

# UNITATS PRÀCTIQUES DE BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Anicet R. Blanch (Coordinador)

Núria Prim,  
Cristina García  
Ana Blanco  
Anicet R. Blanch

Departament de Microbiologia  
Facultat de Biologia



UNIVERSITAT DE BARCELONA



| TEXTOS DOCENTS |

326

# UNITATS PRÀCTIQUES DE BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Anicet R. Blanch (Coordinador)

Núria Prim,  
Cristina García  
Ana Blanco  
Anicet R. Blanch

Departament de Microbiologia  
Facultat de Biologia

**Publicacions i Edicions**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



# PRODUCCIÓ D'UNA VACUNA

## 1.Introducció

La **immunització activa** és aquella protecció contra malalties infeccioses que s'adquireix mitjançant la vacunació. L'any 1798 Edward Jenner introduí la noció d'una immunització sistemàtica a gran escala per tal de protegir del virus de la verola tot inoculant les persones amb el virus boví [1]. Una **vacuna** [llatí *vacca*, vaca] o **immunogen** és un preparat a partir d'un agent infecciós (ja sigui atenuat, inactivat o bé només un fragment antigènic d'aquest) que s'administra a un hoste per tal d'induir-li una resposta immunitària protectora com a mesura preventiva. Sovint es poden aïllar soques atenuades que han perdut la capacitat de virulència però conserven els antigens immunitzants. Pel que fa a la inactivació de les cèl·lules, normalment s'aconsegueix mitjançant tractament tèrmic o bé utilitzant compostos químics com ara el formaldehid o el fenol. El formaldehid també s'utilitza per inactivar virus, com és el cas de la *vacuna antipolio de Salk*. Cal tenir present que el grau d'immunització varia molt en funció de l'individu, del tipus de vacuna i de la seva dosificació i pauta d'administració. En general, la immunització amb cèl·lules vives atenuades o virus atenuats és més eficaç que la generada per cèl·lules mortes, ja que es produeix una resposta immunitària més llarga i eficaç (se sol donar tant a nivell cel·lular com humoral).

Considerant el tàndem benefici-risc i seguretat que ha de complir sempre una vacuna, hi ha dos requeriments fonamentals que ha de presentar: ser **eficaç** i alhora **innòcua**. Per tant, cal garantir l'estabilitat del preparat vacunal i eliminar-ne tots aquells compostos potencialment perillosos que s'hagin utilitzat durant la seva preparació. Addicionalment, es requeriran proves clíniques prèvies a la seva comercialització per tal de garantir l'absència d'efectes secundaris i controlar el binomi dosi-resposta immunitària. En el cas de les vacunes atenuades cal confirmar que no es produeixin revertents a la forma original patògena, i en les vacunes inactivades cal garantir una completa inactivació dels microorganismes.

La **vibriosi** és una malaltia septicèmica que es dona en animals aquàtics, especialment en aquelles espècies que es cultiven. La vibriosi és una de les causes de mortalitat més gran en piscicultura marina i és responsable de grans pèrdues econòmiques en piscifactories. Els agents etiològics de la malaltia són diferents espècies del gènere *Vibrio*, essent-ne *V. anguillarum* la causa més freqüent [2]. Altres espècies considerades també agents etiològics de vibriosi en peixos inclouen, entre d'altres, *V. salmonicida* i *V. vulnificus* serotip O2, *V. alginolyticus* i *V. ordalii* (actualment inclosa dins *V. anguillarum* serotip O2).

*V. anguillarum* va ser descrit el 1909 com l'agent causal de la pesta vermella en les anguilles, a la mar Bàltica [3]. Pertany al grup de vibris halòfils i sobreviu a diferents salinitats. Alguns estudis han mostrat que és capaç de sobreviure en aigua de mar durant més de 50 mesos [4,5]. Dins d'aquesta espècie actualment es diferencien 16 serovarietats [6] atenent bàsicament a antigens termoresistents (lipopolisacàrid).

