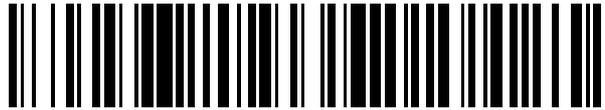


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 679**

51 Int. Cl.:

C12R 1/01 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2013 PCT/EP2013/072319**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14064217**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2013 E 13792604 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2912198**

54 Título: **Composición inmunogénica contra Aeromonas hydrophila**

30 Prioridad:

24.10.2012 VN 201203153
18.06.2013 DK 201370328

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2018

73 Titular/es:

PHARMAQ AS (100.0%)
Skogmo Industriområde
7863 Overhalla, NO

72 Inventor/es:

TUNG, VO THANH;
PHUONG, TRAN DUY;
PHUONG, LE THI KIM;
PHUC, NGUYEN TRUONG;
NYGAARD, ANJA;
HUNGERHOLDT, LIV BLOM y
KLEVAN, LEIF ARE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 655 679 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición inmunogénica contra *Aeromonas hydrophila*

Campo técnico de la invención

5 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una composición, por ejemplo, en forma de una composición inmunogénica o una vacuna, para la protección de los peces, tales como los peces del orden de los Siluriformes, Perciformes y Cypriniformes contra la infección por *Aeromonas hydrophila*. Más específicamente, los inventores han descubierto sorprendentemente que dos biotipos diferentes, el biotipo A y el B, de *Aeromonas hydrophila* son capaces de tener virulencia en peces, tal como peces del orden de Siluriformes, Perciformes y Cypriniformes. Además, los inventores ha descubierto sorprendentemente que combinando cantidades inmunogénicas de las dos cepas altamente virulentas de *Aeromonas hydrophila*, una que pertenece al biotipo A y una que pertenece al biotipo B, por ejemplo, en una composición inmunogénica o en una vacuna, dicha combinación sorprendentemente se convertía en capaz para proporcionar una protección profiláctica de los peces, tales como peces del orden de Siluriformes, Perciformes y Cypriniformes contra la infección causada por *Aeromonas hydrophila*.

Antecedentes de la invención

15 En Santos Y. y col. 1987 se estudiaron la relación entre las características fenotípicas de ciertas especies de *Aeromonas* incluyendo *Aeromonas hydrophila*, y la virulencia en la trucha asalmonada (*Salmo gairdneri*) analizando las propiedades bioquímicas, enzimáticas y de superficie celular de varias cepas de *Aeromonas* diferentes aisladas de sistemas de cultivo de peces. Sin embargo, no existe una divulgación o sugerencia ni de los biotipos A y B patogénicos específicos de *Aeromonas hydrophila* ni de ninguna vacuna para peces basada en dichos biotipos.

20 En Esteve C. y col. 1993 se desafiaron anguilas europeas tanto por vía intraperitoneal y por exposición en el agua con ciertas cepas de *Aeromonas hydrophila*. Basándose en los experimentos del desafío los autores *inter alia* concluyeron que la *Aeromonas hydrophila* actuaba como los patógenos primarios de la anguila europea. Sin embargo, no existe divulgación o sugerencia ni de los biotipos A y B patogénicos específicos de *Aeromonas hydrophila* ni de ninguna vacuna para peces basada en dichos biotipos.

25 En Chandran M. R. y col (2002), se inmunizaron carpas mayores de la india *Catla catla*, *Labeo rohita* y *Cirrhinus mrigala* contra *Aeromonas hydrophila* en condiciones de campo.

30 En Phan y col. 2009, se estudiaron distintos aspectos de la acuicultura intensiva del pez gato listado, *Pangasianodon hypophthalmus* en el delta del Mekong en Vietnam. Se informó de que una consecuencia de la cría de peces intensificada era *inter alia* una tasa de mortalidad de hasta el 30 % durante los primeros a la mitad de los meses de un ciclo de producción. Los autores también informaron que el manejo de la sanidad en las piscifactorías de peces gato implica principalmente el tratamiento químico, a menudo con antibióticos y el uso de aditivos alimentarios (vitamina C). Sin embargo, no existe divulgación o sugerencia ni de los biotipos A y B patogénicos específicos de *Aeromonas hydrophila* ni de ninguna vacuna para peces basada en dichos biotipos.

35 En M. E. Martino y col. 2011 el desafío en la técnica del establecimiento de una unión inequívoca entre el género *Aeromonas* y la patogénesis se desveló como que era extremadamente complicada, por ejemplo, debido a la taxonomía altamente compleja de las *Aeromonas*. El artículo desvela además que solo un pequeño subconjunto de cepas que contienen genes de potenciales factores de virulencia parece que producen la infección. También se desvelaron los desafíos en la técnica de discriminar con precisión entre las especies de *Aeromonas*. También se concibió que la diversidad microbiana (por ejemplo, la relación filogenética y taxonómica) entre las cepas se analizadas se podía determinar basándose en la tipificación de secuencia multilocus (MSLT) y las características fenotípicas. Entre las cepas de *Aeromonas* ensayadas estaban *i.a.* *Aeromonas hydrophila* recolectada de la piel y el riñón de, por ejemplo, la trucha arcoíris, besugo y Carpa. Basándose en dichos procedimientos, los autores fueron capaces de establecer las relaciones taxonómicas entre las cepas y los fenotipos de *Aeromonas* analizadas y mostraban en términos generales que la *Aeromonas hydrophila* se ajustan en el mismo fenogruppo, descrito como complejo *Aeromonas hydrophila*. Sin embargo, no existe divulgación o sugerencia ni de los biotipos A y B patogénicos específicos de *Aeromonas hydrophila* ni de ninguna vacuna para peces basada en dichos biotipos.

45 En Pridgeon J. W. y Klesius P. H., 2011, se desvelan vacuna atenuadas basadas en los "aislados West Alabama 2009" virulentos y resistentes a antibióticos de *Aeromonas hydrophila* para su uso en el pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) y la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). El artículo también desvela que es bien conocido que la *Aeromonas hydrophila* es muy heterogénea bioquímica y serológicamente, lo que se considera el mayor obstáculo en el desarrollo de una vacuna comercial eficaz contra *Aeromonas hydrophila*. De manera adicional, el artículo desvela que la *Aeromonas hydrophila* resistente a antibióticos tenía una virulencia atenuada, y por lo tanto, se consideraba que era adecuada para su uso en vacunas para peces. Tanto la inyección IP como el baño por inmersión se desvelaron como vías de administración posibles de la vacuna. Sin embargo, no se desvela una vacuna de combinación, que implique dos o más biotipos específicos de *Aeromonas hydrophila*.

También se describen estudios de la exposición de peces a *Aeromonas hydrophila* en los documentos WO 2010/099444, US 2012/258139, Crumlish M. y col. (2010), y Pridgeon J. W. y col (Vaccine 2011).

- 5 En Zheng W. y col., 2012, se estudió la infección bacteriana en carpas herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*) con cuatro cepas virulentas y resistentes a antibióticos diferentes de *Aeromonas hydrophila*. De acuerdo con el artículo las cuatro cepas se identificaron como aislados de *Aeromonas hydrophila* diferentes utilizando el sistema ATB 34GN, análisis filogenético, reacción en cadena de la polimerasa de consenso intergénico repetitivo enterobacteriano (ERIC-PCR). El artículo desvela además que la multi-infección con cepas de *Aeromonas hydrophila* puede ser un problema emergente en la cría de la carpa herbívora. Sin embargo, aunque se considera la infección como múltiples cepas de *Aeromonas hydrophila* en carpas herbívoras y en piscicultura moderna en general, el artículo ni desvela ni sugiere vacunas de peces combinadas basadas en *Aeromonas hydrophila* para su uso profiláctico en dichas infecciones. De hecho, el artículo considera que el tratamiento de la multi-infección de *Aeromonas hydrophila* se podría llevar a cabo por el uso de fármacos de piscicultura comunes tales como la norfloxacin (la norfloxacin es un antibiótico de amplio espectro que es activo tanto en bacterias Gram-positivas como bacterianas Gram-negativas).
- 10
- 15 La solicitud de patente china CN 101642567 desvela una vacuna inactivada para peces basada en cepas patógenas no definidas de *Aeromonas hydrophila*, así como la preparación de dicha vacuna, para la prevención y tratamiento de la septicemia bacteriana en la carpa. La vacuna se define por el procedimiento por el que las cepas patógenas – pero indefinidas- de *Aeromonas hydrophila* se extraen de carpas infectadas y se utilizan posteriormente para la preparación de una suspensión bacteriana para su uso en la vacuna. Sin embargo, no existe una divulgación o sugerencia ni de los biotipos A y B patogénicos específicos de *Aeromonas hydrophila* ni de ninguna vacuna para peces basada en dichos biotipos.
- 20

Estado de la técnica – consideraciones generales

- La *Aeromonas hydrophila*, un bacilo móvil Gram negativo ampliamente distribuido en el ambiente acuático, se considera habitualmente un patógeno secundario, pero también es el agente causal de la septicemia por *Aeromonas*. Las especies de peces afectadas son *inter alia* tilapia, pez gato, pez dorado, carpa común y anguila (Priodegon y col 2009). En años recientes, algunas cepas de *Aeromonas hydrophila* también se han identificado como altamente virulentas para las carpas (Zheng y col 2012) y pez gato (Priodegon y col 2009).
- 25

- En la cría de *Pangasius* en Vietnam, la *Edwardsiella ictaluri* ha sido la causa principal de mortalidad y de acuerdo con Phan y col. (2009) el 98 % de las piscifactorías del Delta del Mekong en Vietnam del Sur estaban afectadas. Phan y col. también mencionan que el 61 % de las piscifactorías estaban afectadas por el punto rojo. La mortalidad en el grupo de la enfermedad del grupo rojo está producida más probablemente por *Aeromonas hydrophila*. La enfermedad identificada últimamente en Vietnam como hemorrágica, que produce puntos rojos causados por *Aeromonas hydrophila* ha aumentado produciendo grandes pérdidas económicas para los piscicultores.
- 30

- La *Aeromonas hydrophila* es ubicua en la naturaleza e incluso se encuentra en el tracto intestinal de los peces. En situaciones naturales en peces de vida silvestre, las infecciones con *Aeromonas hydrophila* no causan en general problemas importantes. Sin embargo, en los sistemas de piscicultura intensiva, tanto si estos sistemas son de estanques al exterior o acuarios o depósitos interiores, se deben considerar otros factores. La existencia común de esta enfermedad se relaciona con las condiciones de estrés o factores similares de los peces. Se está comúnmente de acuerdo en el campo de acuicultura que los peces se estresan fácilmente cuando se manejan mal, por sobrepoblación, se transportan en malas condiciones, tienen un nivel bajo de nutrición, tienen poca calidad del agua, etc. Esto se conoce bien en la técnica.
- 35
- 40

- En todas las formas de acuicultura intensiva, cuando se crían especies únicas o múltiples a altas densidades, los agentes de enfermedades infecciosas se transmiten fácilmente entre los individuos. Debido a la eficacia del transporte de agentes patógenos en el agua y la alta densidad de animales que se utilizan en la piscicultura a gran escala comercial, los agentes patógenos se diseminan rápidamente en una población de peces cultivados.
- 45

- Se sabe bien en la técnica que los peces infectados con *Aeromonas hydrophila* pueden tener muchos síntomas diferentes que varían desde la muerte súbita hasta un pez sano de otra manera que tiene falta de apetito, anomalías de natación, agallas pálidas, apariencia hinchada, úlceras en la piel y exoftalmia. Las úlceras en la piel se pueden producir en cualquier sitio del pez y a menudo están rodeadas de un borde brillante de tejido rojo. Otros órganos que se afectan comúnmente con esta enfermedad incluyen las agallas, riñones, hígado, bazo, páncreas y músculo esquelético. Los síntomas varían ya que dependen de varios factores, en particular relacionados con la diversidad del grupo de bacterias incluyendo la virulencia del organismo, así como también los factores relacionados con el pez, como la resistencia del pez a la infección, la presencia o ausencia de bacteriemia o septicemia así como los factores medioambientales. En efecto, los brotes clínicos de *Aeromonas hydrophila* pueden ser potencialmente económicamente desastrosos para el piscicultor.
- 50
- 55

Por lo tanto, tradicionalmente, las enfermedades infecciosas en peces criados en piscifactorías se han prevenido por el uso de antibióticos. Sin embargo, el uso de antibióticos implica una multiplicidad de problemas potenciales.

Después de la medicación intensiva, repetida utilizando el mismo agente antibacteriano, a menudo se ve una reducción de la eficacia después de un periodo de tiempo contra la enfermedad en cuestión. Como consecuencia de la aparición de resistencias, los tratamientos se deben repetir o emplear nuevos agentes. Sin embargo, la resistencia a antibióticos no es solo un problema de salud de los peces. La resistencia se puede desarrollar en otras bacterias de los sedimentos y el agua, diseminándose de esta manera a otros organismos en el medioambiente acuático. La carga total de bacterias resistentes en la población está sometida a este crecimiento y puede crear nuevos problemas para la salud humana.

Más específicamente, hasta ahora el tratamiento de peces del orden de Siluriformes, Perciformes, y Cypriniformes contra la infección por *Aeromonas hydrophila* se ha limitado a dos antibióticos, oxitetraciclina y sulfonamidas potenciadas. Como se ha mencionado, los problemas potenciales asociados con cualquier terapia antibiótica incluyen los niveles de dosificación inadecuados, sobredosificación, resistencia a fármacos por las bacterias y la quelación del calcio en agua dura en el caso de la oxitetraciclina que se utiliza en una inmersión o baño.

Por lo tanto es deseable que el uso de antibióticos en la industria piscícola se reduzca o preferentemente eliminada. A este respecto es particularmente deseable enfocarse en este problema en áreas geográficas tales como Sudeste de Asia, donde el desarrollo de vacunas y los esfuerzos sanitarios preventivos en general no han llegado más lejos, y donde un uso considerable de antibióticos sigue manteniéndose.

Estado de la técnica – consideraciones generales – vacunas de peces

Ya en los 70 se había probado que las vacunas de peces por inmersión basadas en caldos de cultivo inactivados en formalina eran eficaces contra ciertas infecciones bacterianas de los peces. La eficacia de estas vacunas resultaba inmediatamente en una disminución del uso de antibióticos. Sin embargo, las vacunas por inmersión resultaban que tenían un efecto insatisfactorio contra otros ciertos agentes patógenos para peces. En efecto, se desarrollaron vacunas inyectables que contenían adyuvantes, normalmente adyuvantadas con un aceite, a principios de los 90.

El manejo apropiado de los peces con buena higiene y estrés limitado son factores clave en la profilaxis de enfermedades infecciosas y también son una necesidad para el efecto óptimo de las vacunas. Idealmente, las vacunas dan una protección a largo plazo contra una multiplicidad de enfermedades infecciosas, se pueden administrar simplemente, son seguras de usar tanto para el pez como para el administrador y son provechosas. Además, en comparación con los antibióticos, las vacunas son respetuosas medioambientalmente.

