



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 368 981**

② Número de solicitud: 200950005

⑤ Int. Cl.:

A61K 39/07 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **05.06.2007**

⑩ Prioridad: **24.08.2006 JP 2006-228159**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
24.11.2011

⑦ Solicitante/s: **KAWASAKIMITAKA K.K.**
3-19-11, Nakase, Kawasaki-ku
Kawasaki-shi, Kanagawa 210-0818, JP
Yukinori Takahashi

⑦ Inventor/es: **Takahashi, Yukinori y**
Abe, Michinari

⑦ Agente: **Ungria López, Javier**

⑤ Título: **Vacuna para la enfermedad producida por *Edwardsiella* y la enfermedad producida por estreptococos en peces.**

⑤ Resumen:

Vacuna para la enfermedad producida por *Edwardsiella* y la enfermedad producida por estreptococos en peces.

Se describe una vacuna para la edwardsielosis y la estreptococosis en un pez. Específicamente, se describe una vacuna para la edwardsielosis en un pez, que comprende células inactivadas de (A) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana, y células inactivadas de (B) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de un pez distinto del pez diana, donde, cuando la cepa (A) es una cepa típica de *Edwardsiella tarda*, la cepa (B) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*, mientras que cuando la cepa (A) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*, la cepa (B) es una cepa típica de *Edwardsiella tarda*. También se describe específicamente una vacuna para la edwardsielosis y/o la estreptococosis en un pez, que comprende los componentes mencionados anteriormente y células inactivadas de (C) *Streptococcus iniae* y/o *Streptococcus parauberis*.

ES 2 368 981 A1

DESCRIPCIÓN

Vacuna para la enfermedad producida por *Edwardsiella* y la enfermedad producida por estreptococos en peces.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una vacuna para la edwardsielosis o la estreptococosis en un pez.

Técnica antecedente

10

En los últimos años se ha desarrollado notablemente la industria de la acuicultura. Sin embargo, la aparición frecuente de enfermedades víricas o bacterianas en asociación con este desarrollo ha producido grandes pérdidas económicas.

15

Como fármacos terapéuticos para estas enfermedades bacterianas se han usado agentes antibióticos o antibacterianos sintéticos, pero no se han podido conseguir efectos terapéuticos satisfactorios debido a la aparición de resistencia de las bacterias a estas sustancias antibacterianas. Además, la retención de dichos fármacos terapéuticos en los cuerpos de los peces ha producido problemas para la salud pública. Por lo tanto, ha surgido una gran demanda de la creación de medidas para las enfermedades de los peces sin usar una sustancia antibacteriana.

20

En vista de lo anterior, el desarrollo de vacunas es un asunto importante. Con respecto a las enfermedades víricas, la enfermedad iridoviral en, por ejemplo, el pez limón del Japón y la dorada del Japón ha producido grandes pérdidas económicas. Sin embargo, una vacuna disponible en el mercado para esta enfermedad viral ha reducido la aparición de la enfermedad. En relación con las enfermedades bacterianas, por ejemplo, la estreptococosis en el pez limón del Japón o el falso halibut, y la edwardsielosis en el falso halibut o la dorada del Japón han producido grandes pérdidas económicas. Entre estas enfermedades bacterianas se ha reducido la aparición de estreptococosis en el pez limón del Japón gracias al desarrollo de una vacuna para esta enfermedad.

25

Sin embargo, las vacunas para las enfermedades bacterianas en el falso halibut o la dorada del Japón hasta ahora no han sido satisfactorias. Hasta el momento actual, se ha intentado desarrollar una vacuna para la edwardsielosis para el falso halibut, que ha producido grandes pérdidas económicas (Documento 1 no correspondiente a una patente). Cuando se proporcionan células destruidas con formalina de una cepa de *Edwardsiella tarda*, que es un patógeno, procedente del falso halibut como una vacuna a un falso halibut, se produce un anticuerpo contra el patógeno en la sangre del falso halibut y los leucocitos fagocitan activamente a *E. tarda*. Sin embargo, el patógeno resiste a la acción bactericida de los leucocitos y sobrevive en los leucocitos; es decir, la vacuna no presenta el efecto de prevención de la enfermedad. De esta manera, aún no se ha desarrollado una vacuna eficaz para la edwardsielosis en el falso halibut. Por razones similares a las descritas anteriormente, aún no se ha desarrollado una vacuna eficaz para edwardsielosis en la dorada del Japón.

30

35

“La estreptococosis” en el falso halibut se refiere colectivamente a enfermedades producidas por *Streptococcus iniae*, *S. parauberis* y *Lactococcus garvieae*. Aunque se ha desarrollado una vacuna para la infección por *Streptococcus iniae*, la aparición frecuente de una enfermedad inducida por *Streptococcus parauberis* ha producido grandes pérdidas económicas. Por lo tanto, ha surgido la demanda del desarrollo de una vacuna para la prevención completa de las estreptococosis. Mientras tanto, en las piscifactorías, a menudo aparecen conjuntamente la edwardsielosis y la estreptococosis en forma de una infección mixta. Por lo tanto, ha surgido la demanda del desarrollo de una vacuna de combinación que presente efectos apropiados sobre estas dos enfermedades.

40

45

Documento 1 no correspondiente a una patente: Mekuchi, *et al.*; Fish Pathology, 30 (4), 251-256: 1995.

50 Descripción de la invención**Problemas a solucionar mediante la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar una vacuna eficaz para la edwardsielosis o la estreptococosis en un pez tal como el falso halibut o la dorada del Japón.

55

Medios para solucionar los problemas

Los presentes inventores han descubierto que cuando se mezclan células inactivadas de una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de falso halibut con células inactivadas de una cepa atípica de *Edwardsiella tarda* procedente de un pez tal como la dorada del Japón o sargo púrpura, y la mezcla se administra como una vacuna a un falso halibut, en presencia de una mezcla de linfocitos y macrófagos aislados a partir del falso halibut, los macrófagos fagocitan y destruyen rápidamente las células vivas de la cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del falso halibut. Además, los presentes inventores han descubierto que cuando esta vacuna se administra a un falso halibut, y el falso halibut se expone a *Edwardsiella tarda*, la vacuna presenta un alto efecto protector contra *Edwardsiella tarda*. Además, los presentes inventores han descubierto que cuando esta vacuna se emplea en combinación con *Streptococcus iniae* y/o *Streptococcus parauberis* enteros, la vacuna de combinación resultante es eficaz tanto para la edwardsielosis como para la estreptococosis en el falso halibut. Además, los presentes inventores han descubierto que cuando se mezclan

60

65

células inactivadas de una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de un pez diana distinto del falso halibut (por ejemplo, el dorada del Japón) con células inactivadas de una cepa de *Edwardsiella tarda* típica o atípica procedente del pez diana, y la mezcla se administra como una vacuna al pez diana, la vacuna presenta un alto efecto protector contra *Edwardsiella tarda* en el pez diana.

5

Por consiguiente, la presente invención proporciona una vacuna para la edwardsielosis en un pez diana, que comprende células inactivadas de (A) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana, y células inactivadas de (B) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de un pez distinto del pez diana, donde cuando la cepa (A) es una cepa típica de *Edwardsiella tarda*, la cepa (B) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*, mientras que cuando la cepa (A) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*, la cepa (B) es una cepa típica de *Edwardsiella tarda*.

10

La presente invención también proporciona una vacuna para la edwardsielosis y/o estreptococosis en un pez diana, que comprende células inactivadas de (A) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana; células inactivadas de (B) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de un pez distinto del pez diana; y células inactivadas de (C) *Streptococcus iniae* y/o *Streptococcus parauberis*, donde, cuando la cepa (A) es una cepa típica de *Edwardsiella tarda*, la cepa (B) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*, mientras que cuando la cepa (A) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*, la cepa (B) es una cepa típica de *Edwardsiella tarda*.

15

Hasta ahora, la aparición de muchas infecciones en peces cultivados ha producido grandes pérdidas económicas. Sin embargo, el empleo de la vacuna de la presente invención puede prevenir de forma fiable la edwardsielosis en un pez, para la que aún no se ha desarrollado ninguna vacuna eficaz. Además, el empleo de la vacuna de la presente invención puede prevenir de forma fiable una infección mixta de *Edwardsiella tarda* y *Streptococcus* en un pez.

20

Mejores modos para realizar la invención

25

La vacuna para la edwardsielosis en un pez diana de la presente invención contiene células inactivadas de (A) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana, y células inactivadas de (B) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de un pez distinto del pez diana, donde, cuando la cepa (A) es una cepa típica de *Edwardsiella tarda*, la cepa (B) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*, mientras que cuando la cepa (A) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*, la cepa (B) es una cepa típica de *Edwardsiella tarda*. Como se usa en el presente documento, la expresión “pez diana” se refiere a un pez al que se le administra la vacuna de la presente invención.

30

En la presente invención, no se impone ninguna limitación particular sobre el pez diana, siempre que sea un pez que pueda infectarse por *Edwardsiella tarda*. Los ejemplos del pez diana incluyen peces para cultivo que puedan infectarse con *Edwardsiella tarda*, tales como peces que puedan infectarse con *Edwardsiella tarda* típica (por ejemplo, falso halibut, anguila, pez gato y tilapia), y peces que pueden infectarse con *Edwardsiella tarda* atípica (por ejemplo, dorada del Japón, sargo púrpura y pez limón del Japón). De éstos, se prefieren el falso halibut, la anguila, el pez gato y la dorada del Japón, cuya infección con *Edwardsiella tarda* puede producir grandes pérdidas económicas.

35

Como se sabe, la *Edwardsiella tarda* típica, que puede infectar al falso halibut, la anguila, el pez gato o la tilapia, es una bacteria móvil que tiene flagelos peritricos, mientras que la *Edwardsiella tarda* atípica, que puede infectar, por ejemplo, a la dorada del Japón, el sargo púrpura o el pez limón del Japón, es una bacteria que se clasifica dentro del mismo grupo de *Edwardsiella tarda*, pero difiere de la bacteria *Edwardsiella tarda* típica en que no tiene flagelos peritricos ni motilidad.

40

Como se usa en el presente documento, el “falso halibut” incluye peces para cultivo que pertenecen al orden (o suborden) *Pleuronectiformes*; específicamente, falso halibut (*Paralichthys olivaceus*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), platija de barfin (*Verasper moseri*) y fletán manchado (*Verasper variegatus*). Como se usa en este documento, la expresión “dorada del Japón” incluye peces para cultivo que pertenecen al orden (o suborden) *Perciformes*, la familia *Sparidae*; específicamente, la dorada del Japón (*Pagus major*), el pargo de cabeza negra (*Acanthopagrus schlegeli*), el sargo púrpura (*Evynnis japónica*) y el pargo amarillo (*Taius tumifrons*). Como se usa en este documento, “tilapia” incluye la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), tilapia mossambica (*Oreochromis mossambicus*), y la tilapia roja (híbrido de *O. mossambicus* y *O. urolepis hornorum*). Como se usa en este documento, “pez limón del Japón” incluye la cola amarilla (*Seriola quinqueradiata*), serviola (*Seriola dumerili*) y el jurel (*Seriola lalandi*). Como se usa en este documento, “anguila” incluye la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) y la anguila europea (*Anguilla anguilla*). Como se usa en este documento, “pez gato” incluye el pez gato punteado (*Ictalurus punctatus*).