El procediment rutinari per a la diagnosi de les vibriosis en els peixos es basa en l'aïllament i la identificació d'una determinada espècie del gènere *Vibrio* mitjançant **tests bioquímics i serològics**. Tanmateix, la caracterització mitjançant proves bioquímiques normalment s'allarga més temps del que hi ha disponible per poder identificar el tipus de vibri. Per tal d'evitar la mortalitat dels peixos de la piscifactoria, el diagnòstic etiològic s'ha de realitzar de la manera més ràpida possible. Això ha fet que s'hagin desenvolupat tests d'identificació serològics per a les espècies *V. anguillarum*, *V. ordalii*, i *V. salmonicida* [7,8,9]. En aquest sentit, també s'han desenvolupat **mètodes moleculars** que possibiliten una detecció molt específica en un període relativament curt de temps [9,10,11,12].

Durant les últimes dècades, l'interès s'ha centrat en la immunització dels animals com a profilaxi per evitar les vibriosis. La injecció de les vacunes per via intraperitoneal és probablement el mètode més eficaç i el que produeix un elevat grau d'immunitat. Ara bé, és car, laboriós, i produeix estrès al peix. Això ha fet que al llarg dels anys es desenvolupin i apliquin les vacunes administrades per bany o per via oral. Rohovec *et al* [13] van demostrar que liofilitzats de cèl·lules senceres inactivades amb formaldehid eren eficaços com a immunogen oral. Actualment la majoria de les vacunes utilitzades en cultius de peixos són vacunes inactivades [14].

## **2. Protocol de treball**

Aquesta pràctica es realitzarà majoritàriament en grups de dos persones.

L'objectiu d'aquesta pràctica és la preparació d'una vacuna de cèl·lules senceres inactivades contra *Vibrio anguillarum* serovarietat O1.

### **2.1. Identificació fenotípica del microorganisme**

#### **2.1.1. Tinció de Gram**

Aquesta tinció permet establir diferenciacions morfològiques i estructurals de la paret bacteriana i constitueix un important criteri taxonòmic. Vegeu l'annex 1 per a la realització de la tinció, i l'annex 3 per a la programació setmanal de les activitats que s'han de realitzar en aquesta pràctica.

En una placa de medi **TSA2** (TSA suplementat amb un 1.5 % de NaCl, per tant amb un 2 % de NaCl final) tenim un cultiu de la soca *V. anguillarum* AO18 (una placa per grup). Aquest microorganisme és el que inocularem per a la producció de la vacuna. En primer lloc, realitzarem una tinció de Gram a partir d'aquest creixement per tal de confirmar que estem treballant amb un cultiu pur i que el microorganisme que inocularem presenta les característiques morfològiques cel·lulars típiques del gènere *Vibrio* (bacils gramnegatius en forma de coma).

#### **2.1.2. Proves bioquímiques**

El procediment tradicional d'identificació bacteriana es basa en la realització de proves bioquímiques on podem valorar les característiques fenotípiques dels bacteris. Els resultats que s'obtenen ens permeten identificar la soca bacteriana consultant manuals de sistemàtica microbiana. Entre aquests, el més conegut, consolidat i utilitzat és el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [15], que té la seva primera edició l'any 1984. De manera molt adient, la segona edició d'aquest manual de sistemàtica microbiana [16] inclou també les característiques filogenètiques, basades fonamentalment en les seqüències del DNA que codifica per al 16S RNA ribosòmic.

Així doncs, d'acord amb els criteris de la taxonomia clàssica del "*Bergey's*", un cop realitzada la tinció de Gram i coneguda la morfologia cel·lular, i el tipus general de metabolisme (aerobi, anaerobi o facultatiu), cal realitzar altres proves per tal d'obtenir més informació sobre les característiques bioquímiques i fisiològiques del bacteri. En aquest sentit, inocularem una bateria de proves bioquímiques amb la soca *Vibrio anguillarum* AO18. La lectura dels resultats d'aquestes proves ens servirà per a la seva identificació a nivell d'espècie tot seguint les claus dicotòmiques que hi ha a l'annex 2 [17,18]. L'objectiu d'aquesta part de la pràctica és la confirmació que s'està treballant amb el microorganisme que ens interessa per a la producció de la vacuna (*V. anguillarum*).

## **Inoculació de les diferents proves bioquímiques a partir d'una placa de *V. anguillarum*:**

### **Oxidasa:**

Aquesta prova permet detectar la presència de la citocrom c oxidasa a la cadena de transport d'electrons. Sembrarem una placa de TSA2 realitzant una estria en escocès.

### **Creixement en TCBS:**

Aquest és un medi selectiu i parcialment diferencial per als vibris. Sembrarem una placa de TCBS realitzant una estria en escocès.

