

C. Bienestar Animal, K. Patología y Sanidad o L. Jóvenes Investigadores SEA.

UNA NUEVA VACUNA ANTI-VIBRIO

C. Molina-Sorribes*¹, B. Ordoñez-Grande², E. Sanjuan¹, B. Fouz¹, N. Roher², C. Amaro¹

¹Instituto Universitario BIOTECMED, Universitat de València, 46100, Burjassot, Valencia, España

²Insitut de Biotecnología i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Valles, 08193, Barcelona, España

Abstract

Vibrio vulnificus is a zoonotic pathogen that causes death by septicemia in fish and humans. In fish, this ability resides in an immune resistance plasmid that has been transferred to other pathogenic vibrios. The aim of this work was to develop vaccine formulations based on common plasmid antigens that would be useful for the development of a multispecies acellular vaccine. We first obtained nanoparticles of each protein that were stable at temperatures up to 100°C and pH as low as 2. We then included them in feed and proceeded to immunize fish by oral intubation in three doses. The results obtained to date are promising since we found a significant increase in lysozyme activity and survival to infection in vaccinated animals 21 d after immunization.

Resumen

Vibrio vulnificus es un patógeno zoonótico que causa muerte por septicemia en peces y humanos. En los peces, esta capacidad reside en un plásmido de resistencia a la inmunidad que se ha transferido a otras especies patógena. El objetivo de este trabajo fue desarrollar formulaciones vacunales basadas en antígenos plasmídicos comunes que fueran útiles para el desarrollo de una vacuna acelular multiespecie. Lo primero que hicimos fue obtener nanopartículas de cada proteína que fueran estables a temperaturas de hasta 100°C y pH tan bajos como 2. A continuación las incluimos en pienso y procedimos a la inmunización de peces por intubación oral en tres dosis. Los resultados obtenidos hasta la fecha son prometedores puesto que encontramos un aumento significativo de la actividad lisozima y la supervivencia a la infección en los animales vacunados a los 21 d de la inmunización.

Introducción

Vibrio vulnificus (Vv) es un patógeno zoonótico ligado a la acuicultura considerado un biomarcador del cambio climático (Hernández-Cabanyero y Amaro, 2020). Esta especie está formada por múltiples linajes potencialmente virulentos para el hombre y una patovar virulenta para peces gracias a un plásmido que codifica resistencia a la inmunidad innata en sangre. Este plásmido ha sido transferido entre cepas de distintos linajes, así como entre cepas pertenecientes a otras especies patógenas de peces (Hernández-Cabanyero y Amaro, 2020; Carmona-Salido et al., 2021). El objetivo de este trabajo ha sido ensayar formulaciones vacunales a partir de dos antígenos plasmídicos comunes (genes *a1* y *a2*) que sirvieran de base para el desarrollo de una vacuna multi-especie que no solo previniese las enfermedades de los peces sino también controlara la transmisión de los genes de virulencia en piscifactorías y la emergencia de nuevas variantes zoonóticas. Lo primero que hicimos fue obtener nanopartículas de cada proteína que fueran estables a temperaturas de hasta 100°C y pH tan bajos como 2. A continuación procedimos a la inmunización de peces por intubación oral en tres dosis. Los resultados obtenidos hasta la fecha son prometedores puesto que encontramos un aumento significativo de la actividad lisozima y la supervivencia a la infección en los animales vacunados a los 21d de la inmunización.

Material y métodos

Formulaciones vacunales. Los genes *a1* y *a2* se clonaron en pET28a (*a1*) y pET303a (*a2*) y su expresión se realizó en *Escherichia coli* BL21 (*a2*) o BLR (*a1*) durante 4 o 2h a 37°C. Las proteínas se purificaron y caracterizaron de acuerdo con el protocolo de Rojas-Peñas et al. (2022).