55

La cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana (A) puede ser, por ejemplo, una cepa que se ha aislado, en un método habitual, a partir de un pez diana infectado con *Edwardsiella tarda*. Los ejemplos de la cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del falso halibut (A) incluyen OA-3, EH-5 y UH-2. Los ejemplos de la cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de la dorada del Japón incluyen UT-1, UT-4 e YK-1. Los ejemplos de la cepa *Edwardsiella tarda* procedentes de anguila incluyen NES-2 y SE-6.

60

Las células inactivadas de dicha cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana pueden ser, por ejemplo, células destruidas con formalina, células destruidas térmicamente, células destruidas con fenol, o células destruidas con luz UV. De éstas, se prefieren las células destruidas con formalina. Generalmente, el tratamiento con formalina se realiza añadiendo formalina a un líquido que contiene las células para conseguir una concentración de formalina del 0,3 al 0,7%.

65

ES 2 368 981 A1

El número de células inactivadas de la cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana (A) preferiblemente es de 10^8 a 10^{11} CFU/ml.

5 Como se ha descrito anteriormente, cuando la cepa de *Edwardsiella tarda* (A) es una cepa de *Edwardsiella tarda* típica, la cepa de *Edwardsiella tarda* (B) (es decir, la cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de un pez distinto del pez diana mencionado anteriormente) es una cepa de *Edwardsiella tarda* atípica, mientras que cuando la cepa de *Edwardsiella tarda* (A) es una cepa de *Edwardsiella tarda* atípica, la cepa de *Edwardsiella tarda* (B) es una cepa de *Edwardsiella tarda* típica. Por lo tanto, por ejemplo, cuando el pez diana es un falso halibut, la cepa de *Edwardsiella tarda* (A) es una cepa de *Edwardsiella tarda* típica y de esta manera las células inactivadas de la cepa *Edwardsiella*
10 *tarda* (B) son las de una cepa de *Edwardsiella tarda* atípica (por ejemplo, una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de la dorada del Japón). Cuando el pez diana es la dorada del Japón, la cepa de *Edwardsiella tarda* (A) es una cepa de *Edwardsiella tarda* atípica, y de esta forma las células inactivadas de la cepa de *Edwardsiella tarda* (B) son las de una cepa de *Edwardsiella tarda* típica (por ejemplo, una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del falso halibut). La cepa de *Edwardsiella tarda* (B) se aísla, en un método habitual, a partir de un pez infectado con
15 *Edwardsiella tarda*. La inactivación de las células de la cepa de *Edwardsiella tarda* (B) se realiza de una manera similar a la descrita anteriormente en el caso de las células de la cepa de *Edwardsiella tarda* procedentes del pez diana.

20 El número de células inactivadas de la cepa *Edwardsiella tarda* (B) es preferiblemente 10^8 a 10^{11} CFU/ml.

La relación entre el número de células inactivadas de la cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana (A) y el número de células inactivadas de la cepa de *Edwardsiella tarda* (B) es preferiblemente 1:(de 0,1 a 1), de una forma particularmente preferida 1:(de 0,5 a 1).

25 La vacuna para la edwardsielosis y/o la estreptococosis en un pez de la presente invención contiene células inactivadas de las cepas de la *Edwardsiella tarda* mencionadas anteriormente (A) y (B) y células inactivadas de (C) *Streptococcus iniae* y/o *Streptococcus parauberis*. En esta vacuna, preferiblemente, las células inactivadas de la cepa de *Edwardsiella tarda* (A) son las de una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del falso halibut, y las células inactivadas de la cepa de *Edwardsiella tarda* (B) son las de una cepa de *Edwardsiella tarda* atípica. Es decir, esta vacuna
30 preferiblemente es una vacuna para la edwardsielosis y/o la estreptococosis en el falso halibut.

Las células inactivadas de *Streptococcus iniae* pueden ser las de una cepa disponible comúnmente (por ejemplo, KH-2, ES-1, MK-1 o EY-5). Las células inactivadas de *Streptococcus parauberis* pueden ser las de una cepa disponible comúnmente (por ejemplo, AM-1, AM-4, AK-3 o US-6). La inactivación de células de esta cepa se realiza de una
35 manera similar a la descrita anteriormente en el caso de las células de la cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana.

Preferiblemente, se emplean células inactivadas de una cepa de *Streptococcus iniae* en combinación con células inactivadas de una cepa de *Streptococcus parauberis*. El número de células inactivadas de cada una de estas cepas
40 preferiblemente es 10^8 a 10^{11} CFU/ml.

De una forma particularmente preferida, la vacuna para la edwardsielosis y/o la estreptococosis en un pez contiene células inactivadas de las cuatro cepas siguientes: la cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana (A); la cepa de *Edwardsiella tarda* (B); una cepa de *Streptococcus iniae* (C1); y una cepa de *Streptococcus parauberis* (C2).
45

Las proporciones entre los números de células inactivadas de la cepa (A), cepa (B), y cada una de las dos cepas (C) mencionadas anteriormente preferiblemente son 1:(de 0,1 a 1):(de 1 a 10), de una forma particularmente preferida 1:(de 0,5 a 1):(de 1 a 3). Cuando se emplean células inactivadas de las cepas (A), (B), (C1) y (C2) en combinación
50 como se ha descrito anteriormente, las proporciones de los números de células inactivadas de las cepas (A), (B), (C1) y (C2) son preferiblemente 1:(de 0,1 a 1):(de 1 a 10):(de 1 a 10), de una forma particularmente preferida 1:(de 0,5 a 1):(de 1 a 3):(de 1 a 3).

La vacuna de la presente invención puede proporcionarse en forma de un kit que incluye productos farmacéuticos separados, conteniendo cada uno células inactivadas de una de las cepas mencionadas anteriormente. Sin embargo, la
55 vacuna preferiblemente se proporciona en forma de un solo producto farmacéutico que contiene células inactivadas de todas las cepas mencionadas anteriormente, desde el punto de vista de la administración de la vacuna.

La vacuna de la presente invención puede proporcionarse en forma de una administración para inyección u oral. Para el caso de la inyección, puede añadirse solución salina a las células inactivadas mencionadas anteriormente. En
60 el caso de la administración oral, puede prepararse un producto oral en polvo o granulado añadiendo un excipiente a la vacuna, o puede producirse un producto oral, por ejemplo, mezclando la vacuna con un alimento.

Cuando la vacuna de la presente invención se administra a un pez diana, por ejemplo, la vacuna se inyecta por vía intramuscular, intraperitoneal, o similar. En el caso de la inyección, preferiblemente, la vacuna (aproximadamente 0,1 ml) se inyecta por vía intramuscular en un pez diana que tiene un peso corporal de aproximadamente 100 g. Cuando la
65 vacuna se inyecta en un pez diana que tiene un peso corporal que difiere mucho del descrito anteriormente, la cantidad de la vacuna inoculada se aumenta o se reduce de acuerdo con el peso corporal. En el caso de la administración oral, preferiblemente, la vacuna (dosis diaria: de 1 a 10 ml/kg de peso corporal) se administra a un pez diana durante 5

ES 2 368 981 A1

a 10 días mezclando la vacuna con un pienso granulado húmedo, o por pulverización en un pienso sólido, de una suspensión preparada suspendiendo la vacuna en una cantidad de agua que es del 5 al 10% del peso del pienso.

El mecanismo de acción de la vacuna de la presente invención no se ha esclarecido totalmente. Sin embargo, posiblemente, el mecanismo de acción no se atribuye a la antigenicidad específica de ninguna de las cepas mencionadas anteriormente (por ejemplo, la cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de un pez diana), sino a la activación de la capacidad bactericida de los fagocitos junto con los linfocitos, activándose dicha capacidad únicamente en el caso en el que la cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana está presente conjuntamente con *Edwardsiella tarda* típica o atípica procedente de un pez distinto del pez diana.

Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación con más detalle por medio de ejemplos, que no deben considerarse limitantes de la invención.

Ejemplo 1

Actividad fagocítica de leucocitos procedentes de falso halibut en el que se ha inoculado la vacuna de la presente invención

Método de ensayo: Se dividieron falsos halibuts (peso corporal medio: 310 g) en tres grupos (grupos 1 a 3), incluyendo cada grupo 10 peces, y los falsos halibuts se criaron a una temperatura del agua de 23°C. se asignaron falsos halibuts del grupo 1 (es decir, grupo de la invención) para recibir una vacuna producida mezclando partes iguales de células destruidas con formalina (preparadas por tratamiento con formalina después de un cultivo de 30 horas en caldo Trypto-soya a 25°C) de una cepa OA-3 de *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) procedente de falso halibut (número aproximado de células: $1,8 \times 10^9$ CFU/ml) y células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita anteriormente) de la cepa UT-1 de *E. tarda* procedente de dorada del Japón (número aproximado de células: $1,2 \times 10^9$ CFU/ml). Los falsos halibuts del grupo 2 (es decir, grupo de control) se asignaron a recibir una vacuna producida usando células destruidas con formalina (preparadas de una forma similar a la descrita anteriormente) de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut (número aproximado de células: $3,6 \times 10^9$ CFU/ml). Los falsos halibuts del grupo 3 (es decir, del grupo de control) se asignaron a recibir caldo Trypto-soya que contenía formalina 0,5%. Cada una de estas vacunas (0,1 ml) se inoculó por vía intramuscular en un falso halibut en la parte superior de la aleta pectoral. Treinta días después de inocular la vacuna, se recogió sangre de cinco falsos halibuts de cada grupo a través del vaso sanguíneo de la cola mediante el uso de una jeringa tratada con heparina sódica. La sangre recogida de esta manera se empleó en los experimentos descritos más adelante.

Se suspendieron células de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut en solución salina, y la suspensión se dejó en reposo a 60°C durante 10 minutos, seguido de centrifugación. Posteriormente, las células se suspendieron en agua destilada de forma que el número de células fuera de aproximadamente 2×10^{10} CFU/ml. La suspensión celular (2 ml) se añadió a una placa petri de plástico (diámetro: 6 cm) y se dejó en reposo durante una hora. Posteriormente, se retiró el sobrenadante resultante usando una pipeta Pasteur, seguido de secado con un secador. Se añadió sangre (1,5 ml) recogida de cada uno de los falsos halibuts en los que se había inoculado la vacuna mencionada anteriormente a la placa petri y la placa petri se dejó en reposo a 23°C durante 30 minutos. Después se retiró la sangre usando una pipeta Pasteur y la superficie de las células se lavó con solución salina. La placa petri se secó con un secador y las células se fijaron con metanol y después se sometieron a Tinción Giemsa. Posteriormente se determinó el área de las placas fagocíticas con un microscopio usando R1PP2. La Tabla 1 muestra los grupos de ensayo empleados en los Ejemplos 1 y 2.