### **O/F:**

Ens permet conèixer la capacitat del microorganisme d'utilitzar un sucre (en aquest cas, glucosa) en presència i absència d'oxigen. Inocularem per picadura els dos tubs (un amb tap i l'altre sense tap de vaselina).

### **Arginina deshidrolasa (ADH):**

Detecta la presència d'aquest enzim.

### **Lisina descarboxilasa (LDC):**

Detecta la presència d'aquest enzim.

### **Ornitina descarboxilasa (ODC):**

Detecta la presència d'aquest enzim.

Les proves de l'arginina (ADH), lisina (LDC) i ornitina (ODC) s'han de realitzar en anaerobiosi, per aquest motiu els tubs porten un tap de vaselina. Els tres tubs s'inocularan per resuspensió del creixement en el medi líquid.

### **Creixement en aigua peptonada alcalina amb un 0 % de NaCl:**

Aquesta prova permet veure si aquest microorganisme és capaç de créixer en absència de NaCl. S'inocula per resuspensió.

### **Indol:**

Permet detectar la presència de l'enzim triptofanasa. S'inocula per resuspensió.

### **Arabinosa:**

Permet detectar la producció d'àcid a partir d'arabinosa. Abans d'inocular per resuspensió, cal afegir arabinosa estèril a l'1 % final (estoc estèril al 10 %). S'inocula per resuspensió.

### **Gelatinasa:**

Serveix per determinar si el microorganisme és capaç de degradar la gelatina. S'inocula per picadura.

### **Voges-Proskauer:**

És una prova per determinar si el microorganisme utilitza la via de fermentació del 2,3-butilè-glicol. S'inocula per resuspensió.

### **Creixement en medi VAM:**

Aquest és un medi selectiu i diferencial per a *V. anguillarum*. Realitzarem una estria en escocès.

La incubació de tots els medis inoculats en aquesta bateria de proves bioquímiques s'ha de fer a 20-22°C (temperatura ambient, TA), durant 24-48 hores.

### **Lectura de les proves bioquímiques:**

Al cap de 24 hores (dimecres, segons la programació d'activitats que s'indica en l'annex 3) llegirem únicament les proves bioquímiques de lectura directa i també el Voges-Proskauer tot i ser de lectura indirecta. Aquelles proves de lectura directa que siguin negatives al cap de 24 hores les deixarem incubant 24 hores més (fins dijous, segons l'annex 3) per tal de confirmar el resultat negatiu. Les proves de lectura indirecta les deixarem incubant 48 hores abans de fer-ne la lectura, excepte la prova del Voges-Proskauer ja que, d'acord amb el “*Bergey's*” [16], cal fer-ne la lectura al cap de 24 hores.

#### **TCBS:**

És una prova de lectura directa. El creixement en aquest medi i el viratge a color groc indiquen que es tracta d'un vibri, encara que es requereixen d'altres proves per poder confirmar-ho.

#### **O/F:**

És una prova de lectura directa. El viratge a color groc en els tubs indica la capacitat d'utilitzar el sucre. S'ha de fer la lectura dels dos tubs. Segons els resultats podem definir si el microorganisme és:

|                       |
|-----------------------|
| +/- Aerobi estricte   |
| -/+ Anaerobi estricte |
| +/+ Aerobi facultatiu |

#### **ADH, LDC, ODC:**

La lectura d'aquestes proves és directa. En primer lloc s'observa un viratge a groc causat per la utilització de la glucosa, però després s'observa un viratge cap a porpra si es dona la descarboxilació, ja que es produeix una alcalinització del medi de cultiu.

#### **Creixement en 0 % NaCl:**

És una prova de lectura directa. S'ha d'observar la presència o absència de creixement per un augment de la terbolesa.

#### **Arabinosa:**

És una prova de lectura directa. Si la prova és positiva s'observa un viratge de l'indicador i el medi queda de color groc.

#### **Gelatinasa:**

La prova es considera positiva quan s'observa una liquació del medi a temperatures a les quals la gelatina és sòlida (< 20°C).

