



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

⑫ Número de solicitud: 009801549

⑬ Int. Cl.⁷: C12N 1/20

A61K 39/02

C12N 1/36

//(C12N 1/20

C12R 1:63)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **22.07.1998**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2000**

Fecha de concesión: **07.08.2000**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2000**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.10.2000

⑲ Titular/es: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA**
Centro de Innovación e Transferencia de
Tecnoloxía
Avda. das Ciencias, s/n
15706 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑳ Inventor/es: **Santos Rodríguez, Isabel y
Pazos Álvarez, Francisco**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Vacuna anti- *Flexibacter maritimus* (FM-95) para la prevención de la enfermedad "Flexibacteriosis marina" en rodaballo y peces salmónidos, y procedimiento de obtención.**

㉓ 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.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 139 549 B1

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 Leaflets. En prensa). Las proteínas y lipo-

polisacáridos (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 periodo 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: Absorbancia₅₈₀). La solución vacunal resultante contiene aproximadamente 10¹⁰ 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 antisero 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 va-

cuna 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 (Absorbancia₅₈₀).

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.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 139 549
⑫ N.º solicitud: 009801549
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 22.07.1998
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ 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 <i>Flexibacter maritimus</i> . Journal of Fish Diseases. 1996. Vol. 19, páginas 193-197.	1
A		3
X	MAGARIÑOS, B. et al. Response of <i>Pasteurella piscida</i> and <i>Flexibacter maritimus</i> 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 <i>Flexibacter maritimus</i> from cultured turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>). Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 1993. Vol. 13 (5), páginas 157-159.	1
X	CHEN, M.F. et al. Isolation and Characterization of <i>Flexibacter maritimus</i> 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 <i>Flexibacter maritimus</i> strains isolated from farmed sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) in France. Fish Pathology. 1994. Vol. 29 (2), páginas 105-111.	1
X	HANDLINGER, J. et al. The pathology of <i>Flexibacter maritimus</i> 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.º:

Fecha de realización del informe
21.12.1999

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 139 549
⑫ N.º solicitud: 009801549
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 22.07.1998
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ 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.º:

Fecha de realización del informe
21.12.1999

Examinador
A. Polo Díez

Página
2/2