



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 135 355**

② Número de solicitud: 9800889

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 1/20

A61K 39/106

C12N 1/36

//(C12N 1/20

C12R 1:63)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **27.04.98**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.99**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.10.99**

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
Centro de Innovación e Transferencia de  
Tecnología  
Avda. das Ciencias, s/n  
15706 Santiago de Compostela, La Coruña, ES

⑦ Inventor/es: **Santos Rodríguez, Ysabel;**  
**Estévez Toranzo, Alicia y**  
**Barja Pérez, Juan Luis**

⑦ Agente: **No consta**

④ Título: **Vacuna anti-*Vibrio anguillarum* (GAVA-3) para la prevención de la enfermedad vibriosis del rodaballo y peces salmónidos, y procedimiento de obtención.**

⑤ Resumen:

Vacuna anti-*Vibrio anguillarum* (GAVA-3) para la prevención de la enfermedad vibriosis del rodaballo y peces salmónidos, y procedimiento de obtención.

Procedimiento de obtención de la vacuna GAVA-3 anti-*Vibrio anguillarum* para la prevención de la enfermedad vibriosis producida por la bacteria *Vibrio anguillarum* en rodaballo y peces salmónidos cultivados en agua de mar. El procedimiento se caracteriza por incluir en la vacuna las células bacterianas y los productos extracelulares inactivados con formol de tres cepas de *Vibrio anguillarum* pertenecientes a los serotipos O1 y O2 (subgrupos O2 $\alpha$  y O2 $\beta$ ) (Cepas depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, con los números de accesión CECT 5031, CECT 5032 y CECT 5033). La vacuna puede ser administrada por baño corto, baño prolongado o por inyección y confiere al rodaballo y peces salmónidos niveles notables de protección frente a la vibriosis.

ES 2 135 355 A1

## DESCRIPCION

Vacuna anti-*Vibrio anguillarum* (GAVA-3) para la prevención de la enfermedad vibriosis en rodaballo y peces salmónidos, y procedimiento de obtención.

La presente patente de invención está destinada a dar a conocer una nueva vacuna para proteger al rodaballo y peces salmónidos cultivados en agua de mar contra la vibriosis, y está basada en la combinación de células y productos extracelulares de cepas de *Vibrio anguillarum*, causantes de mortalidades de peces, pertenecientes a los serotipos O1 y O2 (subgrupos O2 $\alpha$  y O2 $\beta$ ). La ventaja de esta vacuna frente a las ya existentes es que cubre un mayor espectro antigénico, confiriendo a los peces un elevado grado de protección (80%) frente al serotipo O1 y los dos subgrupos antigénicos del serotipo O2 (O2 $\alpha$  y O2 $\beta$ ).

La vibriosis, causada principalmente por la especie *Vibrio anguillarum*, es una de las enfermedades bacterianas más importantes que afectan a peces marinos, moluscos y crustáceos a nivel mundial. Esta enfermedad fue diagnosticada por primera vez en rodaballo cultivado en Galicia en el año 1985 (Devesa et al., (1985): In Fish and Shellfish Pathology, A. E. Ellis, ed. Chapter XIV pp 131-140, Academic Press) convirtiéndose desde entonces en uno de los principales problemas patológicos para la piscicultura marina de nuestra área. Aunque se han descrito un total de 10 serotipos en esta especie bacteriana, prácticamente todos los aislados de *Vibrio anguillarum* implicados en mortalidades de peces pertenecen a los serotipos O1 y O2 (Toranzo et al., (1987): Aquaculture, 67: 41-51; Santos et al., (1995): Applied and Environmental Microbiology, 61: 2495-2498). Además, mientras el serotipo O1 constituye un grupo fenotípica y genéticamente homogéneo, el serotipo O2 muestra heterogeneidad a nivel bioquímico, genético y serológico, detectándose la existencia de dos subgrupos antigénicamente distintos (O2 $\alpha$  y O2 $\beta$ ) (Toranzo et al., (1987); Santos et al., (1995) opus cited. Además, se ha demostrado que los productos extracelulares de cepas pertenecientes al serotipo O1 y a los dos subgrupos antigénicos del serotipo O2 (O2 $\alpha$  y O2 $\beta$ ) son tóxicos al ser inoculados en peces, presentan diferencias cualitativas y/o cuantitativas en la composición enzimática y son inmunológicamente distintos (Santos et al., (1991): Journal of Applied Ichthyology, 7: 160-167; Santos et al., (1995) op. cited. Teniendo en cuenta todo esto se ha realizado la selección de los componentes de la vacuna. Las cepas de *Vibrio anguillarum* incluidas en esta vacuna son los aislados R-82 (serotipo O1), RG-111 (serotipo O2, subgrupo O2 $\alpha$ ) y RV-22 (serotipo O2, subgrupo O2 $\beta$ ), que han sido depositadas por los inventores de esta patente en la Colección Española de Cultivos Tipo con las referencias CECT 5031, CECT 5032 y CECT 5033, respectivamente. Estas cepas presentan las características típicas de la especie, siendo bacilos halófilos Gram-negativos, móviles, oxidasa positivos, fermentativos y sensibles al agente vibriostático O/129.