#### **Oxidasa:**

Per llegir aquesta prova es diposita una mica de creixement bacterià (placa de TSA2) amb un escuradent estèril damunt un paper de filtre i s'hi afegixen unes gotes del reactiu di-tetra-metil-*para*-fenilen-diamina. Com a control negatiu es pot repetir el mateix utilitzant una soca d'*E. coli* de col·lecció. Un viratge a color negre o roig fosc d'aparició gairebé immediata indica que la prova és positiva. No llegiu la prova gaire més tard després d'afegir el reactiu ja que aquest s'oxida fàcilment i podria donar un fals positiu.

#### **Indol:**

La prova és de lectura indirecta. Cal afegir-hi unes gotes de reactiu de Kovacs. L'aparició d'un anell rosat a la superfície indica que la prova és positiva.

#### **Voges-Proskauer:**

És una prova de lectura indirecta. S'han d'afegir al medi dos reactius: KOH al 40 % (unes gotes) per alcalinitzar el medi i µl-naftol (1 ml). A continuació, s'ha

d'agitar el tub per facilitar l'aireig. L'aparició d'una coloració rosada implica que la prova és positiva.

#### VAM:

Les colònies de *Vibrio anguillarum* són grogues en aquest medi per l'acidificació produïda per la utilització del sorbitol com a font de carboni.

### 2.1.3. Caracterització serològica

Part de la immunogenicitat de *V. anguillarum* es basa en la presència d'un lipopolisacàrid termoestable a la paret cel·lular [7]. Concretament, les serovarietats O1, O2 i O3 són les que normalment estan associades a brots de vibriosis en peixos marins, essent la més freqüent la serovarietat O1 seguida de la O2 i O3, respectivament [6]. El lipopolisacàrid consta de 3 regions diferenciades: el lípid A, el nucli i l'antigen somàtic O, format per  $n$  cadenes d'un polisacàrid. L'especificitat d'aquest depèn del nombre i estructura d'aquestes cadenes laterals i, a més a més, aquest condiciona la virulència dels bacteris gramnegatius patògens. Així doncs, la determinació de l'antigen O pot ser important per al diagnòstic de les espècies patògenes.

L'objectiu de la caracterització serològica que aquesta pràctica proposa és comprovar la presència de l'antigen O1 en la soca de *Vibrio anguillarum* A018, soca amb la qual volem fer la vacuna, mitjançant la realització d'un **immunoblot**.

Protocol de treball: Aquesta pràctica la realitzarem en grups de dos persones. Partirem de la mateixa placa anterior que conté el cultiu de *V. anguillarum* en TSA2 i realitzarem una estria amb un escuradents estèril damunt d'una membrana de nitrocel·lulosa, que prèviament haurem col·locat damunt una placa de TSA2 (dimarts, segons l'annex 3). Com a control negatiu realitzarem una estria al costat amb la soca de *V. harveyi* CECT525. Les dues estries les deixarem incubant a una temperatura de 20-22°C (TA, temperatura ambient), durant 24 hores.

A continuació, procedirem amb el protocol de detecció (dimecres, segons l'annex 3). La composició i el procediment de preparació dels reactius i de les solucions s'indica en l'annex 1. Tots els passos es realitzaran a TA i en agitació si no s'indica quelcom diferent:

- Traurem la membrana i la incubarem damunt paper Whatman saturat amb tampó TBS 1x durant 5 minuts en condicions estàtiques amb la cara de la membrana on tenim les cèl·lules cap amunt.
- Fixarem la membrana a 37°C durant 10 minuts (o fins que estiguin seques les estries).
- Bloquejarem la membrana amb una solució de 3 % de BSA en tampó TBS 1x, durant 45 minuts.
- Rentarem la membrana amb 1 % de BSA en tampó TBS 1x durant 10 minuts.
- Incubació de la membrana amb l'anticòs específic anti-O1 (anticòs primari) diluït 1:1000 en una solució a l'1 % de BSA en TBS 1x, durant 30 minuts.
- Es realitzaran tres rentats consecutius de 5 min amb TBS-Tween 1x.
- Seguidament incubarem durant 30 minuts amb l'anticòs secundari (anticòs de cabra contra IgG de conill), el qual es diluirà 1:1000 en una solució a l'1 % de BSA en TBS 1x. Aquest anticòs secundari es troba conjugat amb la fosfatasa alcalina per tal de facilitar-ne la detecció.
- A continuació, es realitzaran tres rentats consecutius de 5 min amb TBS-Tween 1x.
- Incubarem la membrana amb el tampó 3 de revelat durant 5 minuts.
- Les membranes es revelaran a les fosques i de manera estàtica amb NBT-BCIP (diluït 1:50 en tampó 3 de revelat). La reacció enzimàtica s'aturarà als 10 segons aproximadament (o fins que aparegui coloració) tot realitzant rentats amb H<sub>2</sub>O destil·lada.