Se conocen varios tipos diferentes de vacunas para peces en la técnica, incluyendo las vacunas inactivadas, vivas y de ADN. En general, hay tres modelos principales para la aplicación de vacunas: oral, por inmersión y por inyección. Mientras que las vacunas orales normalmente dan lugar a una protección a corto plazo; las vacunas por inmersión dan una protección mejor, mientras que las vacunas inyectables dan la protección mejor y de mayor duración y son las más baratas.

No obstante, hoy día, la vacunación es una parte integral de las piscifactorías más modernas y el uso de antibióticos se ha reducido considerablemente durante las dos décadas pasadas. En particular, en el Norte de Europa y Norteamérica. En partes extensas de Sudamérica y el Sudeste de Asia, sin embargo, aún se utilizan intensivamente los antibióticos en las piscifactorías comerciales, lo que, en consecuencia, produce los efectos secundarios que se han resaltado anteriormente, por ejemplo, en términos de resistencia. Por lo tanto, es deseable desarrollar vacunas específicas y eficaces contra las enfermedades infecciosas producidas por ejemplo, por bacterias resistentes a antibióticos en piscifactorías, por ejemplo, en el Sudeste asiático.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a bacterias de *Aeromonas hydrophila* biotipo A y B, de los cuales se han depositado aislados representativos bajo el "Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimientos de Patente de 28 de abril de 1977".

Específicamente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- (i) una cantidad inmunogénica de una bacteria viva atenuada o inactivada de *Aeromonas hydrophila* biotipo A;
- y
- (ii) una cantidad inmunogénica de una cantidad de una bacteria viva atenuada o inactivada de *Aeromonas hydrophila* biotipo B.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A, para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de septicemia en peces y/o para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces. La composición se co-administra con una composición que comprende una bacteria de la *Aeromonas hydrophila* biotipo B.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B, para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de septicemia en un pez

y/o para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces, en el que dicha composición se co-administra con una composición que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A.

5 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de una composición del primer aspecto. El procedimiento comprende la combinación de:

- (i) una cantidad inmunogénica de una bacteria viva atenuada o inactivada de *Aeromonas hydrophila* biotipo A;
- y
- (ii) una cantidad inmunogénica de una bacteria viva atenuada o inactivada de *Aeromonas hydrophila* biotipo B.

10 Para los fines de cada uno del primer al cuarto aspectos de la presente invención, una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A se define como la que tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, y/o un gen de la citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1.

15 Además, para los fines de la presente invención, una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B se define como la que tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 4 y/o un gen de la citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 3.

Breve descripción de las figuras

20 La Figura 1 muestra la máxima probabilidad del árbol filogenético de 24 cepas de *Aeromonas* utilizando la información genética empleada en gltA y metG. Solo se muestran los valores ontológicos por encima de 50. Los dos grupos filogenéticos conservados se marcan como A y B. El tipo de secuencia (ST) se muestra en todas las cepas de referencia.

25 La Figura 2 muestra el % de mortalidad acumulada en *Pangasius* (eje y) y se representa contra el tipo (eje x). Los *Pangasius* se inyectaron por vía intraperitoneal con el biotipo A, el biotipo B u otra cepa de *Aeromonas hydrophila* (PQ100155). Se controló la mortalidad continuamente.

La presente invención se describirá ahora con más detalle a continuación.

Descripción de la invención

Biotipo A

30 Los inventores han descubierto que las composiciones inmunogénicas basadas en bacterias de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A protegen completamente contra el biotipo A en estudios de desafío en peces del orden Siluriformes, Perciformes, y Cypriniformes y proporciona una respuesta de anticuerpos satisfactoria contra el biotipo A.

35 En algunas realizaciones, la bacteria de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A está representada por la bacteria depositada bajo el "Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimientos de Patente de 28 de abril de 1977" en las Colecciones de Cultivos de la Agencia de Protección de la Salud, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, RU bajo el número de acceso 12082901.

Los inventores han sido capaces de establecer también la caracterización tanto genotípica como fenotípica de la cepa del biotipo A definida anteriormente.

40 Además, se ha establecido que la bacteria del biotipo A definida anteriormente es capaz de inducir signos clínicos específicos en los peces infectados. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la bacteria de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A tiene la capacidad de inducir signos clínicos de septicemia, y opcionalmente mortalidad en *Pangasius (Pangasianodon hypophthalmus)* cuando se inyectaban por vía intraperitoneal en peces que pesaban 10-20 gramos en una cantidad de 100-2000 ufc/pez y un volumen de inyección de 0,1 ml.

45 Por lo tanto, en una realización adicional, la invención se refiere también a la bacteria del biotipo A definida anteriormente que tiene la capacidad para inducir signos clínicos de septicemia, y opcionalmente, una mortalidad de al menos el 50 % en los *Pangasius (Pangasianodon hypophthalmus)* a los 2-5 días después de la inyección intraperitoneal de dicha bacteria en peces que pesaban 10-20 gramos en una cantidad de 100-2000 ufc/pez y un volumen de inyección de 0,1 ml.

50 La capacidad definida anteriormente de la bacteria del biotipo A para inducir mortalidad en *Pangasius*, puede ser la capacidad de producir al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o tal como al menos un 90 % o el 100 % de mortalidad. En realizaciones particulares, la capacidad para inducir mortalidad se determina poco después de que se hayan aislado las bacterias de un brote clínico, es decir, antes del almacenamiento extendido.

En particular, el pez de acuerdo con las realizaciones anteriores puede tener un peso tal como: 10-20 gramos, 12-19 gramos, 14-19 gramos, 16-19 gramos, 17-18 gramos o 18 gramos. De manera adicional, las realizaciones anteriores se pueden aplicar a los peces comenzando con un peso de 5 gramos y se pueden aplicar adicionalmente durante el ciclo de producción.

- 5 Además, la cantidad de bacterias inyectadas en las realizaciones anteriores puede ser de 100-2000 ufc/pez, 200-1500 ufc/pez, 300-1000 ufc/pez, 400-800 ufc/pez, 500-700 ufc/pez o menos de 500 ufc/pez.

Los inventores han establecido también que las bacteria de interés definida anteriormente para la presente invención puede tener un cierto nivel de identidad con dos genes secuenciados específicos de la cepa depositada del biotipo A. Específicamente la bacteria del biotipo A definida anteriormente presentaba las siguientes características genotípicas: tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 2 y/o un gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 1.

10 En particular, la bacteria del biotipo A definida anteriormente presenta entre un 99,1 % - 99,2 %, 99,2 % - 99,3 %, 99,3 %-99,4 %, 99,4 % - 99,5 %, 99,5 % - 99,6 %, 99,6 % - 99,7 %, 99,7 % - 99,8 %, 99,8 % - 99,9 %, 99,9 %-100 % de identidad con la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 1.

Además, la bacteria del biotipo A definida anteriormente presenta entre un 99,1 % - 99,2 %, 99,2 % - 99,3 %, 99,3 %-99,4 %, 99,4 % - 99,5 %, 99,5 % - 99,6 %, 99,6 % - 99,7 %, 99,7 % - 99,8 %, 99,8 % - 99,9 %, 99,9 %-100 % de identidad con la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 2.

20 Como se ha mencionado, los inventores han establecido adicionalmente las características serológicas de la bacteria del biotipo A definida anteriormente de interés para la presente invención. La bacteria definida anteriormente reacciona con el antisuero de peces inmunizados con las bacterias del biotipo A identificadas anteriormente como se determina en un ensayo de aglutinación directa o un ensayo de aglutinación en portaobjetos como se describe en el presente documento.

25 Se utiliza un ensayo de aglutinación directa: El suero de dicho pez se puede añadir en diluciones en serie en receptáculos adecuados tales como pocillos de una placa de microtitulación, y se añade un volumen igual de bacterias a cada receptáculo o pocillo. Las bacterias se pueden preparar por transferencias de colonias únicas a TSB (Caldo de soja trípico) seguido por incubación a 28 °C durante 12 horas. El receptáculo se incuba a una temperatura adecuada, por ejemplo a 4 °C y se registran los resultados, tal como después de 8 horas y 24 horas. Un resultado positivo es cuando las bacterias se agregan para formar estructuras fácilmente observables a simple vista. Un resultado negativo es cuando la solución permanece turbia y no forma agregados. La mayor dilución de suero donde se observa la aglutinación se registra como el resultado.

30 De manera alternativa, la capacidad de una bacteria para reaccionar con el antisuero del pez inmunizado con la bacteria depositada se puede determinar utilizando el ensayo de aglutinación en portaobjetos como se describe en el presente documento. Un ensayo de aglutinación en portaobjetos se puede llevar a cabo depositando una gota de solución salina estéril en un portaobjetos limpio. Entonces se mezcla una única colonia con el agua. Se añade una gota del suero del pez, y el resultado se registra después de 30 segundos. Un resultado positivo es cuando el agregado bacteriano forma estructuras fácilmente observables a simple vista. Un resultado negativo es cuando la solución se mantiene turbia y no forma agregados.

35 En cualquiera de los ensayos es preferible utilizar una dilución de 1:2, tal como 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1: 1024 o tal como 1:2048.

Biotipo B

Los inventores han descubierto que las composiciones inmunogénicas basadas en bacterias de *Aeromonas hydrophila* del biotipo B protegen completamente contra el biotipo B en estudios de desafío en peces del orden Siluriformes, Perciformes, y Cypriniformes y proporciona una respuesta de anticuerpos satisfactoria contra el biotipo B.

En algunas realizaciones, la bacteria de *Aeromonas hydrophila* del biotipo B está representada por la bacteria depositada bajo el "Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimientos de Patente de 28 de abril de 1977" en las Colecciones de Cultivos de la Agencia de Protección de la Salud, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, RU bajo el número de acceso 12082902.

50 Los inventores han sido capaces de establecer también la caracterización tanto genotípica como fenotípica de la cepa del biotipo B definida anteriormente.

Además, se ha establecido que la bacteria del biotipo B definida anteriormente es capaz de inducir signos clínicos específicos en los peces infectados. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la bacteria de *Aeromonas hydrophila* del biotipo B tiene la capacidad de inducir signos clínicos de septicemia, y opcionalmente mortalidad en *Pangasius* (*Pangasianodon hypophthalmus*) cuando se inyectaban por vía intraperitoneal en peces que pesaban 10-20 gramos

en una cantidad de 100-6000 ufc/pez y un volumen de inyección de 0,1 ml.

5 Por lo tanto, en una realización adicional, la invención se refiere también a la bacteria del biotipo B definida anteriormente que tiene la capacidad para inducir signos clínicos de septicemia, y opcionalmente, una mortalidad de al menos el 50 % en los *Pangasius* (*Pangasianodon hypophthalmus*) a los 2-5 días después de la inyección intraperitoneal de dicha bacteria en peces que pesaban 10-20 gramos en una cantidad de 100-6000 ufc/pez y un volumen de inyección de 0,1 ml.

La capacidad definida anteriormente de la bacteria del biotipo B para inducir mortalidad en *Pangasius*, puede ser la capacidad de producir al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o tal como al menos un 90 % o el 100 % de mortalidad.

10 En particular, el pez de acuerdo con las realizaciones anteriores puede tener un peso tal como: 10-20 gramos, 12-19 gramos, 14-19 gramos, 16-19 gramos, 17-18 gramos o 18 gramos. De manera adicional, las realizaciones anteriores se pueden aplicar a los peces comenzando con un peso de 5 gramos y se pueden aplicar adicionalmente durante el ciclo de producción.

15 Además, la cantidad de bacterias inyectadas en las realizaciones anteriores puede ser de 100-6000 ufc/pez, 200-5000 ufc/pez, 300-4000 ufc/pez, 400-3000 ufc/pez, 500-2000 ufc/pez, 600-1000 ufc/pez o menos de 500 ufc/pez.

20 Los inventores han establecido también que las bacteria de interés definida anteriormente para la presente invención puede tener un cierto nivel de identidad con dos genes secuenciados específicos de la cepa depositada del biotipo B. Específicamente la bacteria del biotipo B definida anteriormente presentaba las siguientes características genotípicas: tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 2 y/o un gen de la Citrato sintasa I (glfA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 3.

En particular, la bacteria del biotipo B definida anteriormente presenta entre un 99,1 % - 99,2 %, 99,2 % - 99,3 %, 99,3 %-99,4 %, 99,4 % - 99,5 %, 99,5 % - 99,6 %, 99,6 % - 99,7 %, 99,7 % - 99,8 %, 99,8 % - 99,9 %, 99,9 %-100 % de identidad con la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 3.

25 Además, la bacteria del biotipo B definida anteriormente presenta entre un 99,1 % - 99,2 %, 99,2 % - 99,3 %, 99,3 %-99,4 %, 99,4 % - 99,5 %, 99,5 % - 99,6 %, 99,6 % - 99,7 %, 99,7 % - 99,8 %, 99,8 % - 99,9 %, 99,9 %-100 % de identidad con la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 4.

30 Como se ha mencionado, los inventores han establecido adicionalmente las características serológicas de la bacteria del biotipo B definida anteriormente de interés para la presente invención. La bacteria definida anteriormente reacciona con el antisuero de peces inmunizados con las bacterias del biotipo B depositadas identificadas anteriormente como se determina en un ensayo de aglutinación directa o un ensayo de aglutinación en portaobjetos como se ha descrito anteriormente.

Composición

35 Los inventores han descubierto composiciones inmunogénicas basadas en bacterias de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A y composiciones inmunogénicas basadas en bacterias de *Aeromonas hydrophila* del biotipo B y proporciona respuestas de anticuerpos satisfactorias para proteger completamente contra los biotipos A y B, respectivamente, en estudios de desafío en peces del orden Siluriformes, Perciformes, y Cypriniformes. El hallazgo sorprendente a este respecto reside en que los inventores se dieron cuenta de que combinando las dos cepas en una vacuna, dicha supresión inmunitaria parece que se neutraliza cuando los peces se inmunizan con los dos biotipos de *Aeromonas hydrophila*, a saber (i) una cantidad inmunogénica de bacterias de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A representada por una cepa depositada bajo el "Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimientos de Patente de 28 de abril de 1977" con el número de acceso 12082901, y (ii) una cantidad inmunogénica de bacterias de *Aeromonas hydrophila* del biotipo B representada por una cepa depositada bajo el "Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimientos de Patente de 28 de abril de 1977" con el número de acceso 12082902. Las cepas de *A. hydrophila* son las que se han descrito anteriormente en el presente documento.

Por lo tanto, la invención se refiere a composiciones que comprenden cantidades inmunogénicas de las bacterias y/o el material antigénico y/o inmunogénico derivado de las mismas.

