (ECEH) és una malaltia zoonòtica causant de la colitis hemorràgica i del síndrome hèmeric hemolític (SUH). Això provoca brots on mor gent. A Espanya en el 2010 van haver 37 casos. Fins a l'actualitat, s'han provat vacunes per als bovins però sense els resultats que s'esperaven per això no han sortit vacunes.

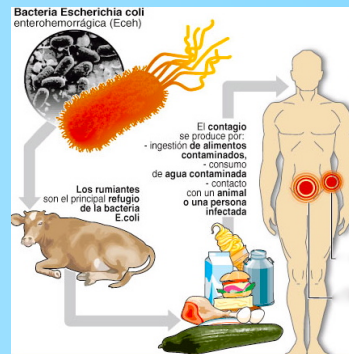


Fig.1. Procés de contaminació i intoxicació de ECEH

3.1 Pla de treball

Obtenció de la vacuna vers la Stx-2:

1. **Insert** del gen de *E.coli* O157:H7 que codifica per la Stx-2 a un primer plàsmid.
2. **Afegir** una cua de 6-histidines al gen i **insertar-lo** en el plàsmid pCR2.1 i es **transforma** en la soca de *E.coli* TOP10FO.
3. Per confirmar la seqüència, el DNA clonat s'extreu mitjançant enzims de restricció i es subclona en el plàsmid pBSK.
4. **Obtenció** del gen en el plàsmid anomenant-se pBSK-Stx2-His que es generarà el gen atenuat mStx2-His.
5. **Mutació** del gen Stx2-His → mStx2-His: Canvi de l'àcid glutàmic en la posició 167 i la arginina en la posició 170 de la subunitat A. (Mutació dirigida pel Kit QuicChange II i dos conjunts de cebadors.

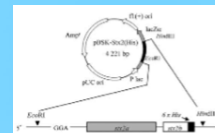


Fig.2 Plàsmid que obtenim finalment per produir la mStx2-His.

6. El plàsmid pBSK-mStx2-His es **transforma** en la soca *E.coli* MV1184.
7. **Incubació** de la soca durant 3 dies per la **producció** de la mStx2-His.
8. **Centrifugació** i **separació** mitjançant una columna d'afinitat per la obtenció de la proteïna.
9. Utilització de l'**adjuvant**: hidròxid d'alumini.
10. Assajos tant *in vitro* com *in vivo*.

3.2 Pla de treball

Obtenció de la vacuna vers la proteïna intimina:

1. **Amplificació** del gen eaeA des del plàsmid pEB310.
2. **Clonació** del gen dins del plàsmid pRB3.
3. **Transformació** en la soca de *Salmonella enterica* Dublin aroA::tet per electroporació.
4. Per la **comprovació**: **introducció** del gen amb una cua d'histidines al plàsmid pET16B. **S'expressa** i es **purifica** la intimina amb la cua d'histidines en una cromatografia.
5. Per aquesta vacuna **no s'utilitza adjuvant**.
6. La seva **preparació** és amb:
 - 950 ml de llet.
 - 50 ml de buffer, que conté una suspensió de:
 - 5% de trisilicat de magnesi.
 - 5% de bicarbonat sòdic.
 - 5% carbonat de magnesi.
 - 10^9 - 10^{10} CFU de *S.enterica* Dublin atenuada i expressant la intimina de *E.coli* O157:H7.
7. Assajos *in vivo*.

Vacunació



2. Hipòtesi i objectius

ECEH té varis factors de virulència com les *Shigella* toxin (Stx) i la intimina, que seran les dues dianes que atacaran les vacunes. De Stx hi ha dues: la Stx-1 i la Stx-2 que són les que provoquen la intoxicació de ECEH. En aquest cas, per la vacuna es treballarà amb la Stx-2. La intimina és una adhesina que ajuda a la adhesió del bacteri en el sistema digestiu. L'estratègia de la vacunació serà la neutralització amb anticossos específics. El fet de voler atacar a dues dianes és perquè es vol potenciar els resultats de les dues que s'havien fet per separat i d'atacar a diferents nivells per evitar tant la adhesió mitjançant la intimina com la intoxicació amb les Stxs.

4. Resultats esperats

Els resultats són esperançadors, ja que per la vacuna oral (la de la llet) s'espera una bona resposta, és a dir, que redueixi la colonització de ECEH al sistema digestiu. I per la vacuna vers la Stx-2 també s'esperen resultats positius. En aquest cas, el que es vol dur a terme és que dues vacunes que no havien donat resultats negatius per separat al posar-les en comú, els seus resultats siguin millors per als humans i com ataquen a dues dianes diferents que es troben a diferents nivells del procediment d'infecció del bacteri puguin funcionar millor. D'aquesta manera es podrien evitar brots i morts en la població.

5. Referències més importants

- Arimitsu, H., Sasaki, K., Shimizu, Takeshi, Tsukamoto, K., & Shimizu, Toshiyasu. (2013). Large scale preparation of Shiga toxin 2 in *Escherichia coli* for toxoid vaccine antigen production. *Laboratory Animals, (October 2012)*, 38--45. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.12004.x.
- Khare, S., Alali, W., Zhang, S., Hunter, D., Pugh, R., Fang, F. C., et al. (2010). Vaccination with attenuated *Salmonella enterica* Dublin expressing *E coli* O157 : H7 outer membrane protein Intimin induces transient reduction of fecal shedding of *E coli* O157 : H7 in cattle. *Genetic Testing*.
- Walle, K. V., Vanrompay, D., & Cox, E. (2012). Bovine innate and adaptative immune responses against *Escherichia coli* O157:H7 and vaccination strategies to reduce faecal shedding in ruminants. *Veterinary Immunology and Immunopathology. Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.028.