TABLA 1

Grupos de ensayo y tipos de vacuna en los Ejemplos 1 y 2

Grupo de Ensayo	Tipo de vacuna	Número aproximado de células (CFU/ml)
Grupo 1	Células destruidas con formalina de cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$1,8 \times 10^9$
	Células destruidas con formalina de cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$1,2 \times 10^9$

ES 2 368 981 A1

Grupo de Ensayo	Tipo de vacuna	Número aproximado de células (CFU/ml)
Grupo 2 (grupo de control)	Células destruidas con formalina de cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	3,6 x 10 ⁹
Grupo 3 (grupo de control)	Caldo Trypto-soya que contiene formalina al 0,5%	0

Resultados del ensayo: La Tabla 2 muestra la actividad fagocítica de leucocitos de falsos halibuts del grupo de la invención y de los grupos de control contra células de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut, determinada por el número de placas en 10 campos visuales, el área por una placa y el área total de todas las placas. En los grupos 1 ó 2, en los que en los falsos halibuts se inocularon células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda*, el número de placas (correspondiente al número de leucocitos que fagocitaban las células bacterianas) fue mayor que en el grupo 3, en el que en los falsos halibuts se inoculó el medio de cultivo. Particularmente en el grupo 1, en el que en los falsos halibuts se inocularon células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, el número de placas fue significativamente mayor que en los grupos 2 ó 3 ($p < 0,05, 0,01$). En el grupo 1 en el que en los falsos halibuts se inocularon células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, el área por una placa (correspondiente a la capacidad fagocítica de leucocitos individuales) fue significativamente mayor que en los grupos 2 ó 3 ($p < 0,05, 0,01$). En los grupos 1 y 2, en este orden, el área total de placas (correspondiente a la capacidad fagocítica total de los leucocitos) fue mayor. En particular en el grupo 1, el área total de las placas fue significativamente mayor que en los grupos 2 ó 3 ($p < 0,05, 0,01$). Estos datos indican que cuando en un falso halibut se inocula la vacuna de la presente invención (es decir, células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón), la actividad fagocítica de los leucocitos contra *E. tarda* se aumenta significativamente. Al mismo tiempo, aunque un falso halibut se inoculara con células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut únicamente, los leucocitos del falso halibut presentaban una mayor actividad fagocítica.

TABLA 2

Ejemplo 1 Actividad fagocítica de leucocitos de falsos halibuts del grupo de la invención y de los grupos de control

Grupo de ensayo	Número de placas	Área por una placa (μm^2)	Área total de placas (μm^2)
Grupo 1	318 ± 29*1	233 ± 18*1	74094 ± 10096*1
Grupo 2	261 ± 27	186 ± 20	48546 ± 10242
Grupo 3	87 ± 15	135 ± 12	11745 ± 3069

*1: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05, 0,01$) en la actividad fagocítica entre el grupo 1 y los grupos 2 ó 3.

Ejemplo 2

Actividad bactericida de macrófagos de falso halibut inoculado con la vacuna de la presente invención

Método de ensayo: De una forma similar a la descrita anteriormente, se recogió sangre de cinco falsos halibuts (distintos de los cinco falsos halibuts de los que se recogió sangre en el Ejemplo 1) de 10 falsos halibuts de cada uno de los grupos mostrados en la Tabla 1. Se separaron los macrófagos y los linfocitos de la sangre recogida de esta manera por centrifugación en gradiente de densidad de Percoll. Se preparó una muestra que contenía tanto macrófagos (aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células/ml) como linfocitos (aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células/ml) y también se preparó una muestra que sólo contenía macrófagos (aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células/ml). Cada una de las muestras se suspendió en solución de Hank y se pusieron alícuotas (0,2 ml de cada) de la suspensión en cubreobjetos respectivos, seguido del cultivo con un 5% de CO₂ y a 25°C durante una hora. Al cultivo resultante se le añadió una suspensión (0,1 ml) de células de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut (número de células: aproximadamente 3×10^6

CFU/ml) opsonizadas con suero procedente del mismo falso halibut del que se obtuvieron los leucocitos, y la reacción se realizó durante una hora en las condiciones mencionadas anteriormente. Después de terminarse la reacción, se retiraron los linfocitos y las células bacterianas no fagocitadas de la muestra, y la muestra en uno de los cubreobjetos se sometió a tinción con naranja de acridina. Para las muestras de los otros cubreobjetos se continuó el cultivo y dos horas, tres horas o cuatro horas después se realizó la tinción de una forma similar a la descrita anteriormente. De esta manera, se observó si los macrófagos destruían las células bacterianas o no con un microscopio de fluorescencia.

Resultados del ensayo: La Tabla 3 muestra la actividad bactericida de macrófagos de falsos halibuts del grupo de la invención y de los grupos de control contra células de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut. En la Tabla 3, la actividad bactericida se representa por el porcentaje de destrucción de células (%). En el grupo 1 (es decir, el grupo de la invención), en el que se inocularon falsos halibuts con células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, la actividad bactericida de los macrófagos fue mayor que en los grupos 2 ó 3. Particularmente, en el caso en el que la reacción se realizó durante dos horas o más, se observó una diferencia significativa ($p < 0,05, 0,01$) en la actividad bactericida entre el grupo 1 y los grupos 2 ó 3. Estos datos indicaron que los macrófagos de falsos halibuts del grupo 1 (es decir, el grupo de la invención) fagocitaban células bacterianas y después destruían rápidamente las células bacterianas. En el grupo 1, cuando los macrófagos estaban presentes conjuntamente con linfocitos, la actividad bactericida de los macrófagos fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en el caso en el que sólo estaban presentes macrófagos. Esto sugiere que los efectos de los linfocitos sobre los macrófagos aumentan por la inoculación en el falso halibut de células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedentes de falso halibut y de dorada del Japón.

TABLA 3

Ejemplo 2 Actividad bactericida de macrófagos de falsos halibuts del grupo de la invención y de los grupos de control Grupo de Ensayo		Tiempo de reacción (h)			
		1	2	3	4
Grupo 1*	Co-presencia de macrófagos y linfocitos ²	62 ± 8	74 ± 5	91 ± 12	98 ± 7
	Presencia de macrófagos únicamente	43 ± 7	58 ± 6	64 ± 8	76 ± 9
Grupo 2	Co-presencia de macrófagos y linfocitos	51 ± 5	42 ± 7	30 ± 7	26 ± 4
	Presencia de macrófagos únicamente	40 ± 6	38 ± 5	29 ± 4	22 ± 3
Grupo 3	Co-presencia de macrófagos y linfocitos	33 ± 6	27 ± 4	20 ± 5	14 ± 4
	Presencia de macrófagos únicamente	36 ± 4	29 ± 5	18 ± 3	15 ± 3

*1: En el caso en el que la reacción se realizó durante dos horas o más, se observó una diferencia significativa ($p < 0,05, 0,01$) en la actividad bactericida entre el grupo 1 y el grupo 2 ó 3.

*2: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la actividad bactericida entre el caso de la co-presencia de macrófagos y linfocitos y el caso de presencia de macrófagos únicamente.

Ejemplo 3

Actividad bactericida de macrófagos de falso halibut al que se ha administrado por vía oral la vacuna de la presente invención

Método de ensayo: Se dividieron falsos halibuts (peso corporal medio: 375 g) en dos grupos (grupos 1 y 2), incluyendo cada uno cinco peces, y los falsos halibuts se criaron a una temperatura del agua de 24°C. Los falsos halibuts del grupo 1 (es decir, el grupo de la invención) se asignaron a recibir una vacuna producida mezclando partes iguales de células destruidas con formalina (preparadas por tratamiento con formalina después de un cultivo de 24 horas en caldo Trypto-soya a 25°C) de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut (número aproximado de células: $3,4 \times 10^{10}$ CFU/ml) y células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita anteriormente) de la cepa UT-1 de *E. tarda* procedente de dorada del Japón (número aproximado de células $3,0 \times 10^{10}$ CFU/ml). Los falsos halibuts del grupo 2 (es decir, grupo de control) se asignaron a recibir una vacuna producida usando células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita anteriormente) de cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut (número aproximado de células: $6,8 \times 10^{10}$ CFU/ml). Cada una de estas vacunas se mezcló con gránulos húmedos de forma que la dosis diaria de la vacuna fue de 1 ml para un falso halibut, y la mezcla se administró por vía oral a cada falso halibut durante siete días por medio del uso de una jeringa que tenía un tubo de vinilo fino. Treinta días después de la administración oral, se recogió sangre de cinco falsos halibuts

ES 2 368 981 A1

de cada grupo de cada grupo a través del vaso sanguíneo de la cola usando una jeringa tratada con heparina sódica, y la actividad bactericida de los macrófagos se evaluó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 2. La Tabla 4 muestra grupos de ensayo empleados en el Ejemplo 3.

TABLA 4

Grupos de ensayo y tipos de vacuna en el Ejemplo 3

Grupo de ensayo	Tipo de vacuna	Número aproximado de células (CFU/ml)
Grupo 1	Células destruidas con formalina de cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$3,4 \times 10^{10}$
	Células destruidas con formalina de cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$3,0 \times 10^{10}$
Grupo 2 (grupo de control)	Células destruidas con formalina de cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$6,8 \times 10^{10}$

Resultados del ensayo: La Tabla 5 muestra la actividad bactericida de macrófagos de falsos halibuts que recibieron la vacuna por vía oral del grupo de la invención y del grupo de control contra células de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut. En la Tabla 5, la actividad bactericida se representa por el porcentaje de destrucción celular (%). En el grupo 1 (es decir, el grupo de la invención), en el que falsos halibuts recibieron por vía oral una mezcla de células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut y células de la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón, la actividad bactericida de los macrófagos fue mayor que en el grupo 2, en el que falsos halibuts recibieron por vía oral únicamente células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut. En particular, en el caso en el que la reacción se realizó durante dos horas o más, se observó una diferencia significativa ($p < 0,05, 0,01$) en la actividad bactericida entre el grupo 1 y el grupo 2. Estos datos indicaron que los macrófagos de los falsos halibuts del grupo 1 (es decir, el grupo de la invención) fagocitaban células bacterianas y después destruían rápidamente a las células bacterianas. En el grupo 1, cuando los macrófagos estaban presentes conjuntamente con linfocitos, la actividad bactericida de los macrófagos era significativamente mayor ($p < 0,05$) que en el caso en el que sólo estaban presentes macrófagos. Esto sugiere que el efecto de los linfocitos sobre los macrófagos se aumenta por la administración, al falso halibut, de una mezcla de células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut y células de la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón.

TABLA 5

Ejemplo 3 Actividad bactericida de macrófagos de falsos halibuts del grupo de la invención y del grupo de control

Grupo de Ensayo		Tiempo de reacción (h)			
		1	2	3	4
Grupo 1 ^{*1}	Co-presencia de macrófagos y linfocitos ^{*2}	57 ± 5	69 ± 7	80 ± 6	86 ± 9
	Presencia de macrófagos únicamente	42 ± 6	54 ± 6	62 ± 9	68 ± 7
Grupo 2	Co-presencia de macrófagos y linfocitos	39 ± 7	37 ± 4	28 ± 4	23 ± 3
	Presencia de macrófagos únicamente	41 ± 6	30 ± 5	21 ± 3	18 ± 2

*1: En el caso en el que la reacción se realizó durante dos horas o más, se observó una diferencia significativa ($p < 0,05, 0,01$) en la actividad bactericida entre el grupo 1 y el grupo 2.

*2: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la actividad bactericida entre caso de la co-presencia de macrófagos y linfocitos y el caso de la presencia de macrófagos únicamente.