## 2.2.Producció de la vacuna

### 2.2.1.Cultiu de *V. anguillarum* per a l'elaboració de la vacuna

En aquesta pràctica, la preparació de l'inòcul només constarà d'un pas. Cal dir que en un procés industrial normalment s'utilitza un inòcul aproximadament d'un 10 % del volum final de la fermentació, i sovint s'ha d'anar augmentant successivament el volum de l'inòcul fins arribar al volum final de fermentació desitjat. Aquest procés és l'anomenat *escalat*.

Iniciarem el cultiu per a la producció d'una vacuna a partir d'una placa de TSA2 on tenim crescuda la soca *V. anguillarum* AO18. En l'annex 3 podem consultar la programació setmanal de les activitats d'aquesta pràctica.

#### Cultiu inicial de *V. anguillarum*:

S'inoculen 10 ml de TSB2 (TSB+1.5 % NaCl, és a dir, amb un 2 % de NaCl final) amb la soca *V. anguillarum* AO18. S'incuba 24 hores a 20°C en un incubador amb agitació.

#### Continuació de l'escalat:

Al cap de 24 hores, s'inocularan 200 ml de TSB2 (preparat en un matràs Erlenmeyer de 500 ml) utilitzant com a inòcul tot el cultiu (10 ml) de la soca AO18 crescuda en TSB2. Cada matràs Erlenmeyer s'inocularà amb els cultius de dos grups. S'incubaran a 20°C amb agitació durant 24 hores.

### 2.2.2.Enumeració de cèl·lules viables del cultiu

#### Tinció de Gram

Al cap de 24 hores i en primer lloc, comprovarem la puresa del cultiu mitjançant la realització d'aquesta tinció. S'ha de tenir en compte que la tinció de Gram no és suficient per comprovar la puresa. S'haurien de repetir tota la sèrie de proves bioquímiques en el nostre cas o aquelles proves (enzimàtiques, immunològiques, etc.) que permetin determinar la puresa del cultiu i confirmar la dotació antigènica d'interès. No es fa en aquesta pràctica per la limitació de temps.

#### Sembra d'un banc de dilucions per a l'enumeració de cèl·lules viables en TSA2

- A partir del cultiu de 200 ml de *V. anguillarum*, realitzarem un banc de dilucions decimals en PBS salí i sembrarem 100 µl l de les diferents dilucions ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  i  $10^{-7}$ ) en TSA2, si és possible per duplicat. Això ens permetrà determinar el nombre de microorganismes en el cultiu que utilitzarem per a la producció de la vacuna.
- Sembrarem també 100 µl l del cultiu directe i 100 µl l de la dilució  $10^{-2}$  en plaques del medi VAM. D'aquesta manera comprovarem que totes les colònies són grogues perquè utilitzen el sorbitol que porta el medi com a font de carboni principal.
- Incubarem totes les plaques durant 24-48 hores a 20°C.
- L'endemà (divendres, segons l'annex 3) realitzem un recompte de cèl·lules cultivables totals procedents del cultiu de *V. anguillarum*.

La realització d'una enumeració de cèl·lules viables (cultivables) ens permetrà tenir una idea aproximada de la càrrega antigènica que tindria el nostre preparat vacunal. Alternativament, es podria fer una enumeració de cèl·lules totals utilitzant per exemple la tècnica de l'epifluorescència, o bé una mesura del pes sec o bé una valoració antigènica. Aquests valors els podríem relacionar amb el patró de cèl·lules totals. Aquest pas ens dóna una referència quantitativa del cultiu per poder valorar posteriorment la concentració antigènica de la vacuna.