La invención proporciona una composición que comprende:

- 50 (i) una cantidad inmunogénica de una bacteria de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A;
y
(ii) una cantidad inmunogénica de una bacteria de *Aeromonas hydrophila* del biotipo B.

Habiendo sido capaz de establecer las características serológicas de las bacterias del biotipo A y B definidas anteriormente, la invención, por tanto, se refiere a la composición definida anteriormente que se caracteriza porque

la cantidad inmunogénica de dicha bacteria de *Aeromonas hydrophila* está en forma viva atenuada, inactivada o muerta o cualquier mezcla de las mismas.

En el campo de la acuicultura, la administración de vacunas necesita normalmente un extenso manejo de los peces, por ejemplo, en forma de transferir los peces a depósitos con anestesia, inyectar los peces con la vacuna y la transferencia de los peces posteriormente entre depósitos o estanques. Estos son solo unos ejemplos de actividades relacionadas con el programa de vacunación, lo que potencialmente podría causar estrés y aumentar la mortalidad de los peces cultivados. Debido a la gran escala de los programas de vacunación en la acuicultura moderna son costos, de trabajo intensivo, y capaces de producir estrés en los peces. Por estas razones es deseable proporcionar las vacunas a los peces contra varias enfermedades infecciosas preferentemente en forma de por ejemplo, vacunas combinadas, polivalentes que contienen varios antígenos capaces de combatir varias enfermedades infecciosas.

En este contexto, los inventores han establecido adicionalmente que combinando los aislados de *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al biotipo A y B con otro antígeno, tal como, pero sin limitarse a, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnaris*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*, en por ejemplo, una composición inmunogénica o una vacuna es capaz de proporcionar respuestas inmunológicas eficaces en los peces desafiados con dichos antígenos. Se ha demostrado *inter alia* que las composiciones inmunogénicas o vacunas en las que se combinan los antígenos de (i) *Aeromonas hydrophila* biotipo A y *Edwardsiella ictaluri* y se combinan los antígenos de (ii) *Aeromonas hydrophila* biotipo B y *Edwardsiella ictaluri* protegen contra el desafío frente a *Aeromonas hydrophila* que pertenecen a los biotipo A y biotipo B y *Edwardsiella ictaluri*.

Por lo tanto, en un aspecto adicional más de la invención, la composición definida anteriormente se caracteriza por que la cantidad inmunogénica de dicha bacteria de *Aeromonas hydrophila* se combina con uno o más antígenos adicionales, tales como los antígenos derivados de las bacterias *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnaris*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*.

Se ha demostrado adicionalmente que los efectos inmunológicos eficaces en peces inmunizados, por ejemplo mediante una composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la presente invención, necesita una mínima cantidad de antígeno.

Por lo tanto, en una realización adicional más de la invención, la composición definida anteriormente se caracteriza porque (i) las bacterias de *Aeromonas hydrophila* están presentes en cantidades de $\geq 10^7$ bacterias/ml.

En un estudio de comparación filogenética, los presentes inventores fueron capaces de demostrar – basándose en 24 cepas (11 cepas originarias de PHARMAQ y 13 cepas de referencia disponibles públicamente) – la relación filogenética entre el biotipo A y B de interés de acuerdo con la presente invención.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición definida anteriormente se caracteriza porque las secuencias de ADN de los genes de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) y Citrato sintasa I (gltA):

- (i) en las bacterias de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A son idénticos cuando se comparan internamente, y
- (ii) en las bacterias de *Aeromonas hydrophila* del biotipo B son idénticos cuando se comparan internamente, y
- (iii) cuando se comparan la *Aeromonas hydrophila* del biotipo A y la *Aeromonas hydrophila* del biotipo B presentan entre un 95-99,9 % de identidad de secuencia de ADN para gltA, y
- (iv) cuando se comparan la *Aeromonas hydrophila* del biotipo A y la *Aeromonas hydrophila* del biotipo B presentan entre un 95-99,9 % de identidad de secuencia de ADN para metG, y
- (v) cuando se comparan la *Aeromonas hydrophila* del biotipo A y la *Aeromonas hydrophila* del biotipo B presentan entre un 95-99,9 % de identidad de secuencia de ADN.

A este respecto, bajo el punto (iii), la identidad de secuencia de ADN del 95-99,9 % para gltA incluye *inter alia*: preferentemente un 96-99 % de identidad de secuencia de ADN para gltA, más preferentemente un 97-98 % de identidad de secuencia de ADN para gltA y más preferentemente un 97,4 % de identidad de secuencia de ADN para gltA.

Bajo el punto (iv), la identidad de secuencia de ADN del 95-99,9 % para metG incluye *inter alia*: preferentemente un 95,5-98 % de identidad de secuencia de ADN para metG, más preferentemente un 96-97 % de identidad de secuencia de ADN para metG y más preferentemente un 96,2 % de identidad de secuencia de ADN para metG.

Bajo el punto (v), la identidad de secuencia de ADN del 95-99,9 % cuando se comparan gltA y metG incluye *inter alia*: preferentemente un 95,5-98 % de identidad de secuencia de ADN cuando se comparan, más preferentemente un 96-97 % de identidad de secuencia de ADN cuando se comparan y más preferentemente un 96,2 % de identidad de secuencia de ADN cuando se comparan.

Como una realización adicional la composición definida anteriormente está en una forma de dosificación adecuada para la inyección intraperitoneal, por ejemplo, con un volumen de entre 0,01 y 0,2 ml/dosificación, más preferentemente 0,03-0,15 ml/dosificación, incluso más preferentemente entre 0,05-0,1 ml/dosificación.

En una realización adicional de la invención, la dosificación de la composición definida anteriormente se define como la que comprende bacterias de *Aeromonas hydrophila* en una cantidad de $\geq 10^7$ bacterias/ml.

5 Los inventores han demostrado que las vacunas con un antígeno del biotipo A protegen contra el desafío con *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al serogrupo A, pero no contra el desafío con aislados de *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al serogrupo B. Las vacunas con un antígeno del biotipo B protegen contra el desafío con *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al serogrupo B, pero no contra el desafío con *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al serogrupo A. Si la vacuna contiene antígenos de ambos biotipos, es decir los biotipos A y B de *Aeromonas hydrophila*, la vacuna protege contra el desafío con aislados de *Aeromonas hydrophila* de ambos biotipos A y B.

10 Además, se ha demostrado que la vacuna de combinación que comprende el biotipo A y el biotipo B es capaz de proporcionar eficazmente una protección contra las cepas ensayadas de brotes clínicos de por ejemplo, *Aeromonas hydrophila* en, por ejemplo, el Sudeste asiático, tal como los brotes en el delta del Mekong en Vietnam.

Por lo tanto, en este contexto, un aspecto adicional de la composición definida anteriormente está en forma de una composición inmunogénica tal como una vacuna.

15 En un aspecto adicional más, la invención se refiere a una composición como se define anteriormente para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de septicemia en peces/para el uso en la prevención o reducción de incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces, incluyendo *inter alia* los peces del orden Siluriformes, Perciformes y Cypriniformes. Si pertenecen al orden de Siluriformes los peces son preferentemente *Pangasius (Pangasianodon hypophthalmus)*.

20 *Uso*

La invención también se refiere al uso de una composición como se define anteriormente para la fabricación de un medicamento para prevenir o reducir la incidencia de septicemia en peces y/o para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces.

25 En realizaciones específicas la invención proporciona el uso de una bacteria de *Aeromonas hydrophila* de biotipo A como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la fabricación de una composición para la prevención o reducción de la incidencia de septicemia en peces/para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces del biotipo B.

30 En realizaciones igualmente específicas, la invención proporciona una bacteria de *Aeromonas hydrophila* de biotipo B como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la fabricación de una composición para la prevención o reducción de la incidencia de septicemia en peces/para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces del biotipo A.

35 Realizaciones adicionales proporcionan una composición que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A como se ha descrito anteriormente en el presente documento, para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de septicemia en peces/para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces, en el que dicha composición se co-administra con una composición que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* del biotipo B como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

40 Realizaciones adicionales más, proporcionan una composición que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* del biotipo B como se ha descrito anteriormente en el presente documento, para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de septicemia en peces/para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces, en el que dicha composición se co-administra con una composición que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

45 En este contexto, los peces son preferentemente del orden Siluriformes, Perciformes y Cypriniformes. Si pertenecen al orden de Siluriformes los peces son preferentemente *Pangasius (Pangasianodon hypophthalmus)*.

Procedimiento de fabricación

La invención también se refiere a un procedimiento de fabricación de una composición como se define anteriormente, que comprende la combinación de

- 50 (ii) una cantidad inmunogénica de una bacteria viva atenuada o inactivada de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A; y
 (iii) un material antigénico y/o inmunogénico que se selecciona de entre una cantidad inmunogénica de una bacteria viva atenuada o inactivada de *Aeromonas hydrophila* biotipo B.

La sección de ejemplos proporciona el fondo experimental de los aspectos reseñados anteriormente de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de la invención*Forma de bacterias utilizadas en la composición inmunogénica/vacuna*

5 La bacteria de la combinación vacunal de acuerdo con la invención puede estar presente en forma viva atenuada, en forma inactivada, por ejemplo, como una bacterina o incluso en forma fragmentada. El factor importante a este respecto es que las propiedades inmunogénicas de la bacteria sigan estando presentes.

10 Las bacterias vivas atenuadas tienen la ventaja sobre las bacterinas de que pueden darse fácilmente sin adyuvante. Además, se auto replican hasta cierto punto hasta que son paradas por el sistema inmunitario, lo que resulta en que se da un número de células menor. Por otra parte, las características inmunogénicas también están presentes en las bacterias cuando estas bacterias están en forma de bacterina ya que las bacterinas tienen *inter alia* la ventaja sobre las bacterias vivas atenuadas de que son muy seguras de usar.

Por lo tanto, en una forma preferida de la presente realización, la invención se refiere a una composición inmunogénica o vacuna en la que las células de *Aeromonas hydrophila* están inactivadas.

15 La inactivación de la bacteria se puede obtener por medios químicos o físicos. La inactivación química se puede llevar a cabo por el tratamiento de las bacterias, por ejemplo, pero sin limitarse a, por tratamiento con enzimas, con formaldehído (formalina), β -propiolactona o etilenimina o un derivado de los mismos, con un disolvente orgánico y/o detergente. La inactivación fisiológica puede llevarse a cabo ventajosamente sometiendo la bacteria a radiación rica en energía, tal como luz UV, radiación gamma o rayos X. Existen medios de inactivación bien conocidos en la técnica.

20 Los presentes inventores han experimentado que la inactivación con formaldehído (formalina) es además una estrategia útil de inactivación del biotipo A y B de *Aeromonas hydrophila*. Por lo tanto, en una realización preferida, las bacterias se inactivan por adición de formaldehído.

Aeromonas hydrophila biotipo A y B combinada con otros antígenos

25 La composición inmunogénica o la vacuna de acuerdo con la presente invención también engloba la combinación de *Aeromonas hydrophila* biotipo A y B con otros antígenos tales como, pero sin limitarse a *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnaris*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*.

Vehículos – adyuvantes farmacéuticamente aceptables

30 Las vacunas son distintas preparaciones de antígenos derivados de organismos patógenos específicos que se convierten en no-patógenos. Estimulan el sistema inmunitario y aumentan la resistencia a la enfermedad de una infección posterior por el patógeno específico. Una vacuna puede estar basada en agua o aceite. Normalmente, las vacunas inyectables se basan en aceite ya que el aceite proporciona cualidades adyuvantes. Esto significa que el aceite aumenta la eficacia de la vacuna así como la duración de la protección deseada.

35 Los adyuvantes oleosos de la presente invención adecuados para su uso en emulsiones de agua en aceite son, por ejemplo, aceites minerales o aceites metabolizables. Los aceites metabolizables son, por ejemplo, aceites vegetales, tales como aceite de maní y aceite de soja, aceites animales tales como aceites de pescado escualano y escualeno, y tocoferol y sus derivados.

40 Los adyuvantes adecuados de la presente invención son, por ejemplo, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua y emulsiones dobles de agua en aceite en agua. Se sabe en la técnica que especialmente las vacunas inactivadas, dichas bacterinas muestran una inmunogenicidad mejorada cuando se dan como una emulsión de agua en aceite.

45 A menudo, una vacuna o composición inmunogénica se mezcla con estabilizantes, por ejemplo, para proteger las proteínas con tendencia a la degradación de que sean degradadas, por ejemplo, para aumentar la vida de almacenamiento de la vacuna. Los estabilizadores útiles de la presente invención son *i.a.* carbohidratos, por ejemplo, sorbitol, manitol, trealosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, proteínas tales como albúmina o caseína o productos de degradación de las mismas, y tampones, tales como fosfatos alcalimetálicos, todos ellos conocidos en la técnica.

Además, la vacuna puede suspenderse en uno o más vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para su uso en una vacuna de acuerdo con la invención son agua estéril, solución salina, tampones acuosos tales como PBS y similares.

50 Las composiciones inmunogénicas o vacunas de acuerdo con la presente invención, especialmente las composiciones vacunales inmunogénicas que comprenden una bacterina, puede contener también, en una presentación preferida, una sustancia inmunoestimulante.

Las composiciones inmunogénicas o vacunas de acuerdo con la invención también puede comprender un denominado "vehículo". Un vehículo es un compuesto al que se adhieren las bacterias, sin estar unidas covalentemente al mismo. Dichos vehículos son *i.a.* bio-microcápsulas, micro-alginatos, liposomas y macrosoles, todos ellos conocidos en la técnica.

- 5 Además, las composiciones inmunogénicas o vacunas pueden comprender uno o más compuestos activos de superficie adecuados o emulsionantes, todos ellos conocidos en la técnica.

Un repaso extenso de adyuvantes adecuados para los peces y moluscos se da en el artículo de revisión de Jan Raa (1996). Los adyuvantes inorgánicos útiles serán conocidos por el experto en la técnica y se describen en JC Aguilar y EG Rodríguez, 2007, *Vaccine* 25, 3752 - 3762.

10 *Vías de administración (formas de dosificación)*

Se pueden aplicar muchas vías de administración, todas ellas conocidas en la técnica. Las composiciones inmunogénicas o vacunas de acuerdo con la invención se administra a los peces preferentemente mediante inyección, inmersión, remojo o vía oral. Especialmente la aplicación por inmersión y la inyección intraperitoneal son vías atractivas de administración. Como una realización preferida de la invención, la inyección intraperitoneal con una bacterina con un adyuvante es una vía muy eficaz de vacunación.

- 15 Aunque se pueden contemplar otras formas de dosificación, incluyendo las formas de dosificación sólida basadas en un pienso para peces o formas líquidas para inmersión, la forma de dosificación de acuerdo con la invención es preferentemente una forma de dosificación líquida, más preferentemente una forma de dosificación para inyección, tal como para inyección intraperitoneal.