Ejemplo 4

Efecto de la vacuna de la presente invención en la prevención de edwardsielosis en falso halibut - estudio sobre la cantidad de antígeno apropiada

5

Método de ensayo: Se dividieron falsos halibuts (peso corporal medio: 96 g) en ocho grupos (grupos 1 a 8), incluyendo cada grupo 60 peces, y los falsos halibuts de los ocho grupos se pusieron respectivamente en ocho depósitos de agua FRP (2,5 m × 1,5 m × 1,0 m (altura)). Los falsos halibuts se criaron a una temperatura del agua de 19 a 25°C durante 10 meses, durante los cuales se subagruparon según crecían. Los falsos halibuts de los grupos 1 a 3 (es decir, los grupos de la invención) se asignaron a recibir una vacuna producida mezclando células destruidas con formalina (preparadas por tratamiento con formalina después de un cultivo de 30 horas en caldo Trypto-soya a 25°C) de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut y células de la cepa UT-1 de *E. tarda* procedente de dorada del Japón (el número de células de cada cepa se muestra en la Tabla 6). Los falsos halibuts de los grupos 4 a 6 (es decir, los grupos de control) se asignaron a recibir una vacuna producida usando células destruidas con formalina (preparadas de una forma similar a la descrita anteriormente) de una cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut (el número de células se muestra en la Tabla 6). Los falsos halibuts del grupo 7 (es decir, el grupo de control) se asignaron a recibir una vacuna producida usando células destruidas con formalina (preparadas de una forma similar a la descrita anteriormente) de la cepa UT-1 de *E. tarda* procedente de dorada del Japón (el número de células se muestra en la Tabla 6). Los falsos halibuts del grupo 8 (es decir, el grupo de control) se asignaron a recibir caldo Trypto-soya que contenía formalina al 0,5%.

20

Cada una de estas vacunas (0,1 ml) se inoculó por vía intramuscular en un falso halibut en la parte superior de la aleta pectoral. Un mes, seis meses o 10 meses después de la inoculación de la vacuna, se expusieron 20 falsos halibuts de cada grupo con células de la cepa OA-3 de *E. tarda* (que se habían cultivado de una manera similar a la descrita anteriormente) sumergiendo los falsos halibuts durante 30 minutos en agua de mar en la que se suspendieron células OA-3 de *E. tarda* (número aproximado de células: $8,5 \times 10^7$ CFU/ml). Los falsos halibuts expuestos de esta manera se observaron durante 30 días después de la exposición, y se determinó la tasa de supervivencia.

30

TABLA 6

Grupos de ensayo y vacunas (número de células) en el Ejemplo 4

35

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml)
Grupo 1	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$1,2 \times 10^7$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$1,0 \times 10^7$
Grupo 2	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$1,2 \times 10^8$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$1,0 \times 10^8$

55

60

65

ES 2 368 981 A1

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml)
Grupo 3	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	1,2 x 10 ¹⁰ 1,0 x 10 ¹⁰
Grupo 4 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	2,4 x 10 ⁷
Grupo 5 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	2,4 x 10 ⁸
Grupo 6 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	2,4 x 10 ¹⁰
Grupo 7 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	2,4 x 10 ⁸
Grupo 8 (grupo de control)	60	Caldo Trypto-soya que contiene formalina al 0,5%	0

Resultados del ensayo: La Tabla 7 muestra datos sobre la tasa de supervivencia de falsos halibuts de la invención y grupos de control, determinada después de la exposición a *E. tarda* realizada 1, 6, ó 10 meses después de la inoculación de la vacuna. Entre los falsos halibuts de los grupos de la invención (grupos 1 a 3), que se inocularon con una vacuna producida a partir de células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, se reveló lo siguiente. Es decir, en los falsos halibuts de los grupos 2 y 3, en los que el número de células en la vacuna era de 10⁸ a 10¹⁰ CFU/ml, la tasa de supervivencia determinada después de la exposición a *E. tarda* realizada 1, 6 ó 10 meses después de la inoculación de la vacuna fue significativamente superior ($p < 0,05$, 0,01) que en los falsos halibuts de los grupos de control (grupos 4 a 8). En los falsos halibuts de los grupos de la invención, se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el número de supervivientes entre el grupo 1 y los grupos 2 ó 3. Estos datos indican que cuando sólo se administran células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut o procedente de dorada del Japón, no se obtiene suficientemente el efecto de la prevención de la edwardsielosis, mientras que cuando se administra una mezcla de células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut y células de la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón a un falso halibut, se aumenta el efecto de protección del falso halibut frente a la infección con *E. tarda*, y puede prevenirse el desarrollo de la enfermedad por el falso halibut. Además, estos datos sugieren que cuando la mezcla se emplea como una vacuna, el número apropiado de células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut o procedente de dorada del Japón (es decir, la cantidad apropiada de antígeno) es de aproximadamente 10⁸ a aproximadamente 10¹⁰ CFU/ml.

ES 2 368 981 A1

TABLA 7

Ejemplo 4 Tasa de supervivencia (%) de falsos halibuts de los grupos de la invención y de control después de la exposición a *E. tarda*

Grupo de ensayo	Meses transcurridos después de la inoculación de la vacuna		
	1	6	10
Grupo 1	75 (15/20)* ¹	55 (11/20)	40 (8/20)
Grupo 2 ^{2, 3}	95 (19/20)	100 (20/20)	85 (17/20)
Grupo 3 ^{2, 3}	90 (18/20)	95 (19/20)	90 (18/20)
Grupo 4 (grupo de control)	30 (6/20)	35 (7/20)	15 (3/20)
Grupo 5 (grupo de control)	50 (10/20)	45 (9/20)	30 (6/20)
Grupo 6 (grupo de control)	55 (11/20)	40 (8/20)	30 (6/20)
Grupo 7 (grupo de control)	45 (9/20)	35 (7/20)	25 (5/20)
Grupo 8 (grupo de control)	15 (3/20)	25 (5/20)	20 (4/20)

*1: (Número de peces supervivientes/número de peces ensayados)

*2: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$, $0,01$) en la tasa de supervivencia entre los grupos 4 a 8 y los grupos 2 y 3.

*3: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el número de supervivientes (6 meses o más después de la inoculación de la vacuna) entre el grupo 1 y los grupos 2 ó 3.

Ejemplo 5

Efecto de la vacuna de la presente invención en la prevención de edwardsielosis en falso halibut - estudio sobre la relación de mezcla de dos cepas bacterianas empleadas en la vacuna

Método de ensayo: Se dividieron falsos halibuts (peso corporal medio: 125 g) en seis grupos (grupos 1 a 6), incluyendo cada grupo 40 peces, y se pusieron falsos halibuts de los seis grupos respectivamente en seis depósitos de agua FRP (2,5 m × 1,5 m × 1,0 m (altura)). Los falsos halibuts se criaron a una temperatura del agua de 20 a 25°C durante seis meses. Los falsos halibuts de los grupos 1 a 4 (es decir, los grupos de la invención) se asignaron a recibir una vacuna producida mezclando células destruidas con formalina (preparadas por tratamiento con formalina después de un cultivo de 30 horas en caldo Trypto-soya a 25°C) de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut y células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita anteriormente) de la cepa UT-1 de *E. tarda* procedente de dorada del Japón (el número de células de cada cepa se muestra en la Tabla 8). Los falsos halibuts del grupo 5 (es decir, grupo de control) se asignaron a recibir una vacuna producida usando células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita anteriormente) de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut. Los falsos halibuts del grupo 6 (es decir, grupo de control) se asignaron a recibir caldo Trypto-soya que contenía formalina al 0,5%.

Cada una de estas vacunas (0,1 ml) se inoculó por vía intramuscular en un falso halibut en la parte superior de la aleta pectoral. Un mes o seis meses después de la inoculación de la vacuna, se expusieron 20 falsos halibuts de cada grupo a células de la cepa OA-3 de *E. tarda* (que se había cultivado de una manera similar a la descrita anteriormente) sumergiendo los falsos halibuts durante 30 minutos en agua de mar en la que se suspendieron células OA-3 de *E. tarda* (número aproximado de células: $8,3 \times 10^7$ CFU/ml). Los falsos halibuts expuestos de esta manera se observaron durante 30 días y se determinó la tasa de supervivencia.

ES 2 368 981 A1

TABLA 8

Grupos de ensayos y vacunas (números de células) en el Ejemplo 5

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml)
Grupo 1	40	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$1,4 \times 10^8$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$1,2 \times 10^7$
Grupo 2	40	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$1,4 \times 10^9$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$1,2 \times 10^8$
Grupo 3	40	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$1,4 \times 10^9$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$1,2 \times 10^9$
Grupo 4	40	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$1,4 \times 10^9$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$1,2 \times 10^{10}$
Grupo 5 (grupo de control)	40	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$2,8 \times 10^9$
Grupo 6 (grupo de control)	40	Caldo Trypto-soya que contiene formalina al 0,5%	0

Resultados del Ensayo: La Tabla 9 muestra datos sobre la tasa de supervivencia de falsos halibuts de grupos de la invención y de grupos de control, determinada después de la exposición a *E. tarda* realizada uno o seis meses después de la inoculación de la vacuna. Entre los falsos halibuts de los grupos de la invención (grupos 1 a 4) que se inocularon con una vacuna producida a partir de células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, se reveló lo siguiente. Es decir, en los falsos halibuts de los grupos 2 ó 3, en los que el número de células de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut era de 10^9 CFU/ml y el número de células de la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón era de 10^8 CFU/ml o ligeramente menor que el de las células de *E. tarda* procedente de falso halibut, la tasa de supervivencia determinada después de la exposición a *E. tarda* realizada uno o seis meses después de la inoculación de la vacuna fue significativamente mayor ($p < 0,05$, $0,01$) que en los falsos halibuts de los grupos de control (grupos 5 y 6). Por el contrario, cuando el número de células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón fue mayor en un orden que el de las células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut, o se redujo a aproximadamente 10^7 CFU/ml, la tasa de supervivencia fue baja.

Estos datos indican que la relación entre el número de células inactivadas de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut y el de las células inactivadas de la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón es un factor importante para la expresión de los efectos de la vacuna de la presente invención.

ES 2 368 981 A1

TABLA 9

Ejemplo 5 Tasa de supervivencia (%) de falsos halibuts de grupos de la invención y de grupos de control después de la exposición a *E. tarda*

Grupo de ensayo	Meses transcurridos después de la inoculación de la vacuna	
	1	6
Grupo 1	65 (13/20)*1	55 (11/20)
Grupo 2*2	95 (19/20)	80 (16/20)
Grupo 3*2	100 (20/20)	95 (19/20)
Grupo 4	60 (12/20)	55 (11/20)
Grupo 5 (grupo de control)	50 (10/20)	40 (8/20)
Grupo 6 (grupo de control)	20 (4/20)	15 (3/20)

*1: (Número de peces supervivientes/número de peces ensayados)

*2: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05, 0,01$) en la tasa de supervivencia entre los grupos de control (grupos 5 y 6) y los grupos 2 y 3.

