



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 224 864**

② Número de solicitud: 200301616

⑤ Int. Cl.7: **C12N 1/20**  
A61K 39/02  
A61K 9/50  
// (C12N 1/20  
C12R 1:01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **10.07.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2005**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.03.2005**

⑰ Solicitante/s:  
**Universidade de Santiago de Compostela**  
**Edificio CACTUS - CITT - Campus Sur**  
**15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **López Romalde, Jesús;**  
**Blanco Mendez, José;**  
**Luzardo Álvarez, Asteria y**  
**Ravelo Vivenes, Carmen**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento de obtención de la vacuna oral anti-*Lactococcus garvieae* para la prevención de la enfermedad lactococosis de la trucha.**

㉑ Resumen:

Procedimiento de obtención de la vacuna oral anti-*Lactococcus garvieae* para la prevención de la enfermedad lactococosis de la trucha.

Procedimiento de obtención de la vacuna oral anti-*Lactococcus garvieae* para la prevención de la enfermedad lactococosis de la trucha. La vacuna se caracteriza por presentar células bacterianas inactivadas de la cepa CECT 5800 encapsuladas en micropartículas de alginato, que se mezclan con un pienso comercial. El procedimiento de administración de la vacuna es por vía oral.

ES 2 224 864 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de la vacuna oral anti-*Lactococcus garvieae* para la prevención de la enfermedad lactococosis de la trucha.

La lactococosis, producida por *Lactococcus garvieae*, fue diagnosticada por primera vez en 1991 en trucha cultivada en España; convirtiéndose en el principal problema patológico en un gran número de piscifactorías de trucha, produciendo importantes pérdidas económicas (Doménech y col., 1993: Microbiología (SEM), 9: 63-68; Ravelo y col., 2001: Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 21: 136-144). Las cepas de *Lactococcus garvieae* aisladas en España 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 (Romalde y Toranzo, 2002. En: Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases. pp. 211-233. C. Cunningham (ed). Kluwer Academic Publishers).

La cepa de *Lactococcus garvieae* empleada en esta vacuna es TW-446.1, aislada en España a partir de trucha. La cepa está depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo, referencia CECT 5800. Presenta las características típicas de la especie *Lactococcus garvieae* siendo cocos Gram positivos, inmóviles, anaerobios facultativos, negativos para oxidasa y catalasa,  $\alpha$ -hemolíticos, con un rango de temperatura de crecimiento entre 10 y 42°C, capaces de crecer con un 6,5% de NaCl, y pH 9,6.

### Preparación

A partir de preinóculos en fase logarítmica de crecimiento se inoculan matraces de dos litros conteniendo 1 L de medio de cultivo caldo triptona de soja (TSB: 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  $\pm$  0,2.

La incubación se realiza a 25°C durante 48 horas. 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 3 horas más en agitación, al cabo de las cuales se transfieren a 4°C. La suspensión celular bacteriana así obtenida se denomina bacterina.

El control de esterilidad se lleva a cabo sembrando la mezcla vacunal en placas de agar triptona de soja (TSA: Tryptone Soy Agar) 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 antíge-

no las células enteras empleadas en la fabricación de la vacuna y un antisuero específico para la cepa obtenido en conejo.

Una vez efectuados los controles de esterilidad y especificidad, a la bacterina se le añade alginato sódico a una concentración final de 0,5% (p/vol). Las micropartículas de alginato conteniendo las células bacterianas se obtienen por un procedimiento de atomización utilizando aire comprimido a temperatura ambiente con un flujo de aire de 15 L/min., siendo el caudal de la solución a atomizar de 7 mL/min.

Las micropartículas así obtenidas se gelifican en 250 mL de solución agua:acetona (75:25) con un 1,5% (p/vol) de cloruro cálcico, en agitación para evitar la aglomeración de las micropartículas, durante 30 minutos. Una vez terminado este proceso, las micropartículas se colectan por filtración empleando un filtro de acetato de celulosa.

Las micropartículas se mezclan con el pienso molido previamente, en una proporción del 10% peso/peso, hasta obtener una pasta homogénea, y de una plasticidad adecuada para someterla a un proceso de extrusión. Como líquido de humectación se usa agua destilada. El cálculo de la cantidad de micropartículas se lleva a cabo teniendo en cuenta la cantidad de comida administrada (1% del peso del pez/día), se ajusta la cantidad de micropartículas de alginato para que cada pez reciba una dosis de vacuna de 1,0 x 10<sup>9</sup> células/día. Esta mezcla se extrusiona, se deja secar y se corta en pellets del tamaño apropiado. El producto (pienso vacunal) debe ser conservado a 4°C hasta su utilización.