- 20 A continuación se señalan diferentes vías y modos de administración de una vacuna de acuerdo con la invención.

Vía oral

La vacunación oral con antígeno, en la que la vacuna se mezcla con el pienso, se reviste en la parte superior del pienso (aditivo superior) o bio-encapsulados se conocen en la técnica. Cuando los antígenos se van a incorporar en el pienso, se tiene que considerar la sensibilidad del antígeno al calor. Cuando las vacunas se utilizan como aditivos superiores en el pienso, se aplica habitualmente un agente de revestimiento, para evitar la lixiviación del antígeno de los gránulos o para evitar la degradación del antígeno en el medio ácido del estómago del pez.

- 25 La bio-encapsulación se puede utilizar cuando se van a vacunar alevines. Por ejemplo, se incuban alimentos vivos tal como *Artemia nauplii*, copépodos o rotíferos, en una suspensión vacunal después de lo cual se les da como alimento a los alevines. Como estos organismos vivos son filtradores de alimento no selectivos, acumulan el antígeno en su tracto digestivo y por tanto, se transforman ellos mismos en microcápsulas vivas.

Vacuna por inmersión

El epitelio cutáneo y las agallas tienen mecanismos para proteger los peces de una manera amplia así como específica. La vacunación por inmersión funciona sobre la capacidad de las superficies mucosas para reconocer agentes patógenos que han estado en contacto con ellas. Cuando un pez se sumerge en agua que contiene la vacuna diluida, los antígenos suspendidos de la vacuna se pueden adsorber en la piel y las agallas. Entonces, células especializadas, tales como las células secretoras de anticuerpo, presentes en la piel y el epitelio de las agallas se activarán y protegerán al pez cuando el pez se exponga al agente patógeno vivo en un estadio posterior. Otras células que se localizan en el epitelio de la piel y las agallas, tales como las células presentadoras de antígeno (macrófagos/células dendríticas), también absorben antígenos vacunales y los transportan a los tejidos especializados donde se construye la respuesta inmunitaria sistémica.

- 35 El epitelio cutáneo y las agallas tienen mecanismos para proteger los peces de una manera amplia así como específica. La vacunación por inmersión funciona sobre la capacidad de las superficies mucosas para reconocer agentes patógenos que han estado en contacto con ellas. Cuando un pez se sumerge en agua que contiene la vacuna diluida, los antígenos suspendidos de la vacuna se pueden adsorber en la piel y las agallas. Entonces, células especializadas, tales como las células secretoras de anticuerpo, presentes en la piel y el epitelio de las agallas se activarán y protegerán al pez cuando el pez se exponga al agente patógeno vivo en un estadio posterior. Otras células que se localizan en el epitelio de la piel y las agallas, tales como las células presentadoras de antígeno (macrófagos/células dendríticas), también absorben antígenos vacunales y los transportan a los tejidos especializados donde se construye la respuesta inmunitaria sistémica.

En la vacunación por inmersión, hay dos procedimientos de aplicación: remojo y baño. En la vacunación por remojo, el pez se sumerge durante una duración muy corta, habitualmente 30 segundos, en una solución vacunal altamente concentrada, habitualmente 1 parte de producto vacunal por 9 partes de agua. Con la vacunación por baño, el pez se expone durante un periodo más largo, habitualmente una a varias horas, en una concentración de la vacuna más baja.

- 45 En la vacunación por inmersión, hay dos procedimientos de aplicación: remojo y baño. En la vacunación por remojo, el pez se sumerge durante una duración muy corta, habitualmente 30 segundos, en una solución vacunal altamente concentrada, habitualmente 1 parte de producto vacunal por 9 partes de agua. Con la vacunación por baño, el pez se expone durante un periodo más largo, habitualmente una a varias horas, en una concentración de la vacuna más baja.

Vacunación por inyección

Es necesaria una ligera anestesia del pez para la vacunación por inyección. Esto disminuye el estrés debido a la vacunación, evita los daños mecánicos y ayuda al pez a recuperarse más rápido del manejo.

Las vacunas por inyección se pueden administrar por inyección intramuscular o intraperitoneal (en la cavidad abdominal), pero la última es con mucho la más común y preferible de acuerdo con la invención. Como la inyección intraperitoneal implica la deposición de la vacuna en la cavidad abdominal, es importante que la aguja debiera penetrar la pared abdominal diana del pez 1 a 2 mm. Las agujas cortas pueden depositar la vacuna en la musculatura y producir inflamación y una pobre respuesta inmunitaria.

- 50 Las vacunas por inyección se pueden administrar por inyección intramuscular o intraperitoneal (en la cavidad abdominal), pero la última es con mucho la más común y preferible de acuerdo con la invención. Como la inyección intraperitoneal implica la deposición de la vacuna en la cavidad abdominal, es importante que la aguja debiera penetrar la pared abdominal diana del pez 1 a 2 mm. Las agujas cortas pueden depositar la vacuna en la musculatura y producir inflamación y una pobre respuesta inmunitaria.

Lleva habitualmente 2 o más semanas (habitualmente alrededor del grado de 400 días) antes de que se desarrolle una protección inmunitaria como resultado de la vacunación. Por lo tanto, es importante no estresar al pez en las semanas siguientes a la vacunación ya que se sabe que el estrés suprime la respuesta inmunitaria.

- 5 La vacunación inyección tiene varias ventajas principales que lo hacen el procedimiento de vacunación preferido. La vacunación por inyección proporciona una larga duración de la protección, es decir, preferentemente durante el ciclo de producción completo y permitir que se combinen múltiples antígenos en una única vacuna administrada en una única administración. Además, el piscicultor se asegura de que cada pez de la población reciba la vacuna a la dosis correcta.

Cantidades/volumen de bacterias utilizadas en la vacuna

- 10 Se entenderá que la vacuna de acuerdo con la invención debería contener antígenos en cantidades que sean suficientes para desencadenar una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmunitaria protectora, después de la administración adecuada (por ejemplo, la inyección peritoneal) de la composición en un pez.

Cuando se pretende para inyección peritoneal la forma de dosificación tiene preferentemente un volumen de entre 0.01 a 0.2 ml/pez, más preferentemente entre 0,03-0,1 mg/pez, incluso más preferentemente entre 0,05-0,1 ml/pez.

- 15 *Características genotípicas y fenotípicas relacionadas*

- 20 En realizaciones adicionales, la bacteria que se utiliza en la vacuna de la presente invención son cepas o aislados con características genotípicas que están relacionadas o similares a las de las cepas depositadas. Por "relacionado o similar" se significa que si se lleva a cabo una tipificación genética de acuerdo con el ejemplo 2, la cepa se encontraría en la misma categoría/grupo que las cepas depositadas. Encontrarse en la misma categoría/ grupo que la cepa depositada de acuerdo con la presente invención se define como la que comparte más del 99 % de identidad de secuencia de nucleótidos con los dos genes de acuerdo con el ejemplo 2.

- 25 En realizaciones adicionales más las bacterias utilizadas en la vacuna de la presente invención son cepas o aislados con características fenotípicas que están relacionadas o son similares a las de las cepas depositadas. Por "relacionado o similar" se significa que la cepa o aislado fenotípico similar/relacionado reaccionará con un antisuero preparado contra las cepas depositadas.

La vacuna de la presente invención es adecuada para su uso en peces, por ejemplo, en peces del orden de los Siluriformes, Perciformes y Cypriniformes, que incluyen pero no se limitan a los géneros: *Pangasius*, *Pangasionodon*, *Ictalurus*, *Oreochromis*, Tilapia, y *Cyprinus*.

Pangasius/Pangasionodon

- 30 *Pangasius* es un tipo de pez gato del Orden de los Siluriformes y en el género *Pangasiidae*. *Pangasiidae* es nativa del Río Mekong y la cuenca de Chao Phraya en Tailandia. El pez cultivado más importante para el mercado internacional es el *Pangasianodon hypophthalmus*. A menudo etiquetados en Norteamérica y Australia como "pez basa". En Europa, este pescado se comercializa comúnmente como "Pangasius" o "panga". *Pangasiidae* es uno de los tipos de acuicultura de crecimiento más rápido en el mundo y la mayoría de los *Pangasius* cultivados viene solo de una única especie *Pangasianodon hypophthalmus*. Un porcentaje pequeño también es de *Pangasius bocourti*. Vietnam es el mayor productor de especies de *Pangasius*.

- 40 Las especies del género *Pangasianodon* incluyen pero no se limitan a *Pangasianodon hypophthalmus* y *Pangasianodon gigas*. El género *Pangasius* incluye pero no se limita a: *Pangasius bocourti*, *Pangasius conchophilus*, *Pangasius djambal*, *Pangasius elongatus*, *Pangasius humeralis*, *Pangasius kinabatanganensis*, *Pangasius krempfi*, *Pangasius kunyit*, *Pangasius lamaudii*, *Pangasius lithostoma*, *Pangasius macronema*, *Pangasius mahakamensis*, *Pangasius mekongensis*, *Pangasius myanmar*, *Pangasius nasutus*, *Pangasius nieuwenhuisii*, *Pangasius pangasius*, *Pangasius polyuranodon*, *Pangasius rheophilus*, *Pangasius sabahensis*, y *Pangasius sanitwongsei*.

Pez gato americano (Ictalurus punctatis)

- 45 *Ictalurus punctatis* también es una especie del orden de los Siluriformes. También se concibe para la vacuna de la presente invención el pez gato americano (*Ictalurus punctatis*) que es la especie de pez gato más numerosa de Norteamérica debido *inter alia* a un rápido crecimiento de la acuicultura de esta especie en los Estados Unidos durante la última década. El pez gato americano también se produce en otros países, por ejemplo, en China.

Grupo Tilapia

- 50 La tribu Tilapiini, está en el orden de los Perciformes y la familia *Cichlidae* (Cíclidos) La tribu incluía los géneros *Oreochromis*, *Sarotherodon*, y *Tilapia*. El grupo Tilapia es uno de los peces comercialmente más importantes en la acuicultura, debido a su tamaño, crecimiento rápido, su naturaleza herbívora y palatabilidad. Las tilapias son el fono de los esfuerzos principales en acuicultura, por ejemplo, en China (siendo el mayor productor de tilapia en el mundo) seguida por Egipto, Indonesia, Filipinas, Tailandia, Brasil, Vietnam y Taiwán.

Las especies de la tribu Tilapiini incluyen pero no se limitan a *Oreochromis nicotilus*, *Oreomis aureus*, *Oreochromis hunter*, *Tilapia bakossiorum*, *Tilapia baloni*, *Tilapia bemini*, *Tilapia bilineata*, *Tilapia brevimanus*, *Tilapia busumana*, *Tilapia buttkoferi*, *Tilapia bythobates*, *Tilapia cabrae*, *Tilapia cameronensis*, *Tilapia camerunensis*, *Tilapia cessiona*, *Tilapia coffea*, *Tilapia congica*, *Tilapia dageti*, *Tilapia deckerti*, *Tilapia discolour*, *Tilapia flava*, *Tilapia guinasana* (Tilapia Otjikoto), *Tilapia guineensis* (tilapia Guineana), *Tilapia gutturosa*, *Tilapia imbriferina*, *Tilapia ismailiaensis*, *Tilapia jallae*, *Tilapia joka*, *Tilapia kottae*, *Tilapia louka*, *Tilapia margaritacea*, *Tilapia mariae* (ciclido del manglar negro), *Tilapia nyongana*, *Tilapia rendalli* (tilapia azul), *Tilapia rheophila*, *Tilapia ruweti* (tilapia del Okavango), *Tilapia snyderae*, *Tilapia sparrmanii* (tilapia rayada), *Tilapia spongotroktis*, *Tilapia tholloni*, *Tilapia thysi*, *Tilapia walteri*, *Tilapia zillii* (ciclido).

10 **Carpa**

Las carpas son distintas especies de peces de agua dulce de la familia Ciprinidae y el orden de los Cypriniformes, un grupo muy grande de peces nativos de Europa y Asia. Las especies de carpa incluyen inter alia, pero no se limitan a: *Hypophthalmichthys molitrix* (carpa plateada), *Cyprinus carpio* (carpa común), *Ctenopharyngodon idella* (carpa herbívora), *Hypophthalmichthys nobilis* (carpa de cabeza grande), *Carassius carassius* (carpín), *Cyprinus catla* (carpa Catla), *Cirrhinus cirrhosus* (carpa Mrigal), *Mylopharyngodon piceus* (carpa negra), *Cirrhinus molitorella* (carpa del barro) y *Labeo rohita* (Roho).

15

Definiciones

Aeromonas hydrophila

La *Aeromonas hydrophila* es una bacteria Gram negativa con forma de bastón de un tamaño de 0,3 a 1 micrómetro de ancho, y 1 a 3 micrómetros de longitud. La *Aeromonas hydrophila* se conoce generalmente como avirulenta o patógena secundaria en peces y se encuentra principalmente en áreas de clima cálido. Esta bacteria se puede encontrar en agua dulce o salobre y a menudo es resistente a los antibióticos más comunes. Se sabe que la *Aeromonas hydrophila* causa enfermedades en muchas especies de peces tales como tilapia (*Oreochromis niloticus*), pez gato (*Clariasbatrachus*, *Ictalurus punctatus*), pez dorado (*Crassius auratus*), carpa común (*Cyprinus carpio*), anguila (*Anguilla anguilla*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Santos y col 1988, Pridgeon y Klesius 2011, Esteve y col 1994).

20

25

Aislado

Cuando se utiliza en relación a las bacterias de la presente invención, el término “aislado” se refiere a las bacterias que se han separado de su ambiente natural, tal como las células y tejidos de su huésped en el estanque. En particular, el término “aislado” se refiere a un cultivo, tal como un cultivo puro de la bacteria derivada de una muestra de tejido de un huésped infectado.

30

Vacunas de combinación/vacunas polivalentes

Vacuna de combinación/vacuna polivalente se define como una vacuna que consiste en dos o más inmunógenos diferentes combinados en un único producto.

Mientras que las vacunas monovalentes se diseñan para inmunizar contra un único antígeno o un único microorganismo, las vacunas polivalentes de combinación son capaces de proporcionar inmunidad contra una pluralidad de diferentes enfermedades. En general, las vacunas monovalentes proporcionan una mayor inmunidad contra el antígeno relevante en comparación con una vacuna polivalente. Esto se puede explicar *inter alia* por el hecho de que en las vacunas polivalentes puede producirse una interferencia entre los diferentes biotipos cuando están generando una respuesta inmunitaria en los peces vacunados mientras que en la vacuna monovalente esto no ocurre.

35

Brotos clínicos

Un brote clínico se refiere a un término de estudio epidemiológico que se utiliza en epidemiología para describir una mayor incidencia de una enfermedad de la que se esperaría de otra manera en un momento y lugar en particular.

