



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 115 551**

② Número de solicitud: 9602157

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 1/20

A61K 39/02

//(C12N 1/20

C12R 1:01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **14.10.96**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.98**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.06.98**

⑦ Solicitante/s: **Universidade de Santiago de Compostela y en su Nombre y Representación El Rector Centro de Transferencia de Tecnología Avda das Ciencias s/n 15706 Santiago de Compostela, La Coruña, ES**

⑧ Inventor/es: **Estévez Toranzo, Alicia; Barja Pérez, Juan Luis y López Romalde, Jesús**

⑩ Agente: **No consta**

⑮ Título: **Vacuna anti-*Enterococcus* sp. (ET-2) para la prevención de la enfermedad enterococcus del rodaballo y procedimiento de obtención.**

⑯ Resumen:  
Vacuna anti-*Enterococcus* sp. (ET-2) para la prevención de la enfermedad enterococosis del rodaballo (cultivado en agua de mar), y procedimiento de obtención. (Cepas depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo con referencias CECT 4779 y 4779). La vacuna, diseñada para prevenir la enterococosis del rodaballo, producida por el microorganismo *Enterococcus* sp., se caracteriza por incluir en su composición, además de las células bacterianas, sus productos extracelulares. El procedimiento de administración de la vacuna es de aplicación en acuicultura.

ES 2 115 551 A1

## DESCRIPCION

Vacuna anti-*Enterococcus* sp. (ET-2) para la prevención de la enfermedad enterococosis del rodaballo, y procedimiento de obtención.

La presente patente de invención está destinada a dar a conocer la primera vacuna para proteger contra la enterococosis el rodaballo cultivado en agua de mar, así como su procedimiento de obtención.

La enterococosis, producida por *Enterococcus* sp., fue diagnosticada por primera vez en rodaballo cultivado en Galicia en 1992. Desde 1993 esta enfermedad se ha convertido en el principal problema patológico en un gran número de piscifactorías de rodaballo, produciendo importantes pérdidas económicas (Toranzo y col., 1994: Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 14: 19-23). Las cepas de *Enterococcus* sp. aisladas en Galicia son muy homogéneas tanto fenotípica como serológicamente, no pudiendo establecerse biotipos ni serotipos. La quimioterapia no es efectiva en el control de esta enfermedad, por lo que no era posible el tratamiento de la misma. Es de especial importancia, por tanto, el contar con vacunas efectivas para prevenir las mortalidades producidas por este patógeno (Toranzo y col., 1995: Congreso Nacional de Acuicultura, San Carles de la Rápita).

Las cepas de *Enterococcus* sp. empleadas en esta vacuna son RA-99.1 y AZ-12.1, ambas aisladas en Galicia a partir de distintos stocks de peces. Estas cepas han sido depositadas por los inventores de esta patente en la Colección Española de Cultivos Tipo, con referencias CECT 4779 y 4778, respectivamente. Ambas presentan las características típicas del Género *Enterococcus* siendo cocos Gram positivos, inmóviles, anaerobios facultativos, con un rango de temperatura de crecimiento entre 10 y 37°C, capaces de crecer con concentraciones del NaCl hasta un 6.5% y a pH 9,6. Además, en la formulación vacunal se han incluido los productos extracelulares de las cepas, caracterizados por un alto contenido proteico pero sin actividad enzimática detectable.

*Preparación*

A partir de preinóculos en fase logarítmica de crecimiento se inoculan matraces de dos litros conteniendo un litro de medio de cultivo caldo triptona de soja (TSB del inglés: Tryptone soy broth: triptona 17 g/L; peptona de soja 3 g/L; glucosa 2,5 g/L; fosfato bipotásico 2,5 g/L; cloruro sódico 10 g/L; pH 7,3 ± 0,2) suplementado con extracto de levadura (10 g/L).

La incubación se realiza a 30°C durante 48 horas. A las 24 horas, se añaden a cada matraz 10 mL de NaOH 1 N para evitar que la acidificación del medio producida por las cepas impida el óptimo crecimiento de las mismas. Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 1 (Absorbancia<sub>580</sub>) (aproximadamente 10<sup>10</sup> 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 (Tryptona soja agar suplementado con extracto de levadura), 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: CINa 8 g/L, ClK 0,3 g/L, PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> 0,73 g/L, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 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<sub>580</sub>) 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 TSA-EL 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*

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.

Las cepas de *Enterococcus* sp. empleadas en esta vacuna son RA-99.1 y AZ-12.1, ambas aisladas en Galicia a partir de distintos stocks de peces.

La eficacia de esta vacuna fue evaluada en rodaballo tanto a escala de laboratorio como a escala de campo. La potencia, expresada como Porcentaje de Supervivencia Relativa (RSP) ha sido superior al 85%, manteniéndose dicha protección durante al menos 1 año, con los mismos valores de RSP.

### REIVINDICACIONES

1. Cepas de *Enterococcus* sp. AZ-12.1 y RA-99.1, aisladas en Galicia y depositadas en la Colección Española de Cultivos tipo con referencia CECT 4778 y 4779, respectivamente.

2. Vacuna anti-*Enterococcus* sp. para combatir la enterococcosis de rodaballo compuesta por las células inactivadas por formol y los productos extracelulares de las cepas CECT 4778 y 4779 de este microorganismo.

3. Procedimiento para la preparación de la vacuna de la reivindicación 2, **caracterizado** por el cultivo de las células bacterianas en cultivos líquidos de medio caldo triptona soja (TSB) suplementado con extracto de levadura y su inactivación 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** por que 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 triptona soja agar 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<sub>580</sub>) 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 administra por inyección intraperitoneal a los rodaballos, con dosis de 0,1 mL, en peces menores de 20 g, o 0,2 mL, en peces mayores de 20 g.

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 1/20, A61K 39/02 // (C12N 1/20, C12R 1:01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TORANZO et al. Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against Enterococcus sp. infection in turbot. Aquaculture, Vol. 134. 1995. Páginas 17-27	1,2,8
A		3-7
X	TORANZO et al. Antigenic characterization of Enterococcus strains pathogenic for turbot and their relationship with other gram-positive bacteria. Dis. aquat. org. Vol. 21. 1995. Páginas 187-191	1
A	MAGARIÑOS et al. Vaccination trials on gilthead seabream (Sparus aurata) against Pasteurella piscicida. Aquaculture. Vol. 120. 1994. Páginas 201-208	2-8
A	SANTOS et al. Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of Vibrio anguillarum serotypes 01, 02 and 03. Appl. environ. microbiol. Vol. 61 (7). 1995. Páginas 2493-2498	2
A	WO-9221370-A (THE SECRETARY OF STATE FOR SCOTLAND IN HER BRITANNIC MAJESTY'S GOVERNMENT OF THE UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND) 10.12.92	

**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**

14.05.98

**Examinador**

A. Polo Díez

**Página**

1/1