Ejemplo 6

Efecto de la vacuna oral de la presente invención en la prevención de la edwardsielosis en falso halibut

Método de ensayo: Se dividieron falsos halibuts (peso corporal medio: 108 g) en cinco grupos (grupos 1 a 5), incluyendo cada uno 60 peces, y los falsos halibuts de los cinco grupos se pusieron respectivamente en cinco depósitos de agua FRP ($2,5 \times 1,5 \times 1,0$ m (altura)). Los falsos halibuts se criaron a una temperatura del agua de 18 a 26°C durante 10 meses. Los falsos halibuts de los grupos 1 a 3 (es decir, los grupos de la invención) se asignaron a recibir una vacuna producida mezclando células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 4 ó 5) de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut y células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 4 ó 5) de la cepa UT-1 de *E. tarda* procedente de dorada del Japón. Los falsos halibuts del grupo 4 (es decir, el grupo de control) se asignaron a recibir una vacuna producida a partir de células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 4 ó 5) de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut. Cada una de las vacunas se mezcló con gránulos húmedos de forma que el número de células administradas a un falso halibut al día fue como se muestra en la Tabla 10, y la mezcla se administró por vía oral a cada falso halibut durante siete días por medio del uso de una jeringa que tenía un tubo de fino de vinilo. A cada falso halibut del grupo 5 (es decir, grupo de control) se le administró una mezcla de gránulos húmedos y un medio de cultivo. Un mes, seis meses o 10 meses después de la administración oral de la vacuna, 20 falsos halibuts de cada grupo se expusieron con células de *E. tarda* sumergiendo los falsos halibuts durante 30 minutos en agua de mar en la que se habían suspendido células de *E. tarda* (número aproximado de células: $7,4 \times 10$ CFU/ml). Los falsos halibuts expuestos de esta manera se observaron durante 30 días y se determinó la tasa de supervivencia.

TABLA 10

Grupos de ensayo y vacunas (número de células administradas) en el Ejemplo 6

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células administradas (CFU/pez/día)
Grupo 1	60	Células destruidas con formalina de cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$3,2 \times 10^8$
		Células destruidas con formalina de cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$13,0 \times 10^8$

5	Grupo 2	60	Células destruidas con formalina de cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$3,2 \times 10^9$
			Células destruidas con formalina de cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$3,0 \times 10^9$
10	Grupo 3	60	Células destruidas con formalina de cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$3,2 \times 10^{11}$
			Células destruidas con formalina de cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$3,0 \times 10^{11}$
15	Grupo 4 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$6,4 \times 10^{11}$
20	Grupo 5 (grupo de control)	60	Caldo Trypto-soya que contiene formalina al 0,5%	0
25				

30 *Resultados del ensayo:* La Tabla 11 muestra datos sobre la tasa de supervivencia de falsos halibuts de grupos de la invención y grupos de control determinada después de la exposición a *E. tarda* realizada 1, 6 ó 10 meses después de la administración oral de la vacuna. En los falsos halibuts de los grupos de la invención (grupos 1 a 3) que recibieron por vía oral una mezcla de células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut y células de la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón, la tasa de supervivencia determinada después de la exposición a *E. tarda* realizada 1, 6 ó 10 meses después de la administración de la vacuna fue significativamente mayor ($p < 0,05$, 0,01) que en los falsos halibuts de los grupos de control (grupos 4 y 5). Cuando la dosis de la vacuna administrada (es decir, el número de células administradas) fue mayor, también era mayor la tasa de supervivencia. Estos datos indican que aunque la vacuna de la presente invención se administre por vía oral, la vacuna presenta el efecto de prevenir la edwardsielosis en el falso halibut.

TABLA 11

40 Ejemplo 6 Tasa de supervivencia (%) de falsos halibuts de los grupos de la invención y de control después de la exposición a *E. tarda*

Grupo de ensayo	Meses transcurridos después de la inoculación de la vacuna		
	1	6	10
50 Grupo 1*2	75 (15/20)*1	70 (14/20)	60 (12/20)
Grupo 2*2	85 (17/20)	75 (15/20)	65 (13/20)
55 Grupo 3*2	85 (17/20)	90 (18/20)	70 (14/20)
Grupo 4 (grupo de control)	30 (6/20)	15 (3/20)	15 (3/20)
Grupo 5 (grupo de control)	15 (3/20)	10 (2/20)	10 (2/20)

60 *1: (Número de peces supervivientes/número de peces ensayados)

65 *2: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$, 0,01) en la tasa de supervivencia entre los grupos 1 a 3 y los grupos 4 y 5.

ES 2 368 981 A1

Ejemplo 7

Efecto de la vacuna de la presente invención en la prevención de la edwardsielosis y la estreptococosis en el falso halibut

5

Método de ensayo: Se dividieron falsos halibuts (peso corporal medio: 105 g) en cinco grupos (grupos 1 a 5), incluyendo cada grupo 60 peces, y los falsos halibuts de los cinco grupos se pusieron respectivamente en cinco depósitos de agua FRP (2,5 m × 1,5 m × 1,0 m (altura)). Los falsos halibuts se criaron a una temperatura del agua de 18 a 25°C durante 10 meses, durante los cuales se subagruparon según crecían. Los falsos halibuts de los grupos 1 a 3 (es decir, los grupos de la invención) se asignaron a recibir una vacuna producida mezclando células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita en los Ejemplos 4 a 6) de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut, células (preparadas de una manera similar a la descrita en los Ejemplos 4 a 6) de la cepa UT-1 de *E. tarda* procedente de dorada del Japón, células destruidas con formalina (preparadas por tratamiento con formalina después de 20 horas de cultivo en caldo de infusión cerebrocardiaca a 25°C) de la cepa KH-2 de *Streptococcus iniae* procedente de falso halibut y células (preparadas de una manera similar a la descrita anteriormente) de la cepa AM-1 de *S. parauberis* procedente de falso halibut. Los falsos halibuts del grupo 4 (es decir, el grupo de control) se asignaron a recibir una vacuna producida mezclando células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut, células de la cepa KH-2 de *S. iniae* procedentes de falso halibut y células de la cepa AM-1 de *S. parauberis* procedente de falso halibut. La Tabla 12 muestra el número de células destruidas con formalina (usadas como vacunas) de las cepas bacterianas mencionadas anteriormente. No se realizó ninguna inoculación de la vacuna en falsos halibuts del grupo 5 (es decir, grupo de control no tratado).

Cada una de estas vacunas (0,1 ml) se inoculó por vía intramuscular en un falso halibut en la parte superior de la aleta pectoral. Uno, seis o 10 meses después de la inoculación de la vacuna, en 20 falsos halibuts de cada grupo se inocularon por vía intramuscular células cultivadas de la cepa KH-2 de *S. iniae* ($6,7 \times 10^4$ CFU/kg de peso corporal) y células cultivadas de la cepa AM-1 de *S. parauberis* ($6,7 \times 10^4$ CFU/kg de peso corporal) y, seis horas después, los falsos halibuts se expusieron a células cultivadas de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut sumergiendo los falsos halibuts durante 30 minutos en agua de mar en la que se habían suspendido células OA-3 de *E. tarda* (número de células: $7,2 \times 10^7$ CFU/ml). Los falsos halibuts expuestos de esta manera se observaron durante 30 días y se determinó la tasa de supervivencia. Además, se aislaron células bacterianas a partir de los peces muertos, y se identificaron las especies patógenas.

TABLA 12

35

Grupos de ensayo y vacunas (número de células) en el Ejemplo 7

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml)
Grupo 1	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$2,5 \times 10^7$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$2,3 \times 10^7$
		Células destruidas con formalina de la cepa KH-2 de <i>S. iniae</i>	$2,8 \times 10^7$
		Células destruidas con formalina de la cepa AM-1 de <i>S. parauberis</i>	$3,1 \times 10^7$
Grupo 2	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$2,5 \times 10^8$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$2,3 \times 10^8$
		Células destruidas con formalina de la cepa KH-2 de <i>S. iniae</i>	$2,8 \times 10^8$

65

ES 2 368 981 A1

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml)
		Células destruidas con formalina de la cepa AM-1 de <i>S. parauberis</i>	$3,1 \times 10^8$
Grupo 3	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$2,5 \times 10^{10}$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$2,3 \times 10^{10}$
		Células destruidas con formalina de la cepa KH-2 de <i>S. iniae</i>	$2,8 \times 10^{10}$
		Células destruidas con formalina de la cepa AM-1 de <i>S. parauberis</i>	$3,1 \times 10^{10}$
Grupo 4 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$5,0 \times 10^{10}$
		Células destruidas con formalina de la cepa KH-2 de <i>S. iniae</i>	$2,8 \times 10^{10}$
		Células destruidas con formalina de la cepa AM-1 de <i>S. parauberis</i>	$3,1 \times 10^{10}$
Grupo 5 (grupo de control)	60	No tratado	0

Resultados del ensayo: La Tabla 13 muestra datos sobre la tasa de supervivencia de falsos halibuts de grupos de la invención y grupos de control, determinada después de la exposición bacteriana realizada 1, 6 ó 10 meses después de la inoculación de la vacuna. En los falsos halibuts de los grupos de la invención (grupos 1 a 3) que se inocularon con la vacuna (es decir, células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, cepa de *S. iniae* y cepa de *S. parauberis*), la tasa de supervivencia determinada después de la exposición bacteriana realizada 1, 6, ó 10 meses después de la inoculación de la vacuna fue significativamente mayor ($p < 0,05$, $0,01$) que en los falsos halibuts del grupo 4 (que se inocularon con células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut, la cepa de *S. iniae* y la cepa de *S. parauberis*) o los falsos halibuts del grupo 5 (es decir, falsos halibuts no tratados). En el grupo 4, en el que el número de células destruidas con formalina de tres cepas bacterianas (excluyendo la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón) era igual que en el grupo 3 (el grupo de la invención), se aislaron *E. tarda*, *S. iniae* y *S. parauberis* a partir de muchos peces muertos. Al mismo tiempo, se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la tasa de supervivencia entre los falsos halibuts del grupo 1 (en el que el número de células destruidas con formalina de las cuatro cepas bacterianas inoculadas como una vacuna fue el menor) y los de los grupos 2 ó 3.

Estos datos indican que la vacuna mencionada anteriormente (es decir, mezcla de células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, cepa de *S. iniae* y cepa de *S. parauberis*) presenta un excelente efecto de prevención de la edwardsielosis y la estreptococosis en el falso halibut. Al mismo tiempo, se observó una diferencia considerable en la tasa de supervivencia y la frecuencia de aislamiento de patógenos entre los falsos halibuts de los grupos de la invención y los del grupo 4. Esto indica que la adición de células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* atípica procedente de dorada del Japón aumenta el efecto de la vacuna en la prevención de la edwardsielosis y la estreptococosis. Se determinó un número de células inactivadas de cada una de las cepas mencionadas anteriormente necesario para la expresión de los efectos apropiados de la vacuna de aproximadamente 10^8 CFU/ml o mayor.