45 *Septicemia por Aeromonas móviles (enfermedad septicémica)*

La septicemia (también enfermedad septicémica) se refiere a la presencia de organismos patógenos en la corriente sanguínea que da lugar a sepsis.

La enfermedad septicémica producida por *Aeromonas hydrophila* o septicemia por *Aeromonas móviles* es una de las enfermedades más comunes en el cultivo de *Pangasius* en Vietnam. En el delta del Mekong, la septicemia por *Aeromonas móviles* puede producirse a lo largo del año, especialmente produce pérdidas significativas en el cambio de estación de lluvias a seca o por agentes estresantes tales como el manejo, transporte, alto nivel de nitritos, amoniaco, etc. Los signos clínicos de la septicemia por *Aeromonas móviles* son hemorragias causadas por una hemolisina de la bacteria.

50

Los signos externos que se observan en la mayoría de los peces afectados eran hinchazón de cabeza, exoftalmia, enrojecimiento de la superficie del pez, hemorragia del ano y las aletas. También se pueden observar a menudo lesiones ulcerativas de la piel en los peces infectados con necrosis de las aletas o la cola (podredumbre de las aletas).

5 Internamente puede haber un exceso de fluido transparente o teñido de rojo en la hidropesía clínica, pero en la mayoría de los casos la característica principal es la hiperemia visceral con un color rojo brillante. El bazo está visiblemente agrandado, redondeado y rojo cereza. El riñón agrandado ha sufrido necrosis licuefactiva y cuando se incide rezuma un fluido necrótico.

10 Los inventores han demostrado que la *Aeromonas hydrophila* es un agente patógeno muy altamente virulento para el pez *Pangasius*. En un experimento, las dosis de desafío en el intervalo de 100 a 2000 ufc del biotipo A/pez y dosis de desafío en el intervalo de 100 a 6000 ufc del biotipo B/pez producían de un 60 al 100 % de mortalidad de los peces en 2 días. Se observaban signos de enfermedad clínica de septicemia por *Aeromonas* móviles y se aislaron *Aeromonas hydrophila* de los peces muertos.

15 En el campo, los cambios repentinos de temperatura, o el manejo o la transferencia de los peces, puede dar lugar a pérdidas con la implicación de *Aeromonas hydrophila*. La septicemia por *Aeromonas* móviles podría producir pérdidas a lo largo del periodo de cultivo, los brotes pueden producirse una y otra vez en un estanque en particular. Durante el periodo del brote, los peces cultivados se pueden infectar con otros agentes patógenos dando como resultado grandes pérdidas para el piscicultor.

Biotipo

20 Las bacterias que se utilizan, por ejemplo, en la composición o la vacuna de la presente invención son cepas o aislados con características genóticas que están relacionadas o son similares a las de las cepas depositadas. "Relacionadas o similares" significa que si se lleva a cabo una tipificación genética de acuerdo con el ejemplo 2 en las cepas o aislados relacionados/similares genotípicamente, se encontrarían en el mismo grupo que las cepas depositadas, es decir, tiene al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y 2 (biotipo A) o con la SEQ ID NO: 25 3 y 4 (biotipo B).

Además, las bacterias que se utilizan, por ejemplo, en la composición o vacuna de la presente invención son cepas o aislados con características fenotípicas que están relacionadas o son similares a las de las cepas depositadas. "Relacionadas o similares" significa, por ejemplo, que la cepa similar/relacionada fenotípicamente reaccionará con un antisuero preparado contra las cepas depositadas.

30 *Una cantidad inmunogénica*

Una cantidad inmunogénica de células de *Aeromonas hydrophila* es la cantidad de antígeno necesaria para inducir una respuesta inmunitaria que es al menos capaz de reducir la gravedad de la enfermedad y/o la incidencia de la infección, en comparación con los peces no vacunados.

Identidad de secuencia

35 En el contexto de la presente invención, la expresión "identidad de secuencia" indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de nucleótidos. Si se comparan dos secuencias que no tienen la misma longitud, se deben alinear para dar el mejor ajuste posible, permitiendo la inserción de huecos o, de manera alternativa, el truncado de los extremos de las secuencias de nucleótidos. La identidad de secuencia puede

calcularse como $\frac{(N_{ref} - N_{dif})}{N_{ref}} \times 100$ en la que Ndif es el número total de restos no idénticos en las dos secuencias

40 cuando se alinean y en la que Nref es el número de restos en una de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia del 75 % con la secuencia AATCAATC (Ndif = 2 y Nref = 8). Se cuenta un hueco como no identidad de los restos específicos, es decir, la secuencia de ADN AGTGTC tendrá una identidad de secuencia del 75 % con la secuencia de ADN AGTCAGTC (Ndif = 2 y Nref = 8).

45 Con respecto a todas las realizaciones de la invención relativas a las secuencias de nucleótidos, el porcentaje de identidad de secuencia entre una o más secuencias también se puede basar en alineamientos utilizando el software clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/index.html>) con los ajustes por defecto. Para los alineamientos de secuencias de nucleótidos estos ajustes eran: Alineamiento = 3D completo, Hueco Abierto 10,00, Ext. Hueco 0,20, Distancia de Separación de huecos 4, matriz de peso de ADN: identidad (IUB). Para los alineamientos de secuencias de aminoácidos los ajustes eran los siguientes: Alineamiento = 3D completo, Hueco Abierto 10,00, Ext. Hueco 0,20, Distancia de Separación de huecos 4, matriz de peso de ADN: Gonnet.

50 De manera alternativa, las secuencias de nucleótidos se pueden analizar utilizando el programa DNASIS Max y la comparación de las secuencias se puede hacer en <http://www.paralign.org/>. Este servicio se basa en los dos algoritmos de comparación llamados Smith-Waterman (SW) y ParAlign. El primer algoritmo fue publicado por Smith y

Waterman (1981) y es un procedimiento bien establecido que encuentra el alineamiento local óptimo de dos secuencias. El otro algoritmo, ParAlign, es un procedimiento heurístico para el alineamiento de secuencias; los detalles del procedimiento están publicados en Rognes (2001). Se pueden utilizar los ajustes por defecto para la valoración de matriz y las penalizaciones de hueco así como los valores E.

5 *Características genotípicas*

La expresión “características genotípicas” se refiere ampliamente a la composición de una o más partes de los genes de un individuo o genoma, y siempre refleja la secuencia de ADN del individuo.

Características fenotípicas

10 La expresión “características fenotípicas” se refiere en la presente solicitud a una o más propiedades observables de un organismo que se producen por la interacción del genotipo heredado del individuo y/o la variación ambiental no hereditaria (por ejemplo, la variación en la transcripción, ADN móvil y plásmidos, reordenamiento genómico, etc.). En el contexto de la presente invención, la expresión “características fenotípicas relacionadas” incluye cualquiera de las siguientes características: tamaño, forma. Las “características fenotípicas” incluyen adicionalmente la capacidad para inducir cualquiera de los signos clínicos de *Aeromonas hydrophila* en peces, incluyendo los signos patológicos evidentes como se describen en la presente solicitud. “Características fenotípicas” incluye también la capacidad de la bacteria para presentar los mismos antígenos que las cepas depositadas, es decir que reaccione contra los sueros originados contra las cepas depositadas.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable

20 Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser agua o un tampón, o una emulsión tal como, por ejemplo, una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite.

Emulsiones de agua en aceite

25 Se hace referencia a las emulsiones que comprenden agua y aceite como emulsiones de agua en aceite, aceite en agua o emulsiones de agua en aceite en agua. El que una emulsión se convierta en una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua depende de la fracción de volumen de ambas fases y del tipo de emulsionante. En general, los emulsionantes estabilizan una emulsión.

Patología

30 La *Aeromonas hydrophila* es virulento para muchos organismos y, después de haber entrado en el cuerpo del huésped, viaja a través de la corriente sanguínea hasta el primer órgano disponible. La *Aeromonas hydrophila* está ampliamente considerada como un agente patógeno para los peces. Cuando se infecta con *Aeromonas hydrophila*., el pez puede desarrollar úlceras, podredumbre de la cola, y septicemia hemorrágica. La septicemia hemorrágica produce lesiones que dan lugar a desprendimiento de escamas, hemorragias en las agallas y área anal, úlceras, exoftalmia e hinchazón abdominal.

Filogenia

35 La filogenia se encarga de la relación evolutiva entre organismos. Esto se hace habitualmente analizando la secuencia de ADN (o la proteína traducida) de uno o varios genes conservados (habitualmente un gen constitutivo que evoluciona lentamente) en los organismos de interés. El gen tiene que estar presente en todos los organismos que se van a analizar. El gen más “famoso” aplicado para este fin es el gen 16S de ARNr, que está altamente conservado entre todas las bacterias. Sin embargo, debido a su alto nivel de conservación habitualmente no es adecuado para comparar diferentes cepas de la misma especie. En consecuencia se utilizan otros genes constitutivos conservados para diferenciar entre cepas bacterianas similares. También, combinando la evolución de varios genes constitutivos al mismo tiempo, la predicción filogenética se vuelve más robusta. La tipificación de secuencia multilocus (MLST), también conocida como análisis de secuencia multilocus (MLSA), lo hace combinando la información de secuencia de por ejemplo, 5 a 9 genes. Las relaciones filogenéticas habitualmente están representadas como arboles filogenéticos generados por complejos algoritmos que utilizan la secuencia de ADN de los organismos como entrada.

Tipificación de secuencia multilocus (MLST)

50 La MLST es una técnica en biología molecular para la tipificación de múltiples loci. El procedimiento es capaz de caracterizar aislados de especies microbianas utilizando las secuencias de ADN de fragmentos interinos de múltiples genes constitutivos, es decir, genes constitutivos que se transcriben a un nivel relativamente constante. La caracterización se basa en las diferencias en las secuencias de estos genes constitutivos.

Ensayos de aglutinación en portaobjetos

La aglutinación es la coagulación en suspensión de por ejemplo, microorganismos que albergan antígenos en presencia de los anticuerpos específicos.

Un ensayo de aglutinación en portaobjetos es un ensayo en el que se mezcla una cierta cantidad de antígeno concentrado, y por ejemplo suero de peces, en un portaobjetos y se permite que reaccione durante un periodo especificado, después de lo cual se determina la presencia de aglutinación.

Porcentaje de supervivencia relativo (RPS)

5 El RPS expresa el porcentaje de peces, que morirían por una enfermedad determinada si no se protegen contra ella, es decir, la proporción de peces que se salvan por la vacunación. Una vacunación satisfactoria, económicamente aceptable debería superar un valor de RPS del 60 %, lo que significa que en caso de un brote de la enfermedad los peces no vacunados contra la enfermedad en particular sufrirían al menos una pérdida de tres veces la de los vacunados.

10 **RPS = [1-(% de peces muertos en el grupo vacunado / % de peces muertos en el grupo de control)] * 100**

Se debería señalar que las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplican a los otros aspectos de la invención.

La invención se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Aislamiento de *Aeromonas hydrophila* a partir de *Pangasius*

15 La *Aeromonas hydrophila* produce una enfermedad en *Pangasius* llamada enfermedad septicémica o septicemia por *Aeromonas* móviles. Esta es una de las enfermedades más comunes en el cultivo de *Pangasius vietnamita*. En el río Mekong, los brotes de septicemia por *Aeromonas* móviles son más comunes cuando cambia la estación de lluvias a la seca, y/o cuando los peces se estresan, por ejemplo, por el manejo, transporte, alto nivel de nitritos o amoníaco u otros tipos de estrés medioambiental.

20 Los signos clínicos de septicemia por *Aeromonas* móviles son hemorragias causadas por la hemolisina. Los signos externos habitualmente observados en los peces afectados son hinchazón de la cabeza, exoftalmia, enrojecimiento de la superficie del pez y hemorragias del ano y las aletas. También se pueden observar a menudo lesiones ulcerativas de la piel en los peces infectados con necrosis de las aletas o la cola (podredumbre de las aletas).

25 Internamente puede haber un exceso de fluido transparente o teñido de rojo en la hidropesía clínica, pero en la mayoría de los casos la característica principal es la hiperemia de las vísceras que resulta en un color rojo brillante. El bazo está visiblemente agrandado, redondeado, y rojo cereza. El riñón agrandado ha sufrido una necrosis licuefactiva y cuando se incide rezuma un fluido necrótico.

30 Para aislar *Aeromonas hydrophila*, se inserta un asa de bacteriología estéril en el riñón o el bazo del pez y se difunde directamente en placas de agar soja tríptica. La *Aeromonas hydrophila* aparece como colonias redondas de color blanco cremoso. La *Aeromonas hydrophila* es una bacteria Gram negativa con forma de bastón de un tamaño de 0,3 a 1 micrómetro de ancho, y 1 a 3 micrómetros de longitud.

Ejemplo 2: Filogenia de *Aeromonas hydrophila*

35 Para clasificar los aislados de *Aeromonas hydrophila* obtenidas por el procedimiento descrito en el ejemplo 1, se utilizó un esquema MLST simplificado que se basaba en Martino y col., 2011, empleando la información genética de los genes de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) y Citrato sintasa I (gltA) para las predicciones filogenéticas.

40 Se llevó a cabo una PCR utilizando los cebadores descritos en Martino y col., 2011. Las secuencias se ensamblaron, se comprobó la calidad y se recortaron utilizando el software Vector NTI®. Las secuencias de referencia externas se recuperaron de <http://pubmlst.org/aeromonas>, incluyendo todas las cepas de *Aeromonas hydrophila* de Martino y col., 2011, y algunas especies adicionales de *Aeromonas* con fines de referencia (véase la tabla posterior para la información completa de las cepas). Se llevaron a cabo los alineamientos de secuencia y las predicciones filogenéticas en MEGA5, como se describe en Tamura y col., 2011, con los siguientes parámetros:

- Procedimiento estadístico: Máxima probabilidad (100 Replicaciones ontológicas)
- Modelo de sustitución: modelo Tamura-Nei
- Tasas: Gamma distribuida con sitios Invariantes (16 categorías gamma diferentes)

45 Al analizar las secuencias de ADN para metG y gltA, los inventores han definido dos grupos filogenéticos distintos y separado para las cepas analizadas. Por simplicidad los dos grupos se marcaron como A y B en la figura 1. Las cepas de estos dos grupos eran idénticas cuando se comparaban internamente, sin embargo cuando se comparaban con las cepas del otro grupo presentaban un 97,4 % de identidad de secuencia de ADN para gltA, un 96,2 % de identidad de secuencia de ADN para metG y un 96,8 % de identidad de secuencia de ADN cuando se combinaban (gltA + metG).