### Modo de administración

La vacuna debe administrarse por vía oral. Durante 7 días se suministra a los peces el pienso vacunal con una dosis de alimento del 1% del peso corporal del pez, en la primera comida del día. La cepa de *Lactococcus garvieae* empleada en esta vacuna es TW-446.1. La eficacia de la vacuna fue evaluada en trucha a escala de laboratorio. La potencia, expresada como Porcentaje de Supervivencia Relativa (RSP) ha sido superior al 48%, cuando se utilizó como inmunización primaria, manteniéndose dicha protección durante al menos 2 meses, con los mismos valores de RSP. La potencia fue del 87,5% cuando se utilizó como vía de revacunación en peces que habían sido previamente vacunados por vía intraperitoneal (3 meses antes), manteniéndose esta protección durante 3 meses.

El protocolo de vacunación recomendado para la trucha quedaría de la siguiente forma: a) Vacunación por vía intraperitoneal por inoculación de los peces con 0,1-0,2 mL/pez (dependiendo del peso del pez) de bacterina sin diluir. b) Revacunación 3 meses después por vía oral con la vacuna, siguiendo el procedimiento de administración arriba indicado.

### REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Lactococcus garvieae* TW-446.1, depositada en la Colección Española de Cultivos tipo con referencia CECT 5800.

2. Vacuna oral anti-*Lactococcus garvieae* compuesta por las células inactivadas por formol, bacterina, de la cepa CECT 5800 de la reivindicación 1, encapsulada en micropartículas de alginato, para combatir la lactococosis de trucha cultivada

3. Procedimiento de obtención de la vacuna oral anti-*Lactococcus garvieae* para la prevención de la enfermedad lactococosis de la trucha, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por el cultivo de las células bacterianas en cultivos líquidos de medio caldo triptona soja (TSB), y su inactivación con formol a una concentración final del 0,35%, durante 4 horas a temperatura ambiente.

4. Procedimiento de obtención de la vacuna oral anti-*Lactococcus garvieae*, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la concentración final de células bacterianas en la bacterina es de  $10^{10}$  células/mL.

5. Procedimiento de obtención de la vacuna oral

anti-*Lactococcus garvieae*, según las reivindicaciones 2, 3 y 4, **caracterizado** porque la preparación de las micropartículas del alginato se realiza mediante la atomización de la mezcla alginato sódico / bacterina (0,5% peso/volumen).

6. Procedimiento de obtención de la vacuna oral anti-*Lactococcus garvieae*, según la reivindicación 5, **caracterizado** porque las micropartículas de alginato, que contienen las células bacterianas, se gelifican en solución agua:acetona (75:25) con cloruro cálcico (1,5% peso/volumen) en agitación, y se colectan por filtración a través de filtros de acetato de celulosa.

7. Procedimiento de obtención de la vacuna oral anti-*Lactococcus garvieae*, según la reivindicación 6, **caracterizado** porque se mezclan las micropartículas de alginato con un pienso comercial en una proporción del 10% peso/peso.

8. Procedimiento de obtención de la vacuna oral anti-*Lactococcus garvieae*, según la reivindicación 7, **caracterizado** porque la mezcla, de micropartículas de alginato y pienso, se extrusiona, se deja secar y se corta en pellets del tamaño apropiado.

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 224 864

② Nº de solicitud: 200301616

③ Fecha de presentación de la solicitud: 10.07.2003

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 1/20, A61K 39/02, 9/50 // (C12N 1/20, C12R 1:01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KAWAI K. y HATAMOTO K. Encapsulation of oral delivery vaccine against <i>Lactococcus garvieae</i> infection in yellowtail <i>Seriola quinqueradiata</i> . Bull. Mar. Sci. Fish., Kochi Univ., 1999, Vol. 19, páginas 71-78.	1
Y		2
Y	JOOSTEN P.H.M. et al. Oral vaccination of fish against <i>Vibrio anguillarum</i> using alginate microparticles. Fish and Shellfish Immunology, 1997, Vol. 7, páginas 471-485.	2
X	CESCHIA G. et al. Vaccination against streptococcosis in farmed rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ). J. Appl. Ichtyol., 1998, Vol. 14, páginas 185-187.	1
A	SENUMA Y. et al. Alginate hydrogel microsphere and microcapsules prepared by spinning disk atomization. Biotechnology and Bioengineering, 2000, vol. 67 (5), páginas 616-622.	5-6
A	GUDDING R. et al. Recent developments in fish vaccinology. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1999, Vol. 72, páginas 203-212.	
A	POLK A.E. et al. Oral delivery in aquaculture: Controlled release of proteins from chitosan-alginate microcapsules. Aquaculture Engineering, 1994, Vol. 13, páginas 311-323.	

#### 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 nº:

<b>Fecha de realización del informe</b> 28.01.2005	<b>Examinador</b> A. Polo Díez	<b>Página</b> 1/1
---	-----------------------------------	----------------------