### 2.2.3. Tractaments d'inactivació del cultiu

#### La concentració del cultiu

Sovint la concentració final que ens interessa en la composició de la vacuna no és la mateixa que obtenim en el cultiu. Per ajustar la concentració realitzarem una separació de les cèl·lules cultivades per centrifugació, i llavors les resuspendrem en un tampó fins a la concentració desitjada. En aquesta pràctica ho concentrarem 10 vegades (200 ml de cultiu ens quedaran en 20 ml finals). Si hi ha algun component antigènic extracel·lular que s'acumula en el sobrenedant, hauríem de considerar la recuperació d'aquest producte del sobrenedant perquè formés part de la composició de la vacuna, o bé utilitzar el mateix sobrenedant per resuspendre les cèl·lules. Prèviament caldria comprovar si hi ha algun efecte tòxic d'aquest sobrenedant.

#### Inactivació del cultiu:

Repartirem els 20 ml del concentrat en vuit tubs per a cada grup de quatre alumnes (dijous, segons l'annex 3). Quatre tubs seran de plàstic i quatre de vidre amb tap de rosca. Amb aquest material es realitzarà la inactivació per obtenir la vacuna.

Es realitzaran dos tipus d'inactivació:

- 1) **Tractament químic:** afegirem, respectivament, 0.001 %, 0.01 %, 0.1 % i 1 % de formaldehid als tubs de plàstic on teníem els 2.5 ml (aproximadament) del concentrat. Ho incubarem durant 30 minuts a temperatura ambient. Fem una comprovació de l'absència de creixement sembrant per extensió 100 µl de cada tub en una placa de TSA2. Ho incubarem durant 24 hores a temperatura ambient.
- 2) **Tractament físic:** els tubs de vidre amb els 2.5 ml del concentrat es posaran en un bany a 100°C durant diferents temps d'exposició: 1, 3, 5 i 10 minuts. Evidentment en aquest cas només mantindrem en la nostra vacuna els antígens termoestables. Fem una comprovació de l'absència de creixement sembrant per extensió 100 µl de cada tub en una placa de TSA2. Ho incubarem durant 24 hores a temperatura ambient.

### 2.2.4. Comprovació de la inactivació

Cal fer (divendres, segons l'annex 3) una comprovació de l'absència de creixement en les vuit plaques sembrades el dia abans (una per cada tub on varen realitzar la inactivació amb diferents tractaments). Valorarem quines serien les condicions més adients d'inactivació tenint present que és important assegurar que el preparat vacunal és innocu i per tant no hauria de quedar ni una sola cèl·lula viable.

Cal tenir present que aquesta pràctica s'atura en un punt molt preliminar del que seria el procés d'elaboració d'una vacuna. Així doncs, caldria realitzar a *posteriori* proves addicionals per garantir que la vacuna és innòcua (i.e. absència de reaccions al·lèrgiques o absència de revertents en el cas de vacunes atenuades), proves per determinar-ne la dosi, la via d'administració més adient, etc.

### 3. Pautes per a l'avaluació dels resultats i revisió de conceptes

- a. Defineix un medi *selectiu* i un medi *diferencial*. D'acord amb això, com consideraries el medi VAM que s'utilitza en aquestes pràctiques per al creixement de les soques de *Vibrio*? Per què?
- b. Per què creus que és necessari utilitzar un medi selectiu per poder detectar determinats bacteris a partir d'una mostra molt contaminada (per exemple, una mostra procedent d'una piscifactoria o bé d'aigües residuals)?
- c. Un cop obtingut el cultiu pur del bacteri, en quin format s'utilitzen habitualment en microbiologia clínica les proves bioquímiques per a la identificació de l'agent etiològic d'una malaltia infecciosa?
- d. Què és una vacuna? Quins tipus de vacunes coneixes? Dóna'n un exemple de cada tipus.

- e. Tots els immunògens són antígens però no tots els antígens són immunògens. Raona i justifica aquesta afirmació.
- f. Descriu les principals diferències entre vacunes atenuades i inactivades. Quin tipus de vacuna, atenuada o inactivada induiria *a priori* una immunitat cel·lular més sòlida? Per què?
- g. Tenint presents els vostres resultats d'inactivació de *V. anguillarum*, quines condicions concretes d'inactivació química i quines condicions d'inactivació tèrmica escolliríeu per a la producció aquest preparat vacunal? En general, quin tractament d'inactivació, químic o físic (tèrmic), creus que és millor? Per què?
- h. Creus que es pot en tots els casos utilitzar ambdós mecanismes d'inactivació (químic i tèrmic) indistintament? De què depèn? Quin tipus de tractament aplicaries per fer una vacuna de cèl·lules inactivades si volem mantenir la immunogenicitat d'un antigen proteic present a la membrana externa? I si l'antigen immunogen és l'LPS?
- i. Quina és la importància del serotipatge?
- j. Per a què serveix l'escalat en la producció a nivell industrial?