50

	Cepa	Tipo de secuencia *	Fuente
Cepas de PHARMAQ	AL 2 085	-	Pangasius, Vietnam
	AL 20 111	-	Peces, Costa Rica
	AL 20 133	-	Pangasius, Vietnam
	AL 20 134	-	Pangasius, Vietnam
	AL 20 136	-	Pangasius, Vietnam
	AL 20 176	-	Tilapia, Malasia
	AL 20 212	-	Pangasius, Vietnam
	AL 20 213	-	Pangasius, Vietnam
	AL 20 215	-	Pangasius, Vietnam
	AL 20 236	-	Peces, Brasil
	AL 20 249	-	Pangasius, Vietnam
Cepa tipo/referencia**	<i>Aeromonas hydrophila</i> , ATCC 7966	ST1	Leche, RU
	<i>Aeromonas hydrophila</i> , CECT 398	ST11	Heces humanas de un niño con diarrea, EE. UU.
	<i>A. trota</i> o <i>A. enteropelogenes</i> , CECT 4255	ST16	Heces humanas, India
	<i>A. veronii</i> bv. <i>Veronii</i> , CECT 4257	ST17	Espito de una víctima de ahogamiento, EE. UU.
	<i>A. sobria</i> , CECT 4245	ST19	Peces, Francia
	<i>A. salmonicida</i> subesp. <i>salmonicida</i> , NCIMB 1102	ST2	Salmon atlántico, RU
	<i>Aeromonas hydrophila</i> , Ae 9	ST28	Cangrejo de río / hemolinfa, Italia
	<i>A. caviae</i> , NCIMB 882	ST3	Pez dorado, Argentina
	<i>A. bestiarum</i> / <i>Aeromonas hydrophila</i> , NCIMB 1134	ST4	Trucha arcoiris, RU
	<i>A. sobria</i> , NCIMB 75	ST5	Peces de agua dulce enfermos, Alemania
	<i>Aeromonas hydrophila</i> , Ae 61	ST74	Mújol gris de cabeza plana, Italia
	<i>Aeromonas hydrophila</i> , Ae 62	ST75	Dorada, Italia
	<i>A. bestiarum</i> , DSM 13956	ST8	Peces infectados, Francia

Tabla 1: Información de las 24 cepas incluidas en la comparación filogenética que se muestra anteriormente, consisten en 11 cepas originarias de PHARMAQ y 13 cepas de referencia. * se define como la base de datos de secuencia MSLT basada en internet (<http://pubmlst.org/Aeromonas>). ** tabla modificada de la de Martino y col., 2011.

Ejemplo 3a Virulencia de diferentes cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas de los peces

Las *Aeromonas hydrophila* de biotipo A (AL20258) biotipo B (AL20212) y PQ110155 (ni biotipo A ni B) se aislaron como se describe en el ejemplo 1, y se propagaron en TSB durante 24 horas. Se mantuvieron los peces (*Pangasianodon hypophthalmus*) de 18 g de peso, en agua limpia a 28 °C, se inyectaron con 0,1 ml de dos concentraciones diferentes de la suspensión bacteriana (menos de 500 ufc/pez). Se observó la mortalidad continuamente después del desafío. Las *Aeromonas hydrophila* de biotipo A y B inducían una rápida mortalidad, mientras que la PQ110155 era avirulenta. Con la dosis de desafío utilizada, los peces inyectados con el biotipo A alcanzaban la mortalidad más alta en comparación con el biotipo B. Todos los peces muertos presentaban síntomas de septicemia por *Aeromonas*.

Este experimento demuestra que la *Aeromonas hydrophila* de biotipo A y B son virulentos para el *Pangasius* y puede ser un agente patógeno primario para *Pangasius*.

Ejemplo 3b Virulencia de diferentes cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas de los peces

Se mantuvieron los *Pangasius* de aproximadamente 12,5 en agua limpia a 27 °C. Se utilizaron diferentes aislados de *Aeromonas hydrophila* de biotipo A y B para desafiar grupos paralelos de 20 peces en depósitos separados por inyección intraperitoneal. Las mortalidades se contaron diariamente y se calculó la mortalidad acumulada. Los peces de todos los depósitos presentaban signos clínicos de septicemia por *Aeromonas* móviles. Utilizando dosis de ≤ 6000 bacterias/pez, todas las cepas inducían una alta mortalidad rápidamente en los peces.

Este experimento demuestra que las cepas de *Aeromonas hydrophila* de ambos biotipos A y B son virulentos y producen mortalidad en *Pangasius*. Algunas cepas dan una mortalidad con dosis de desafío ≤ 1000 bacterias/pe, mientras que otras dan una alta mortalidad con dosis de desafío ligeramente más altas. La *Aeromonas hydrophila* puede ser un agente patógeno primario para *Pangasius*.

Tabla 3: Diferentes cepas de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A o B que se utilizaron para el desafío de *Pangasius* de aproximadamente 12, 5 gramos. Se calculó el % de mortalidad acumulada en cada depósito

Cepa de desafío	Biotipo	Dosis de desafío (ufc)	% mortalidad Depósito 1	% mortalidad Depósito 2
VH18	A	733	95	95
AL 20258	A	489	90	95
AL 20257	A	500	100	100
AL 20212	B	5972	100	90
AL 20215	B	1220	75	80
AL 20 213	A	600	90	100

Ejemplo 4: Serología de aislados de *Aeromonas hydrophila* de *Pangasius*

Se dividieron 200 peces *Pangasius* (*Pangasianodon hypophthalmus*), con un peso medio de 30 gramos, en 2 grupos y se vacunaron con una vacuna monovalente de *Aeromonas hydrophila*, basándose en la cepa AL20136 = biotipo A o basado en la cepa AL 20212 = biotipo B.

Las vacunas se formularon como vacunas en una emulsión de agua en aceite, y se inyectó a cada pez con 0,1 ml de vacuna por vía intraperitoneal. Se recolectaron muestras de sangre de los peces vacunados con las vacunas respectivas a las 4 semanas después de la vacunación. La sangre se mantuvo fresca (18-20 °C) y se dejó coagular, entonces se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos recolectando después el suero. Los sueros se utilizaron en los ensayos de aglutinación en portaobjetos y ensayos de aglutinación directos en placas de 96 pocillos.

Preparación de las bacterias utilizadas en los ensayos:

Las bacterias que se habían aislado de *Pangasius* como se describe en el ejemplo 1. Se recuperaron en TSA (Agar soja triptina) a partir de reservas congeladas y se incubaron a 28 °C durante 12 horas. Tras la incubación en el TSA se transfirieron las colonias únicas a TSB (Caldo de soja trípica) incubándose entonces a 28 °C durante 12 horas.

Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos, se retiró el medio y las bacterias se lavaron una vez y se re-suspendieron en solución salina estéril. La suspensión bacteriana se inactivó con un 1 % de formalina y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Ensayos de aglutinación – ensayo en placa de 96 pocillos:

Se utilizó un ensayo de aglutinación directa para examinar la reacción cruzada entre los sueros recolectados de dos grupos de peces vacunados diferentes y 24 cepas diferentes de *Aeromonas hydrophila* recolectadas de Pangasius.

5 El suero se diluyó dos veces en la placa, y un volumen igual de bacterias preparadas como se ha descrito se añadió en cada pocillo. Se incluyeron controles positivos y negativos. Las placas se dejaron a 4 °C y los resultados se registraron después de 8 horas y 24 horas. Un resultado positivo es cuando las bacterias se agregan para formar estructuras fácilmente observables a simple vista. Un resultado negativo es cuando la solución se mantiene turbia y no forma agregados. El número de pocillos con la dilución más alta de suero donde se observa la aglutinación se registra como el resultado. La dilución correspondiente del antisuero es la siguiente:

10 **Tabla 4:** dilución del antisuero en los pocillos respectivos

Pocillo	Dilución de antisuero
1	Sin diluir
2	1:2
3	1:4
4	1:8
5	1:16
6	1:32
7	1:64
8	1:128
9	1:256
10	1:512
11	1:1024
12	1:2048

Ensayo de aglutinación en portaobjetos:

15 Se utilizó el siguiente procedimiento. Se puso una gota de solución salina estéril en un portaobjetos limpio. Una única colonia de la placa TSA se recogió y se mezcló con el agua. Se añadió una gota de suero del pez, y el resultado se registró después de 30 segundos. Un resultado positivo es cuando la bacteria se agrega para formar estructuras fácilmente observables a simple vista. Un resultado negativo es cuando la solución se mantiene turbia y no forma agregados.

20 Los Pangasius se vacunaron con vacunas en agua en aceite que contenían el antígeno de *Aeromonas hydrophila* biotipo A o B. las muestras de sangre se tomaron de los peces vacunados cuatro semanas después de la vacunación. Cuando los peces estaban vacunados, respondían a la vacuna y producían anticuerpos específicos contra el antígeno de la vacuna. La capacidad del suero de los peces para aglutinar bacterias de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A o el tipo B aclara como son los biotipos de similares. Si los biotipos son similares, el suero los aglutinará al mismo nivel.

25 Los resultados muestran que el suero de los peces vacunados con el biotipo A aglutinan cepas del biotipo A mucho mejor que a cepas del biotipo B y viceversa. Esto confirma que el biotipo A y el biotipo B representan dos biotipos diferentes de *Aeromonas hydrophila*. Cuando se genera un antisuero contra un biotipo, el antisuero no reacciona igual de bien con el otro biotipo y viceversa.

4 semanas después de la vacunación

	Vacuna	AL 20136/ biotipo A	
	Cepas ensayadas de <i>Aeromonas hydrophila</i>	AL 20136 (biotipo A)	AL 20212 (biotipo B)
Peces individuales	1	0	0
	2	5	0
	3	8	2
	4	6	4
	5	0	0
	6	9	0
	7	6	0
	8	8	5
	9	5	0
	10	7	0
	Media	5,4	1,1

Tabla 5a: Resultados del ensayo de aglutinación en placas de 96 pocillos. Suero de los peces vacunados con el biotipo A. Se ensayó el suero de 10 peces. El pocillo con la mayor dilución de suero que presentaba aglutinación se registra como el resultado del ensayo.

		4 semanas después de la vacunación	
	Vacuna	AL 20212/ biotipo B	
	Cepas ensayadas de <i>Aeromonas hydrophila</i>	AL 20136 (biotipo A)	AL 20212 (biotipo B)
Peces individuales	1	3	6
	2	0	8
	3	0	6
	4	0	0
	5	0	5
	6	2	0
	7	5	8
	8	0	8
	9	0	2
	10	3	5
	Media	1,3	4,8

5 **Tabla 5b:** Resultados del ensayo de aglutinación en placas de 96 pocillos. Suero de los peces vacunados con el biotipo B. Se ensayó el suero de 10 peces. El pocillo con la mayor dilución de suero que presentaba aglutinación se registra como el resultado del ensayo.

Aeromonas hydrophila

Varias de otras cepas aisladas de Pangasius se ensayaron entonces por su capacidad para aglutinar el suero de los peces vacunados con vacunas del biotipo A o el biotipo B. Esto se hizo con el ensayo de aglutinación en portaobjetos.

5 Resultados del ensayo de aglutinación en portaobjetos:

Tabla 6: Diferentes cepas de *Aeromonas* aisladas de Pangasius se ensayaron por el ensayo de aglutinación directa como se describe. + = aglutinación observada. - = aglutinación no observada

No	ID	Anti biotipo A	Anti biotipo B	Serogrupo
1	PQ110255	+	-	A
2	AL 20136	+	-	A
3	AL 20215	-	+	B
4	AL 20262	+	-	A
5	AL 20255	+	-	A
6	PQ110466	+	-	A
7	AL 20257	+	-	A
8	PQ110098	+	-	A
9	PQ110458	+	-	A
10	PQ110445	+	-	A
11	AL 20258	+	-	A
12	PQ120160	+	-	A
13	AL 20212	-	+	B
14	PQ110367	+	-	A
15	PQ110488	+	-	A
16	PQ110440	+	-	A
17	AVH74	+	-	A
18	PQ110501	-	-	NINGUNO
19	PQ110503	+	-	A
20	PQ110345	+	-	A
21	AL 20263	+	-	A
22	PQ120604	+	-	A
23	PQ110490	+	-	A
24	PQ110228	+	-	A

10 Los resultados demuestran que la mayoría de las cepas aisladas de los brotes clínicos en Vietnam de *Aeromonas* en Pangasius pertenecen al biotipo A o B.

Ejemplo 5: Protección cruzada entre el biotipo A y el biotipo B de *Aeromonas hydrophila*

15 Se fabricaron vacunas (bacterias inactivadas en solución acuosa o emulsiones de agua en aceite) con diferentes aislados de *Aeromonas hydrophila* que pertenecían al biotipo A o B y los Pangasius se inmunizaron por inyección intraperitoneal de 0,05 ml de dichas vacunas. La concentración de antígeno era de $\geq 10^7$ bacterias/ml. El Pangasius se mantuvo en condiciones convencionales en agua dulce a 28 ± 2 °C. En 2 a 20 semanas después de la vacunación los peces se desafiaron mediante la inyección de 1000-10000 ufc de *Aeromonas hydrophila* en la cavidad intraperitoneal. Se contaron los peces muertos diariamente, y se continuó con el desafío hasta que no se producía mortalidad en ningún grupo durante dos días. Se calculó el % de supervivencia relativa (RPS) utilizando la fórmula:

$$RPS = [1 - (\% \text{ de peces muertos en el grupo vacunado} / \% \text{ de peces muertos en el grupo de control})] * 100$$

Cuando RPS ≥ 60, los peces se consideraban protegidos por la vacuna.

+ = protección. - = no protección

		Cepas vacunales					
		Cepas de desafío	AL20136 Biotipo A	AL20212 Biotipo B	AL20215 Biotipo B	AL20136 Biotipo A AL20212 Biotipo B	AL20212 Biotipo B AL20215 Biotipo B
Cepas de desafío de <i>Aeromonas hydrophila</i>	Biotipo A	AL 20136	+	-	-	+	-
	Biotipo A	AL 20255	+	-	-	+	-
	Biotipo A	AL 20258	+	-	-	+	-
	Biotipo A	AL 20253	+	-	-	+	-
	Biotipo A	AL 20250	+	-	-	+	-
	Biotipo A	AL 20262	+	-	-	+	-
	Biotipo A	AL 20257	+	-	-	+	-
	Biotipo A	AL 20258	+	-	-	+	-
	Biotipo B	AL 20215	-	+	+	+	+
	Biotipo B	AL 20212	-	+	+	+	+

5 **Tabla 7:** Pangasius inmunizados con vacunas que contienen antígeno del biotipo A, B o ambos se desafiaron con diferentes cepas de biotipos A o B. “+” indica que los peces estaban protegidos por la vacuna. “-” indica que los peces no estaban protegidos por la vacuna.

10 Los resultados demuestran que las vacunas con antígeno del biotipo A protege contra el desafío con *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al biotipo A, pero no contra el desafío con *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al biotipo B. Las vacunas con antígeno del biotipo B protege contra el desafío con *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al biotipo B, pero no contra el desafío con *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al biotipo A.