ES 2 368 981 A1

TABLA 13

Ejemplo 7 Tasa de supervivencia (%) de falsos halibuts de los grupos de la invención y de control después de la exposición bacteriana

Grupo de ensayo	Meses transcurridos después de la inoculación de la vacuna		
	1	6	10
Grupo 1 ^{*3}	65 (13/20) ^{*1}	65 (13/20)	45 (9/20)
	Et 5, Si 4, Sp 2 ^{*2}	Et 5, Si 4, Sp 1	Et 8, Si 6, Sp 3
Grupo 2 ^{*3,4}	95 (19/20)	95 (19/20)	85 (17/20)
	Et 1	Et 1	Et 3, Si 2, Sp 1
Grupo 3 ^{*3,4}	100 (20/20)	95 (19/20)	95 (19/20)
		Et 1	Et 1, Si 1
Grupo 4 (grupo de control)	30 (6/20)	15 (3/20)	20 (4/20)
	Et 13, Si 8, Sp 6	Et 15, Si 11, Sp 7	Et 12, Si 9, Sp 5
Grupo 5 (grupo de control)	15 (3/20)	5 (1/20)	0 (0/20)
	Et 10, Si 16, Sp 11	Et 17, Si 13, Sp 9	Et 20, Si 15, Sp 13

*1: (Número de peces supervivientes/número de peces ensayados)

*2: Los símbolos "Et", "Si", y "Sp" representan *E. tarda*, *S. iniae*, y *S. parauberis*, respectivamente, y los números que siguen a cada símbolo representan el número de peces muertos a partir de los cuales se aisló la bacteria correspondiente.

*3: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$, $0,01$) en la tasa de supervivencia entre los grupos 1 a 3 y los grupos 4 y 5.

*4: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la tasa de supervivencia entre el grupo 1 y los grupos 2 ó 3.

Ejemplo 8

Efecto de la vacuna oral de la presente invención en la prevención de la edwardsielosis y la estreptococosis en falso halibut

Método de ensayo: Se dividieron falsos halibuts (peso corporal medio: 92 g) en seis grupos (grupos 1 a 6), incluyendo cada grupo 60 peces, y los falsos halibuts de los seis grupos se pusieron respectivamente en seis depósitos de agua FRP (2,5 m × 1,5 m × 1,0 m (altura)). Los falsos halibuts se criaron a una temperatura del agua de 19 a 25°C durante 10 meses, durante los cuales se subagruparon según crecían. Los falsos halibuts de los grupos 1 a 4 (es decir, grupos de la invención) se asignaron a recibir una vacuna producida mezclando células destruidas con formalina (preparadas una manera similar a la descrita en el Ejemplo 7) de las cepas mencionadas anteriormente (incluyendo la cepa AM-1 de *S. parauberis*) (el número de células de cada cepa se muestra en la Tabla 14). Los falsos halibuts del grupo 5 (es decir, grupo de control) se asignaron a recibir una vacuna que no contenía células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón. En los falsos halibuts del grupo 6 no se realizó la inoculación de la vacuna (es decir, grupo de control no tratado).

Cada una de estas vacunas se suspendió en agua destilada (cantidad de agua: 10% del peso del pienso para los falsos halibuts) de forma que el número de células destruidas con formalina suministradas para un falso halibut al día fue el mostrado en la Tabla 14. La suspensión se pulverizó en el pienso sólido y después se adsorbió dejando en reposo el pienso sólido pulverizado de esta manera durante dos horas. El pienso sólido resultante se administró a cada falso halibut durante 5 ó 10 días de forma que la cantidad de pienso al día fuera un 2% del peso corporal del pez. Uno, seis o 10 meses después de la administración de la vacuna, en 20 falsos halibuts de cada grupo se inocularon por vía intramuscular células de la cepa KH-2 de *S. iniae* ($5,6 \times 10^4$ CFU/kg de peso corporal) y células de la cepa AM-1 de *S. parauberis* ($6,8 \times 10^4$ CFU/kg de peso corporal) y, seis horas después, los falsos halibuts se expusieron a células cultivadas de la cepa OA-3 de *E. tarda* sumergiendo los falsos halibuts durante 30 minutos en agua de mar en la que

ES 2 368 981 A1

se habían suspendido células OA-3 de *E. tarda* (número de células: $8,1 \times 10^7$ CFU/ml). Los falsos halibuts expuestos de esta manera se observaron durante 30 días y se determinó la tasa de supervivencia. Además, se aislaron células bacterianas a partir de los peces muertos y se identificaron las especies patógenas.

TABLA 14

Grupos de ensayo y vacuna (número de células) en el Ejemplo 8

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml•pez)	Días de Administración
Grupo 1	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$5,3 \times 10^8$	5 días
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$5,0 \times 10^8$	
		Células destruidas con formalina de la cepa KH-2 de <i>S. iniae</i>	$6,1 \times 10^8$	
		Células destruidas con formalina de la cepa AM-1 de <i>S. parauberis</i>	$6,7 \times 10^8$	
Grupo 2	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$5,3 \times 10^8$	10 días

ES 2 368 981 A1

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml·pez)	Días de Administración	
5		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	5,0 x 10 ⁸		
10		Células destruidas con formalina de la cepa KH-2 de <i>S. iniae</i>	6,1 x 10 ⁸		
15		Células destruidas con formalina de la cepa AM-1 de <i>S. parauberis</i>	6,7 x 10 ⁸		
20	Grupo 3	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	5,3 x 10 ¹⁰	5 días
25			Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	5,0 x 10 ¹⁰	
30			Células destruidas con formalina de la cepa KH-2 de <i>S. iniae</i>	6,1 x 10 ¹⁰	
35			Células destruidas con formalina de la cepa AM-1 de <i>S. parauberis</i>	6,7 x 10 ¹⁰	
40	Grupo 4	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	5,3 x 10 ¹⁰	10 días
45			Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	5,0 x 10 ¹⁰	
50			Células destruidas con formalina de la cepa KH-2 de <i>S. iniae</i>	6,1 x 10 ¹⁰	
55			Células destruidas con formalina de la cepa AM-1 de <i>S. parauberis</i>	6,7 x 10 ¹⁰	
60	Grupo 5 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	5,3 x 10 ¹⁰	10 días
			Células destruidas con formalina de la cepa KH-2 de <i>S. iniae</i>	6,1 x 10 ¹⁰	
			Células destruidas con formalina de la cepa AM-1 de <i>S. parauberis</i>	6,7 x 10 ¹⁰	
65	Grupo 6 (grupo de control)	60	Sin tratamiento	0	0

ES 2 368 981 A1

5 *Resultados del ensayo:* La Tabla 15 muestra los datos sobre la tasa de supervivencia de falsos halibuts de los grupos de la invención y de control, determinada después de la exposición bacteriana realizada 1, 6 ó 10 meses después de la inoculación de la vacuna. En los falsos halibuts de los grupos de la invención (grupos 1 a 4) a los que se les administró por vía oral una mezcla de células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, la cepa de *S. iniae* y la cepa de *S. parauberis* como una vacuna durante 5 ó
 10 días, la tasa de supervivencia determinada después de la exposición bacteriana realizada 1, 6 ó 10 meses después de la administración de la vacuna fue significativamente mayor ($p < 0,01$) que en los falsos halibuts de los grupos de control (grupos 5 y 6). Estos datos indican que aunque la vacuna mencionada anteriormente (decir, mezcla de células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, la cepa de *S. iniae* y la cepa de *S. parauberis*) se administre por vía oral, la vacuna presenta un efecto excelente de
 15 prevención de la edwardsielosis y de la estreptococosis en el falso halibut. Al mismo tiempo, se observó una diferencia considerable en la tasa de supervivencia y la frecuencia de aislamiento de patógenos entre falsos halibuts de los grupos de la invención y los del grupo 5. Esto indica que la adición, a una vacuna, de células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* atípica procedente de dorada del Japón aumenta el efecto de la vacuna en la prevención de la edwardsielosis y la estreptococosis.

20 TABLA 15

Ejemplo 8 Tasa de supervivencia (%) de falsos halibuts de los grupos de la invención y de control después de la exposición bacteriana

Grupo de ensayo	Meses transcurridos después de la inoculación de la vacuna		
	1	6	10
Grupo 1 ³	65 (13/20) ^{*1}	70 (14/20)	55 (11/20)
	Et 7, Si 3, Sp 3 ^{*2}	Et 5, Si 5, Sp 1	Et 7, Si 6, Sp 5
Grupo 2 ³	75 (15/20)	65 (13/20)	70 (14/20)
	Et 5, Si 3, Sp 1	Et 5, Si 6, Sp 3	Et 6, Si 2, Sp 4
Grupo 3 ³	80 (16/20)	70 (14/20)	75 (15/20)
	Et 4, Si 1, Sp 3	Et 4, Si 5, Sp 2	Et 5, Si 2, Sp 2
Grupo 4 ³	90 (18/20)	95 (9/20)	80 (16/20)
	Et 2, Si 1	Et 1	Et 4, Si 2, Sp 2
Grupo 5 (grupo de control)	10 (2/20)	25 (5/20)	15 (3/20)
	Et 18, Si 16, Sp 12	Et 13, Si 12, Sp 11	Et 16, Si 13, Sp 14
Grupo 6 (grupo de control)	0 (0/20)	10 (2/20)	5 (1/20)
	Et 20, Si 18, Sp 16	Et 17, Si 15, Sp 14	Et 18, Si 13, Sp 15

*1: (Número de peces supervivientes/número de peces ensayados)

*2: Los símbolos "Et", "Si", y "Sp" representan *E. tarda*, *S. iniae*, y *S. parauberis*, respectivamente, y los números después de cada símbolo representan el número de peces muertos a partir de los cuales se aisló la bacteria correspondiente.

*3: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,01$) en la tasa de supervivencia entre los grupos 1 a 4 (grupos de la invención) y los grupos 5 y 6 (grupos de control).

Ejemplo 9

Efecto de la vacuna de la presente invención en la prevención de la edwardsielosis y la estreptococosis en falso halibut - estudios sobre la antigenicidad y efecto preventivo de las cepas ensayadas

5 *Método de ensayo:* Se dividieron falsos halibuts (peso corporal medio: 95 g) en siete grupos (grupos 1 a 7), incluyendo cada grupo 60 peces, y los falsos halibuts de los siete grupos se pusieron respectivamente en siete depósitos de agua FRP (2,5 m × 1,5 m × 1,0 m (altura)). Los falsos halibuts se criaron a una temperatura del agua de 17 a 26°C durante 10 meses, durante los cuales se subagruparon según crecían. Para esclarecer la relación entre la antigenicidad y el efecto preventivo de las cepas ensayadas, los falsos halibuts de los grupos 1 a 3 (es decir, grupos de la invención) y el grupo 5 se asignaron a recibir una vacuna producida mezclando células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 7 u 8) de cada cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut de diferente antigenicidad (es decir, OA-3, EH-5 y UH-2), células de cada una de las cepas de *E. tarda* procedentes de dorada del Japón de diferente antigenicidad (es decir, UT-1, UT-4 e YK-1), células de cada una de las cepas de *S. iniae* de diferente antigenicidad (es decir, KH-2, ES-1 y MK-1) y células de cada una de las cepas de *S. parauberis* de diferente antigenicidad (es decir, AM-1, AM-4 y AK-3) (el número de células destruidas con formalina de cada cepa se muestra en la Tabla 16). Los falsos halibuts del grupo 4 (es decir, grupo de control) se asignaron a recibir una vacuna que contenía células destruidas con formalina de tres cepas (excluyendo la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón). Los falsos halibuts del grupo 6 se asignaron a recibir una vacuna que contenía células destruidas con formalina de la cepa ES-1 de *S. iniae* y la cepa AM-4 de *S. parauberis*. No se realizó inoculación de la vacuna en los falsos halibuts del grupo 7 (es decir, grupo de control no tratado).

