(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 115 550**

(21) Número de solicitud: 9602156

(51) Int. Cl.[6]: C12N 1/20
A61K 39/102
//(C12N 1/20
C12R 1:01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **14.10.96**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.98**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.06.98**

(71) Solicitante/s:
Universidade de Santiago de Compostela
y en su nombre y representación El Rector
Centro de Transferencia de Tecnoloxía
Avda das Ciencias s/n
15706 Santiago de Compostela, La Coruña, ES

(72) Inventor/es: **Estévez Toranzo, Alicia;**
Barja Pérez, Juan Luis y
Magariños Ferro, Beatriz

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Vacuna anti-*Pasteurella piscicida* (DI) para la prevención de la enfermedad pasteurelosis en dorada y lubina, y procedimiento de obtención.**

(57) Resumen:
Vacuna anti-*Pasteurella piscicida* (DI) para la prevención de la enfermedad pasteurelosis en dorada y lubina (cultivadas en agua de mar), y procedimiento de obtención. (Cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo con referencia CECT 4780 y CECT 4781). La vacuna, diseñada para prevenir la pasteurelosis de la dorada y la lubina, producida por el microorganismo *Pasteurella piscicida* se caracteriza por incluir en su composición, además de las células bacterianas (inactivadas con formol), sus productos extracelulares. El procedimiento de administración de la vacuna es de aplicación en acuicultura.

ES 2 115 550 A1

DESCRIPCION

Vacuna anti-*Pasteurella piscicida* (DI) para la prevención de la enfermedad pasteurelosis en dorada y lubina, y procedimiento de obtención.

La presente patente de invención está destinada a dar a conocer una nueva vacuna para proteger dorada y lubina cultivadas en agua de mar contra la pasteurelosis, y está basada en la combinación de cepas, causantes de mortalidades en peces, aisladas en distintas zonas geográficas, que difieren en la composición de sus productos extracelulares. La ventaja de esta vacuna frente a las ya existentes es su alta tasa de protección (80%) a las que supera en más de un 20%.

La pasteurelosis, producida por *Pasteurella piscicida*, es una de las principales enfermedades en acuicultura marina, especialmente para dorada y lubina, debido a las enormes pérdidas económicas que ocasiona.

Desde 1990 se han detectado con cierta frecuencia epizootias de pasteurelosis en diversas piscifactorías gallegas y del resto de España, afectando principalmente a dorada y en menor medida a lubina. Aunque se ha empleado la quimioterapia para el tratamiento de la enfermedad, la aparición de resistencias a antibióticos y la creciente preocupación sobre la permanencia en el medio ambiente de los mismos han impulsado la vacunación como medida preventiva de la enfermedad.

Todas las cepas aisladas de estas epizootias presentan gran homogeneidad bioquímica, serológica y genética (Magariños y col., 1992: Applied and Environmental Microbiology, 58: 3316-3322). Si se han detectado, sin embargo, diferencias entre las cepas en la composición de sus productos extracelulares y en base a estas diferencias se ha realizado la selección de los componentes vacunales (Magariños y col., 1992: Joumal of General Microbiology, 138:2491-2498). Las cepas de *Pasteurella piscicida* incluidas en esta vacuna son los aislados DI-21 e IT-1, que han sido depositados por los inventores de la patente en la Colección Española de Cultivos Tipo, con referencias CECT 4780 y 4781, respectivamente. Ambas presentan las características típicas de la especie siendo bacilos halófilos Gram. negativos, imnóviles, oxidasa y catalasa positivos, fermentativos y sensibles al agente vibriostático O/129. Son además positivas para las reacciones de rojo de metilo y Voges-Proskauer y negativas para las pruebas del indol y citrato.

En cuanto a sus productos extracelulares en los de ambas cepas se ha detectado alta actividad fosfolipasa, fosfatasa alcalina y ácida, esterasa, lipasa, leucina arilamidasa y fosfoamidasa. La cepa CECT 4780 presenta además actividad N-acetil-β-glucosaminidasa que no está presente en la cepa CECT 4781. Este aislado (CECT 4781) posee en sus productos extracelulares, a diferencia del CECT 4780, actividad α-glucosidasa.

Preparación

A partir de preinóculos en fase logarítmica de crecimiento se inoculan matraces de dos litros conteniendo un litro de medio de cultivo caldo cerebro-corazón (BHI, del inglés brain heart infusión: infusión de sólidos de cerebro de ternera 12,5 g/L; infusión de sólidos de corazón bovino 5,0 g/L; proteosa peptona 10 g/L; cloruro sódico 5,0 g/L; glucosa 2,0 g/L; fosfato disódico 2,5 g/L; pH 7,4 ± 0,2) suplementado con un 1,5% de cloruro sódico.

La incubación se realiza a 25°C durante 48 horas. Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 1 (Absorbancia_{580})(aproximadamente 10^{10} células/mL), se le 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 transfieren a 4°C. Las dos cepas empleadas se mezclan en proporción del 50%.

Paralelamente, las mismas cepas se siembran sobre placas (25 x 25 cm) con el mismo medio de cultivo sólido (TSA-EL: Agar cerebro-corazón suplementado con 1,5% de ClNa), incubando a la misma temperatura durante 48 horas. Al cabo de ese tiempo a cada placa se le añaden 5 mL de formol al 35%. Las células muertas se recogen con una espátula estéril, lavando con tampón fosfato (PBS)-formol (PBS-formol: ClNa 8 g/L, ClK 0,3 g/L, PO_4HNa_2 0,73 g/L, PO_4H_2K 0,2 g/L, formol 0,35%; pH 7,4). Esta fracción, rica en productos extracelulares, se diluye hasta una densidad óptica de 1 (Absorbancia_{580}) y se añade al cultivo líquido inactivado en una proporción 1/10.