Si la vacuna contiene antígenos de ambos biotipos de *Aeromonas hydrophila*, la vacuna protege contra el desafío con aislados de *Aeromonas hydrophila* de ambos biotipos A y B.

Ejemplo 6. Vacuna de combinación contra *Aeromonas hydrophila*

15 Se produjeron vacunas (emulsiones de agua en aceite) con aislados de *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al biotipo A o B y *Edwardsiella ictaluri* de acuerdo con los procedimientos convencionales y se inmunizaron Pangasius mediante inyección intraperitoneal de 0,05 ml. La concentración de antígeno de *Aeromonas hydrophila* era ≥ 10⁷ bacterias/ml y la concentración de antígeno de *E. ictaluri* era ≥ 10⁹ bacterias/ml. Los Pangasius se mantuvieron en condiciones convencionales en agua dulce a 28 °C ± 2 °C. A las 2 y 17 semanas después de la vacunación los peces se desafiaron mediante la inyección de 1000-6000 ufc de *Aeromonas hydrophila* biotipo A o biotipo B o ≥ 10⁴ de *E. ictaluri* en la cavidad peritoneal. Las cepas de *Aeromonas hydrophila* biotipo A y B y *E. ictaluri* se utilizaron para el desafío. Se contaron los peces muertos diariamente, y el desafío se continuó hasta que no se producía mortalidad en ningún grupo durante dos días.

El % de supervivencia relativa (RPS) se calculó utilizando la fórmula

$$RPS = [1 - (\% \text{ de peces muertos en el grupo vacunado} / \% \text{ de peces muertos en el grupo de control})] * 100$$

Cuando RPS ≥ 60, los peces se consideraban protegidos por la vacuna.

Los resultados de mostraban que las vacunas con antígenos combinados de *Aeromonas hydrophila* biotipo A y B, así como *Edwardsiella ictaluri* protege contra el desafío con *Aeromonas hydrophila* que pertenecen al biotipo A y biotipo B y *Edwardsiella ictaluri*.

Tabla 8. Los peces se vacunaron con una vacuna que contenía antígenos de *Aeromonas hydrophila* del biotipo A y B así como *Edwardsiella ictaluri*. El efecto protector de la vacuna se midió a las 2 y 17 semanas después de la vacunación por el desafío con *Aeromonas hydrophila* biotipo A, *Aeromonas hydrophila* biotipo B o *Edwardsiella ictaluri*. Las vacunas que daban un porcentaje de supervivencia relativa (RPS) ≥ 60 se consideraban protectoras. (+ = vacuna protectora, porcentaje de supervivencia relativa (RPS) ≥ 60).

	Cepas de desafío					
	<i>A. hydrophila</i> Biotipo A		<i>A. hydrophila</i> Biotipo B		<i>E. ictaluri</i>	
Tiempo de desafío (semanas post vacunación, spv)	2 spv	17 spv	2 spv	17 spv	2 spv	17 spv
Antígenos vacunales <i>A. hydrophila</i> Biotipo A, <i>A. hydrophila</i> Biotipo B <i>E. ictaluri</i>	+	+	Nd	+	+	+

Ejemplo 7: Vacunación con *Aeromonas hydrophila* y desafío en tilapia (*Oreochromis niloticus*)

La eficacia de una vacuna que contiene *Aeromonas hydrophila* del biotipo A, *Aeromonas hydrophila* del biotipo B y *Edwardsiella ictaluri* en tilapia (*Oreochromis niloticus*) se ensayaron en un ensayo de laboratorio controlado en el que los peces vacunados y no vacunados (control) se sometían a un desafío experimental. Se vacunaron 120 tilapias con 0,05 ml de una vacuna multivalente (emulsión de agua en aceite) que contenía *Aeromonas hydrophila* biotipo A, *Aeromonas hydrophila* biotipo B y *Edwardsiella ictaluri*. La concentración de antígeno era de ≥ 10⁷ bacterias/ml. Los peces vacunados y de control (120 tilapias) se marcaron y se mantuvieron juntos en el mismo depósito a 28 °C.

3 semanas después de la vacunación, 30 peces del grupo vacunado y 30 peces del grupo no vacunado de control se transfirieron a los depósitos de desafío y se desafiaron con *A. hydrophila* de biotipo A en depósitos replicados utilizando dos dosis de desafío diferentes (depósitos 1-4). Los peces muertos se contaron diariamente, y el desafío se continuó hasta que no se producía mortalidad en ningún grupo durante dos días. El % de supervivencia relativa (RPS) se calculó utilizando la fórmula:

$$RPS = [1 - (\% \text{ de peces muertos en el grupo vacunado} / \% \text{ de peces muertos en el grupo de control})] * 100$$

Procedimiento de desafío	Inyección							
	7,4x10e5 ufc/pez				1,48x10e6 ufc/pez			
Depósitos ID	Depósito 1		Depósito 2		Depósito 3		Depósito 4	
Grupo	Vacuna	Control	Vacuna	Control	Vacuna	Control	Vacuna	Control
Marca	UM	PVR	UM	PVR	UM	PVR	UM	PVR
Cepa de desafío	A. h F2O3(AL 20136)							
Total peces muertos	1	12	1	14	1	22	0	21
Total peces vivos	29	18	29	16	29	8	30	9
Nº total de peces	30	30	30	30	30	30	30	30
% Mortalidad Total	3,33	40	3,33	46,67	3,33	73,3	0	70
RPS final	91,67		92,85		95,45		100	

Conclusión: La *Aeromonas hydrophila* biotipo A era virulenta en tilapia. Una vacuna multivalente que contenía *Aeromonas hydrophila* biotipo A daba lugar a protección contra el desafío con *Aeromonas hydrophila* biotipo A.

Ejemplo 8. Vacunación y desafío con *Aeromonas hydrophila* en diferentes especies de peces

5 Las vacunas que contienen el antígeno de *Aeromonas hydrophila* se fabricaron, y se llevó a cabo la vacunación de los peces por inyección intraperitoneal. Las especies de peces que se utilizaron eran carpas representadas por la carpa común (*Cyprinus carpio*) y rohu (*Labeo rohita*), tilapias representadas por *Oreochromis niloticus* y barramundi (*Latex calcarifer*). 2-4 semanas después de la vacunación, los peces se desafiaron con al menos una cepa virulenta de *Aeromonas hydrophila*, y se comparó la mortalidad en un grupo de control no acunado con la mortalidad en los peces vacunados. Se calculó el porcentaje de supervivencia relativa, y las vacunas con un RPS \geq 60 se consideraron eficaces.

Recibo de los depósitos de microorganismos

Las siguientes cepas se han depositado bajo el "Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimientos de Patente de 28 de abril de 1977".

15 El 29 de agosto de 2012 se depositaron las siguientes cepas bacterianas por los inventores en la institución depositaria "Agencia de Colecciones de Cultivos de Protección de la Salud, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, RU" bajo los números de acceso siguientes:

Aeromonas hydrophila, biotipo A (AL 20133) depositado bajo el número de acceso 12082901

Aeromonas hydrophila, biotipo B (AL 20215) depositado bajo el número de acceso 12082902

Referencias

- 20 (i) Martino ME, Fasolato L, Montemurro F, Rosteghin M, Manfrin A, Patarnello T, Novelli E, Cardazzo B. Appl Environ Microbiol. 2011 Jul; 77(14):4986-5000. E pub 2011 Jun 3.
 (ii) Janda JM, Abbott SL. Clin Microbiol Rev. 2010 Jan; 23(1):35-73. Review.
 (iii) <http://pubmlst.org/Aeromonas>,
 (iv) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. Mol Biol Evol. 2011 Oct; 28(10):2731-9. Epub 2011 May 4.
 25 (v) Jan Raa (1996), Reviews in Fisheries Science 4(3): 229-228.
 (vi) JC Aguilar y EG Rodriguez, 2007, Vaccine 25, 3752 – 3762
 (vii) Santos Y, Toranzo AE, Barja JL, Nieto TP, Villa TG. Infect Immun. 1988 Dec; 56(12):3285-93. Pridgeon JW, Klesius PH. Dis Aquat Organ. 2011 Jul 12; 95(3):209-15
 30 (viii) Esteve C, Amaro C, Toranzo AE. FEMS Microbiol Lett. 1994 Mar 15; 117(1):85-90
 (ix) Zheng W, Cao H y Yang X (2012) African Journal of Microbiology Research, Vol 6 (21) pp 4512-4520
 (x) Pridgeon JW, Klesius PH, Mu X, Carter D, Fleming K, Xu D, Srivastava K, Reddy G (2011) Veterinary microbiology 152 (117-125)
 (xi) Chandran M. R. y col (2002) Fish and Shell Fish Immunology 13(1): p1-9
 35 (Xii) Crumlish M. y col. (2010) J. Fish Dis. 33(9): p717-722
 (xiii) Pridgeon J. W. y col (Vaccine 2011) Vaccine 29(45): p7896-7984

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1. Secuencias de ADN de los genes que codifican gItA en el biotipo A (AL20133)

>20133_gItA

40

ES 2 655 679 T3

5
10
15
20
25
30

TTCCTGCACATGATGTTTGGCGTGCCGACCGAAGAGTACA
AGGTCAACCCCATCGTCTGAACGCGCCATGGACCGCATCTT
CACCTGCATGCGGATCACGAGCAGAACGCCTCCACCTCC
ACCGTGCCTCTGGCCGGCTCGTCCGGTGCCAACCCGTTCCG
CCTGTATCGCCGCGGGGATCGCCTCCCTGTGGGGACCGGC
CCACGGCGGTGCCAACGAAGCCTGCCTCAAGATGCTCGAG
GAGATCGGCTCCGTGGATCGCATCCCCGAGTACATCGCCA
AGGCCAAGGACAAGAACGATCCGTTCCGTCTGATGGGCTT
CGGTCACCGGGTCTACAAGAACCACGACCCCCGTGCCACC
GTGATGCGCGAAACCTGTCACGAGGTAAGTACCGAGCTGC
AGATCAAGGATCCGCTGCTGGACGTGGCCATGGAGCTGGA
GCGCATCGCGCTGTCCGACCCCTACTTCATCGAGAAGAAG
CTCTACCCGAACGTG

SEQ ID NO: 2. Secuencias de ADN de los genes que codifican metG en el biotipo A (AL20133)

15
20
25
30

>20133_metG
GCCGATATCTGGGTTTCGTTATCAGCGAATGCGCGGTCACC
AGGTGCACTTTGTCTGTGCCGACGATGCCCATGGCACCCC
GATCATGCTCAAGGCCAACAGCTGGGGATCACCCCGGAA
GAGATGATCGCGGCAGTCTCCAGGAGCACCAGGCCGACT
TCGCCGGGTTCAACATCAGTTTTGACAACTATCACTCCAC
CCACAGCGACGAGAACCGTGAGCTGGCCGGGCTTATCTAC
GGCCGTCTGCAGGCCGGCGCAAGATCAAAGCCGCACCA
TCTCCAGCTGTTTCGATCCGGAAAAATCCATGTTCTGCC
GGATCGTTTCGTCAAGGGCACCTGCCCAAGTGCAAGTCC
CCGGAGCAGTATGGCGACAACTGCGACAGCTGCGGGCGTA
CCTACAGCCCAGCCGAAGTATCGATCCGAAATCCGCCGT
CTCCGGCGCTACCCCGGTGATGAAGGACTCCGAGCACTTC
TTCTTCGACCTGCCGCAGTTTGAG

SEQ ID NO: 3. Secuencias de ADN de los genes que codifican gltA en el biotipo B (AL20215)

30 >20215_gltA

TTCTGCACATGATGTTTGGCGTGCCGACCGAGGAGTACA
 AGGTCAACCCCATCGTCTGAACGCGCCATGGACCGCATCTT
 TACCCTGCATGCGGACCACGAGCAGAACGCCTCCACCTCC
 ACCGTGCGTCTGGCCGGCTCCTCCGGCGCCAACCCGTTTG
 5 CCTGTATCGCCGCGGGGATCGCCTCCCTGTGGGGACCGGC
 CCACGGTGGTGCCAACGAAGCCTGCCTCAAGATGCTCGAG
 GAGATCGGCTCCGTTGACCGCATTCCCGAATACATCGCCA
 AGGCCAAGGACAAGAACGATCCATTCCGTCTGATGGGCTT
 CGGTCACCGGGTCTACAAGAACCACGACCCCCGTGCCACC
 10 GTGATGCGCGAAACCTGTCACGAGGTAAGTACCGAGCTGC
 AGATCAAGGATCCGCTGCTGGACGTGGCCATGGAGCTGGA
 GCGCATCGCGCTCTCCGACCCCTACTTCATCGAGAAGAAG
 CTCTACCCGAACGTG

SEQ ID NO: 4. Secuencias de ADN de los genes que codifican metG en el biotipo B (AL20215)

15 >20215_metG
 GCCGATATCTGGGTTTCGTTATCAGCGAATGCGCGGTCACC
 AGGTGCACTTTGTCTGTGCCGACGATGCCACGGCACCCCC
 GATAATGCTCAAGGCCCAACAGCTGGGGATCACCCCGGAA
 GAGATGATCGCGGCCGTCTCCAAGGAACACCAGGCCGACT
 20 TCGCCGGGTTCAACATCAGTTTTGACAACTATCACTCCAC
 CCACAGCGACGAGAACC GCGAGCTGGCGGAGCTGATCTAC
 GGCCGTCTGCAGGCCGGCGGCAAGATCAAGAGCCGCACCA
 TCTCCAGCTGTTTCGATCCGGAAAAGTCCATGTTCTGCC
 GGATCGCTTCGTC AAGGGTACCTGCCCAAGTGCAAGTCC
 25 CCGGAGCAGTATGGCGACA ACTGTGACAGCTGCGGCGCCA
 CCTACAGCCCCGACCGAGCTGATTGATCCGAAATCCGCCGT
 CTCCGGCGCCACCCCGGTGATGAAGGACTCCGAGCACTTC
 TTCTTCGATCTGCCGCAGTTTGAA

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> PHARMAQ AS
 Tung, Vo Than
 Phuong, Tran Dyu
 Phouong, Li Thi Kim
 35 Nguyen, Phuc
 Nygaard, Anja
 Hungerholdt, Liv Blom
 Klevan, Leif Are
 40 <120> Composición inmunogénica contra Aeromonas hydrophila
 <130> 49902dk02

ES 2 655 679 T3

<150> VN1-2012-03153
 <151> 24-10-2012

 5 <150> DKPA 2013 70328
 <151> 06-18-06-2013

 <160> 4

 10 <170> BiSSAP 1.2

 <210> 1
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> Aeromonas hydrophila