20 Cada una de estas vacunas (0,1 ml) se inoculó por vía intramuscular en un falso halibut en la parte superior de la aleta pectoral. Uno, seis o 10 meses después de la inoculación de la vacuna, de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 7, se infectaron artificialmente 20 falsos halibuts de cada grupo (se expusieron) con bacterias, y se evaluaron los efectos de la vacuna. Los falsos halibuts del grupo 5 ó 6 se infectaron de forma artificial con *S. iniae* y *S. parauberis*.

30

TABLA 16

Grupos de ensayo y vacunas (número de células) en el Ejemplo 9

35

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml)
Grupo 1	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	2,8 x 10 ⁹
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	2,7 x 10 ⁹
		Células destruidas con formalina de la cepa KH-2 de <i>S. iniae</i>	4,5 x 10 ⁹

65

ES 2 368 981 A1

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml)
		Células destruidas con formalina de la cepa AM-1 de <i>S. parauberis</i>	3,9 x 10 ⁹
Grupo 2	60	Células destruidas con formalina de la cepa EH-5 de <i>E. tarda</i> EH-5 procedente de falso halibut Células destruidas con formalina de la cepa UT-4 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón Células destruidas con formalina de la cepa ES-1 de <i>S. iniae</i> Células destruidas con formalina de la cepa AM-4 de <i>S. parauberis</i>	3,4 x 10 ⁹ 3,2 x 10 ⁹ 4,4 x 10 ⁹ 3,6 x 10 ⁹
Grupo 3	60	Células destruidas con formalina de la cepa UH-2 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut Células destruidas con formalina de la cepa YK-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón Células destruidas con formalina de la cepa MK-1 de <i>S. iniae</i> Células destruidas con formalina de la cepa AK-3 de <i>S. parauberis</i>	3,7 x 10 ⁹ 3,4 x 10 ⁹ 4,7 x 10 ⁹ 4,1 x 10 ⁹
Grupo 4 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de la cepa EH-5 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut Células destruidas con formalina de la cepa ES-1 de <i>S. iniae</i> Células destruidas con formalina de la cepa AM-4 de <i>S. parauberis</i>	6,8 x 10 ⁹ 4,4 x 10 ⁹ 3,6 x 10 ⁹
Grupo 5 (grupo de Estreptococosis)	60	Células destruidas con formalina de la cepa EH-5 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut Células destruidas con formalina de la cepa UT-4 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón Células destruidas con formalina de la cepa ES-1 de <i>S. iniae</i> Células destruidas con formalina de la cepa AM-4 de <i>S. parauberis</i>	3,4 x 10 ⁹ 3,2 x 10 ⁹ 4,4 x 10 ⁹ 3,6 x 10 ⁹

ES 2 368 981 A1

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml)
Grupo 6 (grupo de Estreptococosis)	60	Células destruidas con formalina de la cepa ES-1 de <i>S. iniae</i>	4,4 x 10 ⁹
		Células destruidas con formalina de la cepa AM-4 de <i>S. parauberis</i>	3,6 x 10 ⁹
Grupo 7 (grupo de control)	60	Sin tratamiento	0

Resultados del ensayo: La Tabla 17 muestra datos sobre la tasa de supervivencia de falsos halibuts de los grupos de la invención y de control, determinada después de la exposición bacteriana realizada 1, 6 ó 10 meses después de la inoculación de la vacuna. En los falsos halibuts de los grupos de la invención (grupos 1 a 3) que se inocularon con una vacuna producida mezclando células destruidas con formalina de las diferentes cepas antigénicas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, cepas de *S. iniae* y cepas de *S. parauberis*, la tasa de supervivencia determinada después de la exposición bacteriana realizada 1, 6 ó 10 meses después de la inoculación de la vacuna fue significativamente mayor ($p < 0,05, 0,01$) que en los falsos halibuts del grupo 4, que se inocularon con una vacuna que no contenía células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón, o la de los falsos halibuts no tratados (grupos de control). En el grupo 4, en el que se inocularon células destruidas con formalina de tres cepas bacterianas (excluyendo la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón), y en el grupo de control no tratado, se aislaron, *E. tarda*, *S. iniae* y *S. parauberis* a partir de peces muertos con alta frecuencia. En los falsos halibuts del grupo 5, que se expusieron únicamente a patógenos de estreptococosis (*S. iniae* y *S. parauberis*), la tasa de supervivencia fue significativamente mayor que en los falsos halibuts del grupo 6, que también se expusieron únicamente con los patógenos de estreptococosis. Esto indica que la adición de células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* atípica procedente de dorada del Japón aumenta el efecto de la vacuna en la prevención de la estreptococosis.

Estos datos demuestran que el efecto de la vacuna de la presente invención no sólo se atribuye a la antigenicidad específica de cada una de las cuatro cepas bacterianas mencionadas anteriormente (incluyendo la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut), sino a la acción expresada únicamente cuando la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut está presente conjuntamente con *E. tarda* procedente de dorada del Japón.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 368 981 A1

TABLA 17

Ejemplo 9 Tasa de supervivencia (%) de falsos halibuts de grupos de la invención y de control después de la exposición bacteriana

5

10

15

20

25

30

35

Grupo de ensayo	Meses transcurridos después de la inoculación de la vacuna		
	1	6	10
Grupo 1 ³	95 (19/20) ^{*1}	85 (17/20)	95 (19/20)
	Et 1 ^{*2}	Et 2, Si 1	Et 1
Grupo 2 ³	100 (20/20)	95 (19/20)	85 (17/20)
		Et 1	Et 3, Si 1
Grupo 3 ³	95 (19/20)	95 (19/20)	95 (19/20)
	Et 1	Et 1	Et 1, Si 1
Grupo 4 (grupo de control)	40 (8/20)	15 (3/20)	20 (4/20)
	Et 12, Si 8, Sp 11	Et 16, Si 11, Sp 9	Et 16, Si 7, Sp 12
Grupo 5 ⁴ (grupo de estreptococosis)	100 (20/20)	100 (20/20)	95 (19/20)
			Si 1
Grupo 6 (grupo de estreptococosis)		45 (9/20)	35 (7/20)
	Si 10, Sp 6	Si 8, Sp 7	Si 7, Sp 4
Grupo 7 (grupo de control)	10 (2/20)	5 (1/20)	0 (0/20)
	Et 18, Si 16, Sp 14	Et 18, Si 13, Sp 10	Et 20, Si 15, Sp 13

*1: (Número de peces supervivientes/número de peces ensayados)

40

*2: Los símbolos "Et", "Si" y "Sp" representan *E. tarda*, *S. iniae* y *S. parauberis*, respectivamente, y el número después de cada símbolo representa el número de peces muertos a partir de los cuales se aisló la bacteria correspondiente.

45

*3: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$, $0,01$) en la tasa de supervivencia entre los grupos 1 a 3 y los grupos 4 y 5.

*4: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la tasa de supervivencia entre el grupo 6 y el grupo 5.

Ejemplo 10

50

Efecto de la vacuna de la presente invención en la prevención de la edwardsielosis en dorada del Japón - estudio sobre la cantidad apropiada de antígeno

55

60

65

Método de ensayo: Se dividieron doradas del Japón (peso corporal medio: 84 g) en siete grupos (grupos 1 a 7), incluyendo cada grupo 60 peces, y los doradas del Japón de los siete grupos se pusieron respectivamente en siete depósitos de agua FRP (2,5 m × 1,5 m × 1,0 m (altura)). Los doradas del Japón se criaron a una temperatura del agua de 18 a 27°C durante 10 meses, durante los cuales se subagruparon según crecían. Para los doradas del Japón de los grupos 1 a 3 (es decir, los grupos de la invención) se produjo una vacuna mezclando células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 4) de la cepa OA-3 de *E. tarda* procedente de falso halibut y células de la cepa UT-1 de *E. tarda* procedente de dorada del Japón (el número de células de cada cepa se muestra en la Tabla 18). Para los doradas del Japón de los grupos 4 a 6 (es decir, grupos de control), se produjo una vacuna únicamente a partir de células destruidas con formalina (preparadas de una manera similar a la descrita anteriormente) de la cepa UT-1 de *E. tarda* de dorada del Japón (el número de células se muestra en la Tabla 18). No se realizó inoculación de la vacuna en los doradas del Japón del grupo 7 (es decir, grupo de control no tratado).

Cada una de estas vacunas (0,1 ml) se inoculó por vía intraperitoneal en una dorada del Japón. Un mes, seis meses o 10 meses después de la inoculación de la vacuna, en 20 doradas del Japón de cada grupo se inocularon por vía

ES 2 368 981 A1

intraperitoneal (se expusieron) células cultivadas de la cepa UT-1 de *E. tarda* atípica procedente de dorada del Japón de forma que el número de células fue de 7.3×10^5 CFU/kg de peso corporal. Las doradas del Japón inoculadas de esta manera se observaron durante 30 días, y se determinó la tasa de supervivencia para la evaluación de la eficacia de la vacuna.

5

TABLA 18

Grupo de ensayo	Número de peces ensayados	Tipo de vacuna	Número de células (CFU/ml)
Grupo 1	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$1,6 \times 10^7$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$1,7 \times 10^7$
Grupo 2	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$1,6 \times 10^8$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$1,7 \times 10^8$
Grupo 3	60	Células destruidas con formalina de la cepa OA-3 de <i>E. tarda</i> procedente de falso halibut	$1,6 \times 10^{10}$
		Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$1,7 \times 10^{10}$
Grupo 4 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$3,4 \times 10^7$
Grupo 5 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$3,4 \times 10^8$
Grupo 6 (grupo de control)	60	Células destruidas con formalina de la cepa UT-1 de <i>E. tarda</i> procedente de dorada del Japón	$3,4 \times 10^{10}$
Grupo 7 (grupo de control)	60	Sin tratamiento	0

60 *Resultado del ensayo:* La Tabla 19 muestra datos sobre la tasa de supervivencia de los doradas del Japón de los grupos de la invención y de control, determinada después de la exposición a *E. tarda* realizada 1, 6 ó 10 meses después de la inoculación de la vacuna. Entre las doradas del Japón de los grupos de la invención (grupos 1 a 3) que se inocularon con una vacuna producida a partir de células destruidas con formalina de las cepas de *E. tarda* procedente de falso halibut y procedente de dorada del Japón, se reveló lo siguiente. Es decir, en las doradas del Japón de los grupos 2 y 3, en las que el número de células destruidas con formalina en la vacuna fue de 10^8 a 10^{10} CFU/ml, la tasa de supervivencia determinada después de la exposición a *E. tarda* realizada 1, 6 ó 10 meses después de la inoculación de la vacuna fue significativamente mayor ($p < 0,05, 0,01$) que en las doradas del Japón de los grupos 4 a 6 que se inocularon únicamente con células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* atípica procedente de dorada del

65

ES 2 368 981 A1

Japón, que en las doradas del Japón no tratadas del grupo 7. En las doradas del Japón de los grupos de la invención, se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la tasa de supervivencia determinada 10 meses después de la inoculación de la vacuna entre las doradas del Japón del grupo 1 y las de los grupos 2 ó 3.