Inmunización, actividad lisozima y protección. 5 grupos de 30 anguilas de 20g se inmunizaron por intubación oral con 3 dosis (0,1 mL/dosis) separadas 12 días. Las formulaciones se prepararon con las NPs de A1, A2 o A1+A2 (0,5 mg/mL) y se incluyeron dos grupos control (NPs de una proteína no inmunógena (iRFP) y H₂O). Se tomaron muestras de plasma a 0, 46 y 50 días del inicio del ensayo y se determinó la actividad lisozima por inhibición del crecimiento de *Micrococcus* sp. Finalmente la protección conferida se determinó los 21 d post-inmunización con grupos de 18 anguilas inmunizadas y control que se infectaron por inmersión con una dosis letal 90% (DL₉₀) de una cepa de Vv mediante el cálculo del porcentaje relativo de supervivencia a los 10 d de la infección (RPS).

Resultados y discusión

El rendimiento de la purificación fue de 251,53 (A1) y 122,05 mg/L (A2). Las proteínas agregaban formando NPs, que en el caso de A1 son esféricas ($\geq 90\%$) de un tamaño medio de $576\pm 203,9$ nm y en el caso de A2 son menos estructuradas lo que impidió su correcta caracterización. Ambas fueron resistentes a 100°C, 10min y a pH 2, 3h (Fig. 1A) lo que demuestra su utilidad en el desarrollo de piensos vacunales. La inmunización de las anguilas produjo un mantenimiento (A1+A2) o un aumento (A1 y A2) de la actividad lisozima a los 50 días, siendo mayor en el grupo inmunizado con A1 ($270,14\pm 5,54$ U/mL) siendo este efecto dependiente de antígeno y dosis (no efecto aditivo ni sinérgico) (Fig.1B). El ensayo de infección demostró que la administración de las NPs confiere protección frente a la vibriosis producida por Vv (fig. 1C y 1D). En conclusión, estas formulaciones vacunales constituyen una buena base para el desarrollo de una vacuna oral anti-vibrio multi-especie.

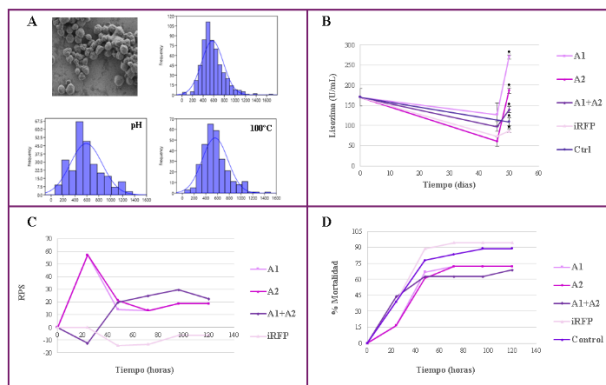


Figura 1. (A) i) Caracterización de las NPs A1. ii) Histogramas de la distribución de tamaños. iii) a pH2 iv) a 100°C. (B) Actividad lisozima del suero de anguilas vacunadas con diferentes NPs a lo largo del tiempo. (C) Monitorización diaria del RPS de los diferentes grupos durante el ensayo de infección. (D) Monitorización diaria de la mortalidad de los diferentes grupos durante el ensayo de infección. (*Diferencias significativas p-valor < 0'05).

Palabras Clave:

Vibriosis, nanopartículas, vacunación, protección.

Bibliografía

Hernández-Cabanyero, C., & Amaro, C. 2020. Phylogeny and life cycle of the zoonotic pathogen *Vibrio vulnificus*. *Environmental Microbiology*, 22(10): 4133–4148.

Rojas-pe, M., Aceituno, P., Salvador, M. E., Garcia-ordo, M., Teles, M., Ortega-villaizan, M. M., Perez, L., & Roher, N. 2022. How modular protein nanoparticles may expand the ability of subunit anti-viral vaccines: The spring viremia carp virus (SVCV) case. *Fish and Shellfish Immunology*, 131

Agradecimientos

THINKINAZUL/2021/027 de MCIN (Ministerio de Ciencia e Innovación de España) con fondos de European Union NextGeneration EU (PRTR-C17.I1) y GV (Generalitat Valenciana), PID2020-120619RB-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y CIAICO/2021/293 financiado por “Conselleria de Innovacion, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital” (GV, Spain). C. Molina-Sorribes con fondos de la subvención FDEGENT/2020/007.

Correo del Autor carla.molina@uv.es