 15 <220>
 <221 > fuente
 <222> 1..495
 <223> /tipo_mol="ADN genómico" /organismo= "Aeromonas hydrophila"
 20 <400> 1

 ttctgtcaca tgatgtttgg cgtgccgacc gaagagtaca aggtcaacct catcgtcgaa 60
 cgcgccatgg accgcatctt caccctgcat gcggatcacg agcagaacgc ctccacctcc 120
 accgtgcgtc tggccggctc gtccgggtgcc aaccggttcg cctgtatcgc cgcgggggatc 180
 gcctccctgt ggggaccggc ccacggcggt gccaacgaag cctgcctcaa gatgctcgag 240
 gagatcggct ccgtggatcg catccccgag tacatcgcca aggccaagga caagaacgat 300
 ccgttccgtc tgatgggctt cggtcaccgg gtctacaaga accacgacct ccgtgccacc 360
 gtgatgcgcg aaacctgtca cgagggtactg accgagctgc agatcaagga tccgctgctg 420
 gacgtggcca tggagctgga gcgcatcgcg ctgtccgacc cctacttcat cgagaagaag 480
 ctctaccoga acgtg 495

 25 <210> 2
 <211> 504
 <212> ADN
 <213> Aeromonas hydrophila

 30 <220>
 <221 > fuente
 <222> 1..504
 <223> /tipo_mol="ADN genómico" /organismo= "Aeromonas hydrophila"

 35 <400> 2

ES 2 655 679 T3

```

gocgatatct gggttcgtta tcagcgaatg cgcggtcacc aggtgcactt tgtctgtgcc      60
gacgatgccc atggcacccc gatcatgctc aaggcccaac agctggggat caccocggaa      120
gagatgatcg cggcagtctc ccaggagcac caggccgact tcgccggggt caacatcagt      180
tttgacaact atcactccac ccacagcgac gagaaccgtg agctggccgg gcttatctac      240
ggcogtctgc aggcoggcgg caagatcaaa agccgcacca tctcccagct gttcgatccg      300
gaaaaatcca tgttcctgcc ggatcgtttc gtcaagggca cctgccccaa gtgcaagtcc      360
ccggagcagt atggcgacaa ctgcgacagc tgggcgcta cctacagccc gaccgaactg      420
atcgatccga aatccgcgct ctccggcgct accccggtga tgaaggactc cgagcacttc      480
tttttcgacc tgccgcagtt tgag                                             504

```

5 <210>3
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> Aeromonas hydrophila

10 <220>
 <221 > fuente
 <222> 1..495
 <223> /tipo_mol = "ADN genómico" / nota = "secuencias de genes que codifican la gltA en el biotipo B (AL20215)" /organism = "Aeromonas hydrophila"

15 <400> 3

```

ttcctgcaca tgatgtttg cgtgccgacc gaggagtaca aggtcaaccc catcgtcgaa      60
cgcgccatgg accgcatctt taccctgcat gcggaccacg agcagaacgc ctccacctcc      120
accgtgogtc tggccggctc ctccggcgcc aaccogtttg cctgtatcgc cgcggggatc      180
gcctccctgt ggggaccggc ccacggtggt gccaacgaag cctgcctcaa gatgctcgag      240
gagatcggct ccgttgaccg cattcccga tacatcgcca aggccaagga caagaacgat      300
ccattccgctc tgatgggctt cggtcaccgg gtctacaaga accacgacct ccgtgccacc      360
gtgatgcgcg aaacctgtca cgaggtactg accgagctgc agatcaagga tccgctgctg      420
gacgtggcca tggagctgga gcgcatcgcg ctctccgacc cctacttcat cgagaagaag      480
ctctaccoga acgtg                                                         495

```

20 <210> 4
 <211> 504
 <212> ADN
 <213> Aeromonas hydrophila

25 <220>
 <221 > fuente
 <222> 1..504
 <223> /tipo_mol = "ADN genómico" / nota = "secuencias de genes que codifican la metG en el biotipo B (AL20215)" /organism = "Aeromonas hydrophila"

<400> 4

ES 2 655 679 T3

gccgatatct gggttcgta tcagogaatg cgcggtcacc aggtgcactt tgtotgtgcc	60
gaogatgccc acggcacccc gataatgctc aaggccaac agctggggat caccocggaa	120
gagatgatcg cggccgtctc caaggaacac caggccgact tcgcccgggt caacatcagt	180
tttgacaact atcactccac ccacagcgac gagaaccgcg agctggcgga gctgatctac	240
ggccgtctgc aggcggcgg caagatcaag agccgcacca tctcccagct gttcgatccg	300
gaaaagtcca tgttctgcc ggatcgcttc gtcaaggta cctgccc aa gtgcaagtc	360
ccggagcagt atggcgaaa ctgtgacagc tgcggcgcca octacagccc gaccgagctg	420
attgatccga aatccgcgct ctccggcgcc accccggtga tgaaggactc cgagcacttc	480
ttcttcgatc tgccgcagtt tga	504

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- (i) una cantidad inmunogénica de una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A viva atenuada o inactivada;
 y
 5 (ii) una cantidad inmunogénica de una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B viva atenuada o inactivada.

en la que una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 2, y/o un gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1; y, en la que una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 4, y/o un gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 3.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que:

- (a) una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A comprende: un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99,5 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 2; y/o un gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99,5 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1;
 y/o
 15 (b) una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B comprende: un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99,5 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 4; y/o un gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99,5 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 3.

3. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que:

- (a) una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A está representada por la bacteria depositada bajo el "Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimientos de Patente de 28 de abril de 1977" en las Colecciones de Cultivos de la Agencia de Protección de la Salud, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, RU bajo el número de acceso 12082901; y/o
 25 (b) una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B está representada por la bacteria depositada bajo el "Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimientos de Patente de 28 de abril de 1977" en las Colecciones de Cultivos de la Agencia de Protección de la Salud, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, RU bajo el número de acceso 1208292.

4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que:

- (a) una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A tiene la capacidad de inducir signos clínicos de septicemia, y opcionalmente, mortalidad en *Pangasius (Pangasianodon hypophthalmus)* cuando se inyecta por vía intraperitoneal en peces que pesan 10-20 gramos en una cantidad de 100-2000 ufc/pez y un volumen de inyección de 0,1 ml; y/o
 35 (b) una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B tiene la capacidad de inducir signos clínicos de septicemia, y opcionalmente, mortalidad en *Pangasius (Pangasianodon hypophthalmus)* cuando se inyecta por vía intraperitoneal en peces que pesan 10-20 gramos en una cantidad de 100-6000 ufc/pez y un volumen de inyección de 0,1 ml.

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que:

- (a) una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A tiene la capacidad de inducir al menos un 50 % de mortalidad en *Pangasius (Pangasianodon hypophthalmus)* a los 2-5 días después de la inyección intraperitoneal de dicha bacteria en peces que pesan 10-20 gramos en una cantidad de 100-2000 ufc/pez y un volumen de inyección de 0,1 ml; y/o,
 45 (b) una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B tiene la capacidad de inducir al menos un 50 % de mortalidad en *Pangasius (Pangasianodon hypophthalmus)* a los 2-5 días después de la inyección intraperitoneal de dicha bacteria en peces que pesan 10-20 gramos en una cantidad de 100-2000 ufc/pez y un volumen de inyección de 0,1 ml.

6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que las bacterias de *Aeromonas hydrophila* biotipo A y biotipo B están:

- (a) en una forma viva atenuada; o,
 (b) en una forma inactivada.

7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además uno o más antígenos adicionales, opcionalmente derivados de las bacterias *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnaris*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*.
- 5 8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cantidades de $\geq 10^7$ bacterias/ml de bacterias de *Aeromonas hydrophila*.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que:
- (a) una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A comprende: un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos el 100% idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 2; y/o
- 10 un gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos el 100 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1;
- y/o
- (b) una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B comprende: un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos el 100 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 4;
- 15 y/o un gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos el 100 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 3.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la que la composición está en forma de una vacuna, y opcionalmente está en una forma de dosificación adecuada para la inyección intraperitoneal, preferentemente en la que:
- (a) la forma de dosificación tiene un volumen de entre 0,01 a 0,2 ml/dosificación; o,
- 20 (b) cada dosis comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* en cantidades de $\geq 10^7$ bacterias/ml.
11. una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de septicemia en peces y/o para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces, opcionalmente en la que el pez es del orden de los Siluriformes, Perciformes y Cypriniformes, y en la que preferentemente:
- 25 (a) el pez es una tilapia; o,
- (b) el pez es *Pangasius (Pangasianodon hypophthalmus)*.
12. Una composición que comprende una bacteria que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A, para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de septicemia en peces y/o para su uso en la prevención o
- 30 reducción de la incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces, en la que dicha composición se co-administra con una composición que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B,
- en la que una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 2, y/o un
- 35 gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1; y en la que una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 4, y/o un gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 3.
13. Una composición que comprende una bacteria que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B, para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de septicemia en peces y/o para su uso en la prevención o
- 40 reducción de la incidencia de infecciones por *Aeromonas hydrophila* en peces, en la que dicha composición se co-administra con una composición que comprende una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A,
- en la que una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 2, y/o un
- 45 gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1; y en la que una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 4, y/o un gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 3.
14. Un procedimiento de fabricación de una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende la combinación de:
- (i) una cantidad inmunogénica de una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A viva atenuada o inactivada;
- y
- (ii) una cantidad inmunogénica de una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B viva atenuada o inactivada,
- 55 en el que una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo A tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 2, y/o un

5 gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 1; y en la que una bacteria de *Aeromonas hydrophila* biotipo B tiene un gen de la Metionil-ARNt sintetasa (metG) que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 4, y/o un gen de la Citrato sintasa I (gltA), que comprende una secuencia que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 3.

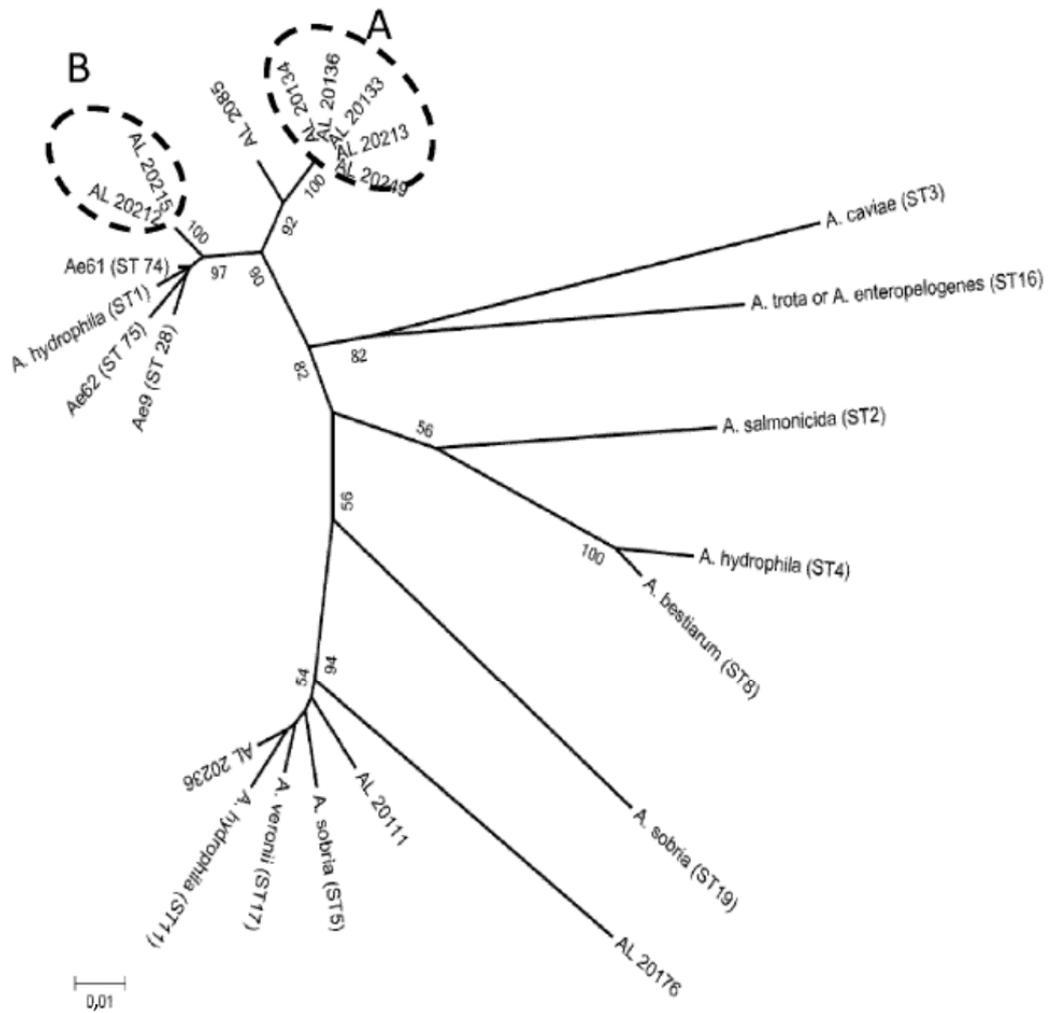


Fig. 1

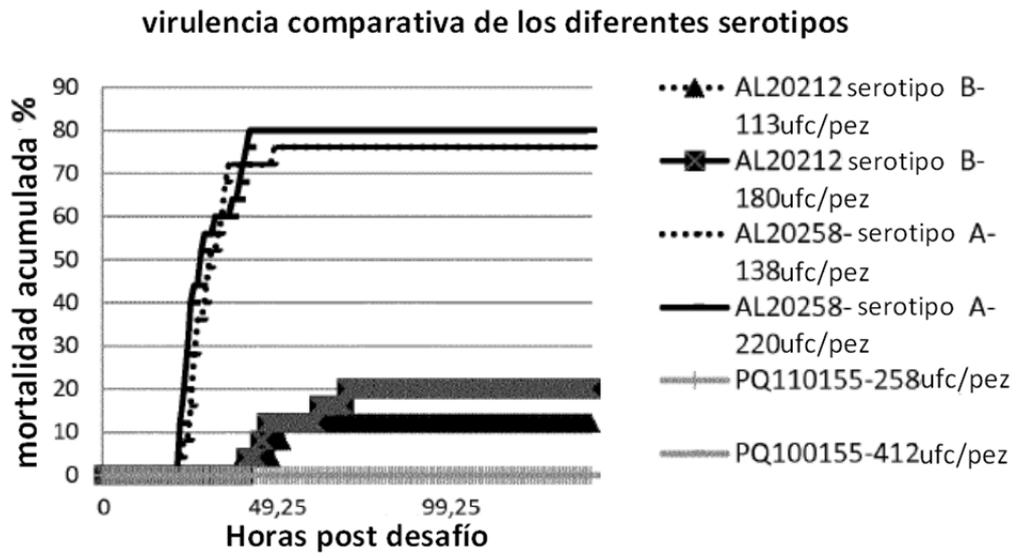


Fig. 2