#### 4.Referències

- [1] PLOTKIN, S.L., PLOTKIN, S.A. 1999. A short history of vaccination. In «Vaccines» third edition, S.A. Plotkin and W.A. Orenstein, Eds., pp. 1-12. Philadelphia, Saunders.
- [2] WOO, P.T.K., LEATHERLAND, J.F., BRUNO, D.W. 1999. Fish diseases and disorders. CAB International, Wallingford, UK.
- [3] BERGMAN, A.M. 1909. Die rote Beulenkrankheit des Aals. Ber. Kgl. Bayer. Biol. Versuchssta. München 2:10-54.
- [4] HOFF, K.A. 1989. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities. Appl. Environ. Microbiol. 55:1775-1786.
- [5] ENGER, O., HOFF, K.A., SCHEI, G.H., DUNDAS, I. 1990. Starvation survival of the fish pathogenic bacteria *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* in marine environments. FEMS Microbiol. Ecology 74:215-220.
- [6] GRISEZ, L., OLLEVIER, F. 1995. Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol. 61:4367-4373.
- [7] CHART, H., TRUST, T.J. 1984. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. Can. J. Microbiol. 30:703-710.
- [8] CIPRIANO, R.C., PYLE, J.B., STARLIPER, C.E. PYLE, S.W. 1985. Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by the dot blot assay. J. Wildl. Dis. 21:211-218.
- [9] GONZALEZ, S.F., OSORIO, C.R., SANTOS, Y. 2004. Evaluation of the AQUARAPID-Va, AQUAEIA-Va and dot-blot assays for the detection of *Vibrio anguillarum* in fish tissues. J Fish Dis. 27(11):617-621
- [10] SPARAGANO, O.A., ROBERTSON, P.A., PURDOM, I., MCINNES, J., LI, Y., YU, D.H., DU, Z.J., XU, H.S., AUSTIN, B. 2002. PCR and molecular detection for differentiating *Vibrio* species. Ann N Y Acad Sci. 969:60-65.
- [11] MARTINEZ-PICADO, J., ALSINA, M., BLANCH, A.R., CERDA, M., JOFRE, J. 1996. Species-specific detection of *Vibrio anguillarum* in marine aquaculture environments by selective culture and DNA hybridization. Appl Environ Microbiol. 62(2):443-449.
- [12] JI, N., PENG, B., WANG, G., WANG, S., PENG, X. 2004. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. J Microbiol Methods. 57(3):409-13.