El control de esterilidad se lleva a cabo sembrando la mezcla vacunal en placas de BHIA-2 y en tubos de tioglicolato, incubando durante 72 horas a 25 y 37°C, respectivamente.

El control de especificidad se realiza mediante aglutinación en portaobjetos, utilizando como antígeno las células enteras empleadas en la fabricación de la vacuna.

El producto debe ser conservado a 4°C hasta su utilización.

Modo de administración

Para administrar la vacuna, esta se diluye 1/10 en el agua de cultivo y los peces se mantienen en este baño vacunal durante 1 min. Con cada litro de vacuna se pueden vacunar 100 Kg de peces en 20 tandas de 5 Kg, manteniendo aireado el baño vacunal. También se puede emplear una dilución 1/1000 de la vacuna, y en este caso los peces se mantienen en este baño durante 1 hora. Para administrar la vacuna por inyección intraperitoneal, se inoculan los peces con 0,1-0,2 mL/pez (dependiendo del peso del pez) de mezcla vacunal sin diluir.

Para mejorar la protección obtenida se recomienda realizar la vacunación en peces de aproximadamente 0,5 g, así como la revacunación al cabo de tres meses.

Las cepas de *Pasteurella piscicida* empleadas en esta vacuna son DI-21 (aislado gallego) e IT-1 (aislado italiano).

La eficacia de esta vacuna fue evaluada en dorada tanto a escala de laboratorio como a escala de campo. La potencia, expresada como Porcentaje de Supervivencia Relativa (RSP) ha sido superior al 80%.

REIVINDICACIONES

1. Cepas de *Pasteurella piscicida* DI-21 (aislado gallego) e IT-1 (aislado italiano) depositadas en la Colección Española de Cultivos tipo con referencia CECT 4780 y 4781, respectivamente.

2. Vacuna anti-*Pasteurella piscicida* para combatir la pasteurelosis de dorada y lubina, compuesta por las células inactivadas por formol y los productos extracelulares de dos cepas de este microorganismo, CECT 4780 y CECT 4781, que difieren en la composición de sus productos extracelulares.

3. Procedimiento para la preparación de la vacuna de la reivindicación 2, **caracterizado** por el cultivo de las células bacterianas en medio líquido caldo cerebro corazón (BHI) suplementado con cloruro sódico y su inactivación por tratamiento con formol a una concentración final del 0,35%, durante 4 horas a temperatura ambiente.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la concentración final de células bacterianas en la preparación vacunal es de 10^{10} células/mL.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 3 y 4, **caracterizado** porque la proporción final de mezcla de ambas cepas en la vacuna es del 50%.

6. Procedimiento para la preparación de la vacuna de la reivindicación 2, **caracterizado** porque la obtención de los productos extracelulares se realiza en placas de medio agar cerebro corazón suplementado con cloruro sódico y su inactivación se lleva a cabo por tratamiento con formol a una concentración final del 0,35%, durante 4 horas a temperatura ambiente.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la concentración de productos extracelulares se ajusta a una densidad óptica de 1 (Absorbancia_{580}) y porque su proporción de mezcla con las células inactivadas es de 1/10.

8. Procedimiento de administración de la vacuna de la reivindicación 2, **caracterizado** porque la vacuna se puede administrar por baño corto (1 min. en vacuna diluída 1/10), baño prolongado 1 hora en vacuna diluida 1/1000, o por inyección intraperitoneal (0,1 mL/pez) de mezcla vacunal sin diluir.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** por que los óptimos resultados de la vacunación se obtienen vacunando peces de aproximadamente 0,5 gramos, y realizando una revacunación al cabo de tres meses.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 115 550

(21) N.° solicitud: 9602156

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **14.10.96**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.^{6}:** C12N 1/20, A61K 39/102 // (C12N 1/20, C12R 1:01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MAGARIÑOS et al. Vaccination trials on gilthead seabream (Sparus aurata) against Pasteurella piscicida. Aquaculture, Vol. 120. 1994. Páginas 201-208	1,2,8
A		3-7,9
X	MAGARIÑOS et al. Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen Pasteurella piscicida. Journal of General Microbiology, Vol. 138. 1992. Páginas 2491-2498	1,2
X	BASES DE DATOS WPIL en QUESTEL, semana 9327, Londres: Derwent Publications Ltd., AN 93-216675, JP-05139994-A (CHOKAN S) 08.06.93 * Resumen *	1
A		2-8
X	WO-9612734-A (EWOS AKTIEBOLAG) 02.05.96 * Todo el documento *	1
A		2-7
X	MAGARIÑOS et al. Phenotypic, antigenic and molecular characterization of Pasteurella piscicida strains isolated from fish. Applied and Environmental microbiology, Vol. 58 (10). 1992. Páginas 3316-3322	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
30.04.98	A. Polo Díez	1/2

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 115 550

(21) N.° solicitud: 9602156

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **14.10.96**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.^{6}:** C12N 1/20, A61K 39/102 // (C12N 1/20, C12R 1:01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	NINOMIYA, M y KUSUDA, R. Differences in chemical composition and antigenicity between two ribosomal vaccines prepared from Pasteurella piscicida. Suisan Zoshoku, Vol. 41 (8). 1993. Páginas 217-221	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
30.04.98	A. Polo Díez	2/2