En cuanto a los productos extracelulares, los de las tres cepas han mostrado actividad he-

molítica, proteolítica y citotóxica. Las cepas CECT 5031 y CECT 5032 mostraron además actividades valina arilamidasa, tripsina, quimiotripsina y dermonecrótica que estaban ausentes en la cepa CECT 5033. Los productos extracelulares de las tres cepas presentan componentes proteicos y lipopolisacáridicos inmunológicamente distintos (Santos et al., (1995) op. cited.

*Preparación*

A partir de preinóculos en fase logarítmica de crecimiento se inoculan matraces de dos litros conteniendo un litro de medio de cultivo caldo tripton de soja (TSC) con NaCl a una concentración final del 1% (TSC-1, tripton 17 gr/L; pepton de soja 3 gr/L; glucosa 2,5 gr/L; fosfato bipotásico 2,5 gr/L; cloruro sódico 10 gr/L; pH 7,3  $\pm$  0,2).

La incubación se realiza a 25°C durante 48 horas. Finalizado el período de incubación, se añade al cultivo formol a una concentración final de 0,35% para matar las bacterias e inactivar los productos extracelulares, y se mantiene durante tres horas más en agitación, al cabo de las cuales se transfiere a 4°C. Los cultivos de las tres cepas empleadas en la vacuna se ajustan a una densidad óptica de 1 (A<sub>550</sub>: Absorbancia<sub>550</sub>) y se mezclan en proporción 50:25:25% (CECT 5031: CECT 5032: CECT 5033). La mezcla vacunal contiene aproximadamente 10<sup>10</sup> células/mL y 160  $\mu$ g de proteína extracelular/mL.

El control de esterilidad se lleva a cabo sembrando la mezcla vacunal en placas de agar tripton 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, respectivamente.

El control de especificidad se realiza mediante aglutinación en portaobjetos, utilizando los antisueros obtenidos en conejo frente a cada una de las cepas empleadas en la fabricación de la vacuna (CECT 5031, CECT 5032, CECT 5033) y como antígeno las células enteras de dichas cepas.

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

*Modo de administración*

Para administrar la vacuna por baño corto, esta se diluye 1/10 en el agua de cultivo y los peces se introducen en este baño vacunal y se mantienen en el mismo 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 con fuerte aireación (baño prolongado). Para administrar la vacuna por inyección, 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 1,0 g, así como la revacunación al cabo de un mes.

Las cepas de *Vibrio anguillarum* empleadas en esta vacuna son R-82 (serotipo O1), RG-111 (Serotipo O2, subgrupo O2 $\alpha$ ) y RV-22 (Serotipo O2, subgrupo O2 $\beta$ ) y han sido aisladas a partir de rodaballo cultivado en Galicia.