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDIX .....                                                                                                                            | 5  |
| PRODUCCIÓ D'UNA VACUNA .....                                                                                                           | 7  |
| 1.Introducció .....                                                                                                                    | 7  |
| 2.Protocol de treballº .....                                                                                                           | 8  |
| 2.1.Identificació fenotípica del microorganisme .....                                                                                  | 8  |
| 2.1.1.Tinció de Gram .....                                                                                                             | 8  |
| 2.1.2.Proves bioquímiques .....                                                                                                        | 8  |
| 2.1.3.Caracterització serològica .....                                                                                                 | 11 |
| 2.2.Producció de la vacuna .....                                                                                                       | 12 |
| 2.2.1.Cultiu de <i>V. anguillarum</i> per a l'elaboració de la vacuna .....                                                            | 12 |
| 2.2.2.Enumeració de cèl·lules viables del cultiu .....                                                                                 | 12 |
| 2.2.3.Tractaments d'inactivació del cultiu .....                                                                                       | 13 |
| 2.2.4.Comprovació de la inactivació .....                                                                                              | 13 |
| 3.Pautes per a l'avaluació dels resultats i revisió de conceptes .....                                                                 | 13 |
| 4.Referències .....                                                                                                                    | 14 |
| DISSENY D'UNA SONDA ESPECÍFICA PER A LA DETECCIÓ DE <i>Vibrio anguillarum</i> .....                                                    | 17 |
| 1.Introducció .....                                                                                                                    | 17 |
| 2.Protocol de treball .....                                                                                                            | 18 |
| 2.1 Estudi i disseny teòric de la sonda .....                                                                                          | 18 |
| 2.1.1.Determinació d'un oligonucleòtid com a sonda específica .....                                                                    | 18 |
| 2.1.2.Anàlisi de l'especificitat de la seqüència proposada .....                                                                       | 20 |
| 2.2.Avaluació experimental de la sonda: Hibridació colonial .....                                                                      | 20 |
| 2.2.1.Cultiu de soques bacterianes per a l'avaluació de l'especificitat de la sonda .....                                              | 20 |
| 2.2.2.Hibridació colonial .....                                                                                                        | 21 |
| 3.Pautes per a l'avaluació dels resultats i revisió de conceptes .....                                                                 | 22 |
| 4.Referències .....                                                                                                                    | 23 |
| AÏLLAMENT I CULTIU DE MICROORGANISMES DEGRADADORS D'HIDROCARBURS ..                                                                    | 25 |
| 1.Introducció .....                                                                                                                    | 25 |
| 2.Protocol de treball .....                                                                                                            | 26 |
| 2.1.Aïllament de soques degradadores de naftalè i de fluorè .....                                                                      | 26 |
| 2.2.Comprovació de la capacitat degradativa d'una soca de col·lecció degradadora de naftalè .....                                      | 27 |
| 2.3.Caracterització fisiològica d'una soca de col·lecció degradadora de naftalè en relació amb la utilització d'altres compostos ..... | 28 |
| 3.Pautes per a l'avaluació dels resultats i revisió de conceptes .....                                                                 | 29 |
| 4.Referències .....                                                                                                                    | 29 |
| ANNEX 1. TINCIONS, MEDIS I SOLUCIONS .....                                                                                             | 31 |
| ANNEX 2. CLAUS DICOTÒMIQUES PER A LA IDENTIFICACIÓ DE <i>Vibrio</i> spp .....                                                          | 37 |
| ANNEX 3. PROGRAMACIÓ SETMANAL DE LES TRES UNITATS PRÀCTIQUES .....                                                                     | 39 |
| ANNEX 4: LECTURES PER COMENTAR .....                                                                                                   | 41 |
| ANNEX 5. SEQÜÈNCIES DE LES ESPÈCIES DE <i>Vibrio</i> QUE S'UTILITZEN EN LES PRÀCTIQUES D'ORDINADOR46                                   |    |
| ANNEX 6. INFORMACIÓ ADDICIONAL PER AL PROFESSORAT .....                                                                                | 53 |
| 6.1.Relació del material necessari per a les unitats pràctiques de biotecnologia .....                                                 | 53 |
| 6.2.Llistat de productes necessaris per a les pràctiques .....                                                                         | 54 |
| 6.3.Manipulació de <i>Vibrio anguillarum</i> i resultats dels blocs 1 - 2 .....                                                        | 55 |
| 6.3.1.Proves bioquímiques de <i>Vibrio anguillarum</i> .....                                                                           | 55 |
| 6.3.2.Hibridació colonial per <i>Vibrio anguillarum</i> .....                                                                          | 56 |
| 6.4.Manipulació de microorganismes degradadors d'hidrocarburs .....                                                                    | 57 |

- [13] ROHOVEC, J., GARRISON R.L., FRYER, J.L. 1975. Immunization of fish for the control of vibriosis. Pages 105-112 *in* Proceedings of the third U.S.-Japan meeting on aquaculture, 15-16 October 1974, Tokyo.
- [14] ADAMS, A., THOMPSON, K.D. 2006. Biotechnology offers revolution to fish health management. *Trends in Biotechnology* **24**:201-205.
- [15] HOLT, J.G. (Ed. in chief). 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore
- [16] GARRITY, G., BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.R. (Eds.). 2005. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Volume 2: The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria. Springer 2a edició. 1108 pp.
- [17] ALSINA, M., BLANCH, A.R. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* **76**: 79 - 85.
- [18] ALSINA, M., BLANCH, A.R. 1994. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* **77** (6): 719 - 721.

### Per saber-ne una mica més

BLOOM, B.R., LAMBERT, H. 2003. *The Vaccine Book*. Academic press, UK.

THOMPSON, F.I., AUSTIN, B., SWINGS, J. (Eds) 2006. *The Biology of Vibrios*. ASM Press. Washington DC.