(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 139 549**

(21) Número de solicitud: 009801549

(51) Int. Cl.[6]: C12N 1/20
A61K 39/02
C12N 1/36
//(C12N 1/20
C12R 1:63)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **22.07.1998**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2000**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **01.02.2000**

(71) Solicitante/s: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**
Centro de Innovación e Transferencia de Tecnoloxía
Avda. das Ciencias, s/n
15706 Santiago de Compostela
A Coruña, ES

(72) Inventor/es: **Santos Rodríguez, Ysabel y Pazos Álvarez, Francisco**

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Vacuna anti-*Flexibacter maritimus* (FM-95) para la prevención de la enfermedad "flexibacteriosis marina" en rodaballo y peces salmónidos, y procedimiento de obtención.**

(57) Resumen:
Procedimiento de obtención de la vacuna FM-95 anti-*Flexibacter maritimus* para la prevención de la enfermedad flexibacteriosis marina producida por la bacteria *Flexibacter maritimus* en rodaballo y peces salmónidos cultivados en agua de mar. El procedimiento se caracteriza por incluir en la vacuna las células bacterianas inactivadas con formol de una cepa de *Flexibacter maritimus* aislada de rodaballo (Cepa depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con la referencia CECT 5045). La vacuna puede ser administrada por inyección y confiere a los peces niveles eficaces de protección frente a la flexibacteriosis marina.

ES 2 139 549 A1

DESCRIPCION

Vacuna anti-*Flexibacter maritimus* (FM-95) para la prevención de la enfermedad "flexibacteriosis marina" en rodaballo y peces salmónidos, y procedimiento de obtención.

Vacuna anti-*Flexibacter maritimus* (FM-95) para la prevención de la enfermedad "flexibacteriosis marina" en rodaballo y peces salmónidos cultivados en agua de mar, y procedimiento de obtención. La vacuna está compuesta por células formolizadas de una cepa de *Flexibacter maritimus* aislada de rodaballo. Esta vacuna confiere un elevado grado de protección (mayor al 90 %) frente a las cepas de *Flexibacter maritimus* (serotipo O2) causantes de mortalidades en peces cultivados.

La flexibacteriosis marina, causada por la especie *Flexibacter maritimus* es una de las enfermedades bacterianas más importantes que afectan a peces marinos a nivel mundial. Esta enfermedad fue diagnosticada por primera vez en Galicia en el año 1991 (Pazos *et al.* 1993. FHS/AFS Newslett. 21 (3): 1-2) en rodaballos y salmones cultivados, convirtiéndose desde entonces en uno de los principales problemas para la piscicultura marina de nuestra área y causando importantes pérdidas económicas. El aislamiento del microorganismo fue posible gracias al empleo del medio para *Flexibacter maritimus* (FMM) diseñado en nuestro laboratorio (Pazos *et al.* 1996. Journal of Fish Diseases, 19: 193-197). El tratamiento de la flexibacteriosis marina con antibióticos no ofrece resultados satisfactorios y en la actualidad no existen vacunas comerciales para prevenir la enfermedad (Pazos *et al.* 1997. International Workshop on Aquaculture Application of Controlled Drug and Vaccine Delivery. Villa Manin di Pasariano. Italia. p. 49).

La cepa de *Flexibacter maritimus* empleada en esta vacuna es el aislado LPV 1.7 (serotipo O2) y está depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con la referencia CECT 5045. Esta cepa presenta las características típicas de la especie, siendo bacilos filamentosos Gram-negativos, oxidasa y catalasa positivos, reductores de nitratos, productores de glucano-galactosamina e incapaces de producir ácido sulfhídrico. Son además negativos para las pruebas del indol, rojo de metilo y Voges-Proskauer. La especie *Flexibacter maritimus* constituye un grupo homogéneo desde el punto de vista bioquímico y fisiológico. Sin embargo, se ha detectado la existencia de variabilidad serológica y genética Santos et al. 1998. ICES Leafletts. En prensa). Las proteínas y lipopolisacáridos (LPS) de la envoltura celular de esta especie son inmunogénicos para rodaballo y peces salmónidos (Pazos *et al.* 1997. VII International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. European Association of Fish Pathologists. Edimburgo, Reino Unido. p. 73).

Preparación

A partir del preinóculo bacteriano en fase logarítmica de crecimiento se inoculan matraces de dos litros conteniendo un litro de medio de cultivo caldo FMM (peptona 5 g/L; extracto de levadura 0,5 g/L; acetato sódico 0,01 g/L; agua de mar 1 L; pH 7,3 $\pm$ 0,1).

La incubación se realiza a 25 °C durante 72 horas. Finalizado el período de incubación, se añade formol a una concentración final de 0,35 % para matar las bacterias, y se mantiene durante tres horas más en agitación, al cabo de las cuales se transfiere a 4 °C. Después de 12 horas se centrifuga el cultivo (10.000 rpm durante 30 min.), se desecha el sobrenadante, y el precipitado celular se resuspende en tampón fosfato salino (PBS, cloruro sódico, 8 g/L; cloruro potásico 0,3 g/L; fosfato sódico 0,73 g/L; fosfato monopotásico 0,2 g/L; pH 7,4) con formol a una concentración final del 0,35 %. La mezcla vacunal se ajusta a una densidad óptica de 1,1 (A580: Absorbancia_{580}). La solución vacunal resultante contiene aproximadamente 10^{10} células/mL.