5 Estos datos indican que, de forma similar al caso de la edwardsielosis en el falso halibut, en la edwardsielosis en la dorada del Japón, una vacuna que contiene únicamente células destruidas con formalina del patógeno procedente del pez correspondiente no presenta los efectos apropiados, y que únicamente cuando las células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* atípica procedente de dorada del Japón están presentes conjuntamente con las de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut, se consigue un excelente efecto preventivo por medio de la activación de la
 10 capacidad bactericida de los fagocitos. Además, estos datos sugieren que cuando se emplea como vacuna una mezcla de células destruidas con formalina de la cepa de *E. tarda* procedente de falso halibut y células de la cepa de *E. tarda* procedente de dorada del Japón, el número apropiado de células destruidas con formalina de cada cepa (es decir, la cantidad apropiada de antígeno) es de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{10} CFU/ml.

15

TABLA 19

Ejemplo 10 Tasa de supervivencia (%) de doradas del Japón de los grupos de la invención
 y de control después de la exposición a *E. tarda*

20

Grupo de ensayo	Meses transcurridos después de la inoculación de la vacuna		
	1	6	10
Grupo 1	70 (14/20)* ¹	70 (14/20)	45 (9/20)
Grupo 2* ^{2, 3}	95 (19/20)	90 (18/20)	85 (17/20)
Grupo 3* ^{2, 3}	100 (20/20)	100 (20/20)	90 (18/20)
Grupo 4 (grupo de control)	40 (8/20)	30 (6/20)	35 (7/20)
Grupo 5 (grupo de control)	40 (8/20)	40 (8/20)	30 (6/20)
Grupo 6 (grupo de control)	50 (10/20)	45 (9/20)	45 (9/20)
Grupo 7 (grupo de control)	15 (3/20)	20 (4/20)	5 (1/20)

25

30

35

40

*1: (Número de peces supervivientes/número de peces ensayados)

*2: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$, $0,01$) en la tasa de supervivencia entre los grupos 4 a 7 y los grupos 2 y 3.

45

*3: Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el número de supervivientes (10 meses después de la inoculación de la vacuna) entre el grupo 1 los grupos 2 ó 3.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna para la edwardsielosis en un pez diana, que comprende células inactivadas de (A) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del pez diana, y células inactivadas de (B) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de un pez distinto del pez diana, donde, cuando la cepa (A) es una cepa típica de *Edwardsiella tarda*, la cepa (B) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*, mientras que cuando la cepa (A) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*, la cepa (B) es una cepa típica de *Edwardsiella*.
- 10 2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el pez diana es falso halibut o dorada del Japón.
3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde el número de células inactivadas de la cepa (A) con respecto de la cepa (B) es 1:(0,1 a 1).
- 15 4. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está en forma de administración por inyección u oral.
5. Una vacuna para la edwardsielosis y/o estreptococosis en un pez diana, donde el pez diana es un falso halibut, que comprende células inactivadas de (A) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente del falso halibut; células inactivadas de (B) una cepa de *Edwardsiella tarda* procedente de un pez distinto del falso halibut; y células inactivadas de (C) *Streptococcus iniae* y *Streptococcus parauberis*, donde la cepa (A) es una cepa típica de *Edwardsiella tarda* y la cepa (B) es una cepa atípica de *Edwardsiella tarda*.
- 20 6. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, donde las proporciones de los números de células inactivadas de la cepa (A), cepa (B), y cada una de las dos cepas mencionadas anteriormente (C) son preferiblemente 1:(de 0,1 a 1):(de 1 a 10).
- 25 7. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, que está en forma de administración por inyección u oral.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200950005

②² Fecha de presentación de la solicitud: 05.06.2007

③² Fecha de prioridad: **24-08-2006**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	COSTA, A. B., KANAI, K., YOSHIKOSHI, K. Serological characterization of atypical strains of <i>Edwardsiella tarda</i> isolated from sea breams. Fish Pathology. Octubre 1998, Vol. 33, N° 4, páginas 265-274. ISSN 0388-788X.	1,2,4,5,7
A	MATSUYAMA, T., KAMAISHI, T., OOSEKO, N. et al. Pathogenicity of motile and non-motile <i>Edwardsiella tarda</i> to some marine fish. Fish Pathology. Septiembre 2005, Vol. 40, N° 3, páginas 133-135. ISSN 0388-788X.	1,2,4,5,7
A	KENJI, K., MASATO, A. Efficacy of vaccine against Edwardsiellosis of the Japanese flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> . Bulletin of Marine Sciences and Fisheries Kochi University. Diciembre 2000, N° 20, páginas 35-43. (resumen) Base de datos BIOSIS, [recuperado el 02.11.2011] Recuperado de: EPOQUE; Número de acceso: AN PREV200100461638.	1,2,4,5,7
A	NAKANISHI, T., KIRYU, I., OTOTAKE, M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. Vaccine. Noviembre 2002, Vol. 20, N° 31-32, páginas 3764 - 3769. ISSN 0264-410X.	5,7
A	BAECK G. W., KIM, J. H., GOMEZ, D. K., et al. Isolation and characterization of <i>Streptococcus</i> sp. from diseased flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) in Jeju Island. Journal of Veterinary Science. Marzo 2006, Vol. 7, N° 1, páginas 53-58. ISSN 1229-845X.	5

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:

Fecha de realización del informe

27.10.2011

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K39/116 (2006.01)

A61K39/09 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP, NPL, INSPEC, COMPDX, TXTE, TXTF

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.10.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	COSTA, A. B. et al. Fish Pathology. Octubre 1998, Vol. 33, Nº 4, páginas 265-274.	10.1998
D02	MATSUYAMA, T. et al. Fish Pathology. Septiembre 2005, Vol. 40, Nº 3, páginas 133-135.	09.2005
D03	KENJI, K. et al. Bulletin of Marine Sciences and Fisheries Kochi University. Diciembre 2000, Nº 20, páginas 35-43.	12.2000
D04	NAKANISHI, T. et al. Vaccine. Noviembre 2002, Vol. 20, Nº 31-32, páginas 3764-3769.	09.2002
D05	BAECK G. W. et al. Journal of Veterinary Science. Marzo 2006, Vol. 7, Nº 1, páginas 53-58.	03.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud, se basa en el hecho de que la vacunación de peces con una mezcla de cepas inactivadas de *Edwardsiella tarda* típica y atípica, produce un efecto sinérgico en la respuesta inmune frente al antígeno. Así, el objeto de la presente solicitud, es una vacuna para edwardsielosis, que comprende células inactivadas de: (A) *Edwardsiella tarda* procedentes del pez diana, y (B) *E. tarda* procedentes de un pez distinto del pez diana, donde cuando la cepa (A) es una cepa típica de *E. tarda*, la (B) es una cepa atípica, y cuando la cepa (A) es una cepa atípica, la (B) es una cepa típica (reivindicaciones de la 1 a la 4). También se incluye una vacuna para la edwardsielosis y/o estreptococosis en un falso halibut, que comprende células inactivadas de: (A) *E. tarda* típica procedentes de un falso halibut; (B) *E. tarda* atípica procedentes de un pez distinto del falso halibut; y (C) *Streptococcus iniae* y *Streptococcus parauberis* (reivindicaciones de la 5 a la 7).

En D01 se muestra que cepas de *E. tarda* atípica procedentes de la dorada del Japón (*Pagrus major*) y el sargo púrpura (*Evynnis japonica*), presentan el mismo serotipo, y poseen antígenos de superficie semejantes a los de las cepas de *E. tarda* típica aisladas de la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) y el falso halibut (*Paralichthys olivaceus*). Esto abre la posibilidad del desarrollo de una vacuna conjunta. Sin embargo, no se apunta el hecho de que una vacuna con cepas de *E. tarda* típica y atípica, estimule la respuesta inmune frente al antígeno de una manera sinérgica.

D02 realiza un estudio sobre la patogenicidad de cepas de *E. tarda* típica y atípica, en el pez limón del Japón (*Seriola quinqueradiata*), falso halibut (*Paralichthys olivaceus*) y dorada del Japón (*Pagrus major*). Las cepas de *E. tarda* típica se aislaron de anguila, tilapia y falso halibut, mientras que las atípicas de dorada del Japón. La patogenicidad de *E. tarda* típica y atípica fue similar en el pez limón del Japón. Sin embargo, la dorada del Japón fue muy susceptible a la infección con *E. tarda* atípica y muy poco a *E. tarda* típica, ocurriendo lo contrario en el falso halibut (éste es mucho más sensible a *E. tarda* típica). No obstante, no se sugiere el desarrollo de una vacuna en la que se encuentren ambos tipos de cepa.

En D03 se divulgan los resultados obtenidos tras la vacunación del falso halibut (*P. olivaceus*) con distintas cepas de *E. tarda* típica tratadas con formalina y diferentes métodos de administración (intraperitoneal, oral y por inmersión).

D04 estudia la eficacia de distintos métodos de administración de una vacuna de cepas de *Streptococcus iniae* tratadas con formalina, en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

En D05 se investiga cuáles son las cepas causantes de estreptococosis en los falsos halibuts (*P. olivaceus*) de una piscifactoría coreana, siendo uno de los principales patógenos *Streptococcus parauberis*.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

1.REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 4

La reivindicación 1 tiene por objeto, una vacuna para edwardsielosis que comprende: (A) células inactivadas de una cepa de *Edwardsiella tarda* procedentes del pez diana, y (B) células inactivadas de *E. tarda* procedentes de un pez distinto del pez diana, donde cuando la cepa (A) es una cepa típica de *E. tarda*, la (B) es una cepa atípica, y cuando la cepa (A) es una cepa atípica, la (B) es una cepa típica.

D01 y D02 divulgan respectivamente, estudios de antigenicidad y virulencia de distintas cepas de *E. tarda* típica y atípica. Sin embargo, no sugieren la eficacia de una vacuna con ambas cepas. Por otro lado, en D03 se anticipa una vacuna con cepas tratadas con formalina de *E. tarda* típica, no apuntándose la posible incorporación de cepas de *E. tarda* atípica a dicha vacuna.

Por lo tanto, ninguno de los documentos de D01 a D03, considerados solos o en combinación, sugieren el efecto sinérgico de la vacuna con cepas de *E. tarda* típica y atípica, en la respuesta inmune frente a un antígeno.

En consecuencia, la reivindicación 1 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones de la 2 a la 4 son dependientes de la 1, y como ésta también presentan novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

2.REIVINDICACIONES DE LA 5 A LA 7

La reivindicación 5 tiene por objeto, una vacuna para la edwardsielosis y/o estreptococosis de un falso halibut, que comprende células inactivadas de: (A) *E. tarda* típica procedentes de un falso halibut; (B) *E. tarda* atípica procedentes de un pez distinto del falso halibut; y (C) *Streptococcus iniae* y *Streptococcus parauberis*.

Dado que ninguno de los documentos D01, D02 o D03, anticipan el efecto inmunoestimulante frente a un antígeno, de la mezcla de cepas de *E. tarda* típica y atípica, la vacuna que comprende ambas cepas junto con *S. iniae* y *S. parauberis*, es nueva e inventiva, aunque se conociera la patogenicidad de estas últimas (ver documentos D04 y D05).

En consecuencia, la reivindicación 5 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones 6 y 7 son dependientes de la reivindicación 5, y como ésta también son nuevas y tienen actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).