La eficacia de esta vacuna fue evaluada en ro-

daballo tanto a escala de laboratorio como a escala industrial. La potencia, expresada como Por-

centaje de Supervivencia Relativa (RSP) ha sido superior al 80 %.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Cepas de *Vibrio anguillarum* R-82 (serotipo O1), RG-111 (serotipo O2, subgrupo O2 $\alpha$ ) y RV-22 (serotipo O2, subgrupo O2 $\beta$ ), aisladas a partir de rodaballo cultivado en Galicia, depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo con las referencias CECT 5031, CECT 5032 y CECT5033, respectivamente.

2. Vacuna anti-*Vibrio anguillarum* para proteger al rodaballo y peces salmónidos cultivados en agua de mar frente a la vibriosis causada por los serotipos O1 y O2 (subgrupos antigénicos O2 $\alpha$  y O2 $\beta$ ) compuesta por las células bacterianas y los productos extracelulares inactivados con formol de las cepas CECT 5031 (serotipo O1), CECT 5032 (serotipo O2, subgrupo O2 $\alpha$ ) y CECT 5033 (serotipo O2, subgrupo O2 $\beta$ ) de este microorganismo.

3. Procedimiento para la preparación de la vacuna de la reivindicación 2, **caracterizado** por el cultivo de las cepas bacterianas en me-

dio líquido caldo triptona de soja suplementado con cloruro sódico, por la inactivación de las células bacterianas y sus productos extracelulares por tratamiento de los cultivos con formol a una concentración final del 0,35% durante tres horas a 25°C y porque los cultivos inactivados de las cepas se ajustan a una densidad óptica de 1 (Absorbancia<sub>550</sub>).

4. Procedimiento, según la reivindicación 3, para la preparación de la vacuna anti-*Vibrio anguillarum*, **caracterizado** porque la proporción final de mezcla de las tres cepas y sus productos extracelulares en la vacuna es 50:25:25% (CECT 5031: CECT 5032: CECT 5033).

5. Procedimiento, según la reivindicación 3, para la preparación de la vacuna anti-*Vibrio anguillarum*, **caracterizado** porque la concentración de células bacterianas en la preparación vacunal es de 10<sup>10</sup> células/mL y la concentración proteica de los productos extracelulares es de 160  $\mu$ g/mL.

25

30

35

40

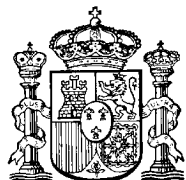
45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 1/20, A61K 39/106, C12N 1/36 // (C12N 1/20, C12R 1:63)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SANTOS, Y. et al. Protection of turbot, <i>Scophthalmus maximus</i> (L.), and rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Richardson) against vibriosis using two different vaccines. <i>Journal of Fish Diseases</i> . 1991. Vol. 14, páginas 407-411.	1-5
X	TORANZO, A.E. et al. Immunization with bacterial antigens: <i>Vibrio</i> infections. En: <i>Fish Vaccinology</i> . Dev. Biol. Stand. Basel, Karger 1997. Vol. 90, páginas 93-105.	1,2
X	SANTOS, Y. et al. Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of <i>Vibrio anguillarum</i> serotypes 01,02 and 03. <i>Applied and Environmental microbiology</i> . 1995. Vol. 61, páginas 2493-2498.	1
A	BASE DE DATOS WPI, semana 7913, Derwent Publications Ltd., Londres (GB), AN 79-24695B (13) JP 54-023118 A (KITASATO RES. INST.) 21.02.1979, resumen.	1-3
A	US 3862313 A (FRYER et al.) 21.01.1975	1-3
A	BASE DE DATOS WPI, semana 8139, Derwent Publications Ltd., Londres (GB), AN 81-70566D (25) JP 56-099423 A (KITASATO RES. INST.) 10.08.1981, resumen.	1-3
A	PRESS, C. y LILLEHAUG, A. Vaccination in European salmonid aquaculture: A Review of practices and prospects. <i>Br. Vet. J.</i> 1995. Vol. 151, páginas 45-69.	

**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**

18.06.99

**Examinador**

A. Polo Díez

**Página**

1/1