El control de esterilidad se lleva a cabo sembrando la mezcla vacunal en placas de agar FMM, en placas de agar triptona de soja (TSA) con NaCl a una concentración final del 1 % (TSA-1), y en tubos de tioglicolato, incubando durante 72 horas a 25 y 37 °C.

El control de especificidad se realiza mediante aglutinación en portaobjetos, utilizando el antisuero obtenido en conejo frente a la cepa CECT 5045 y como antígeno las células enteras empleadas en la fabricación de la vacuna.

La vacuna debe ser conservada a 4 °C hasta su utilización.

Modo de administración

Esta vacuna debe administrarse por inyección intraperitoneal. Para ello, se inoculan los peces con 0,1 - 0,2 mL/pez (dependiendo del peso del pez) de mezcla vacunal sin diluir.

La cepa de *Flexibacter maritimus* empleada en esta vacuna se denomina CECT 5045, y ha sido aislada a partir de rodaballo cultivado en Galicia.

La eficacia de esta vacuna fue evaluada en rodaballo tanto a escala de laboratorio como a escala industrial. La potencia, expresada como Porcentaje de Supervivencia Relativa (RSP) ha sido superior al 90 %.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Flexibacter maritimus* LPV 1.7, aislada de rodaballo cultivado en Galicia, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de referencia CECT 5045.

2. Vacuna anti-*Flexibacter maritimus* (FM-95) para la prevención de la enfermedad flexibacteriosis marina en rodaballo y peces salmónidos cultivados en agua de mar, compuesta por células bacterianas de la cepa LPV 1.7 de este microorganismo inactivadas con formol.

3. Procedimiento para la obtención de la vacuna de la reivindicación 2, **caracterizado** por el cultivo de las células bacterianas en caldo para *Flexibacter maritimus* (FMM) y su inactivación por formol a una concentración final del 0,35 % durante 3 horas a 25 °C, y porque el cultivo inactivado se centrifuga y el precipitado celular se resuspende en tampón fosfato a una densidad óptica de 1,1 ($Absorbancia_{580}$).

4. Procedimiento, según la reivindicación 3, para la obtención de la vacuna FM-95 anti-*Flexibacter maritimus*, **caracterizado** porque la concentración de células bacterianas en la preparación vacunal es de 10^{10} células/mL.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 139 549

(21) N.° solicitud: 009801549

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **22.07.1998**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.**[6]: C12N 1/20, A61K 39/02, C12N 1/36 // (C12N 1/20, C12R 1:01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PAZOS, F. et al. Evaluation of media for the successful culture of Flexibacter maritimus. Journal of Fish Diseases. 1996. Vol. 19, páginas 193-197.	1
A		3
X	MAGARIÑOS, B. et al. Response of Pasteurella piscida and Flexibacter maritimus to skin mucus of marine fish. Diseases of aquatic organisms. 1995. Vol. 21, páginas 103-108.	1
X	ALSINA, M. y BLANCH, A.R. First isolation of Flexibacter maritimus from culturated turbot (Scophthalmus maximus). Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 1993. Vol. 13 (5), páginas 157-159.	1
X	CHEN, M.F. et al. Isolation and Characterizacion of Flexibacter maritimus from marine fishes of California. Journal of Aquatic animal Health. 1995. Vol. 7, páginas 318-326.	1
X	BERNARDET, J.F. et al. Comparative study on Flexibacter maritimus strains isolated from farmed sea bass (Dicentrarchus labrax) in France. Fish Pathology. 1994. Vol. 29 (2), páginas 105-111.	1
X	HANDLINGER, J. et al. The pathology of Flexibacter maritimus in aquaculture species in Tasmania, Australia. Journal of Fish Diseases. 1997. Vol. 20, páginas 159-168.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

[×] para todas las reivindicaciones

[ ] para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
21.12.1999	A. Polo Díez	1/2

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 139 549

(21) N.° solicitud: 009801549

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **22.07.1998**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.**[6]**:** C12N 1/20, A61K 39/02, C12N 1/36 // (C12N 1/20, C12R 1:01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BERNARDET, D.F. Immunization with bacterial antigens; Flavobacterium and Flexibacter infections. En: Fish Vaccinology. Gudding R. et al. (eds). Dev. Biol. Stand. Bases, Karger. 1997. Vol. 90, páginas 179-188.	
A	BASE DE DATOS WPIL, semana 1996-44, Derwent Publications Ltd. Londres (GB) AN: 1996-436855. JP 08-214788 A (SANWA DENPUN KOGYO KK) 27.08.1996, resumen.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

[×] para todas las reivindicaciones

[ ] para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
21.12.1999	A. Polo Díez	2/2