

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.07.14	(73) Titular(es): NOVARTIS AG LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL NOVARTIS PHARMA GMBH CH AT
(30) Prioridade(s): 2002.07.15 GB 0216414 2002.08.29 GB 0220100	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.04.20	(72) Inventor(es): KIRA SALONIUS STEVEN GARETH GRIFFITHS CA CA
(45) Data e BPI da concessão: 2009.09.09 189/2009	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINA CONTRA A SEPTICÉMIA RICKETTSIAL DOS SALMONÍDEOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"VACINA CONTRA A SEPTICÊMIA RICKETTSIAL DOS SALMONÍDEOS"

Uma vacina à base de células vivas de *Arthrobacter* é útil na prevenção de piscirickettsiose em peixes.

DESCRIÇÃO

"VACINA CONTRA A SEPTICÊMIA RICKETTSIAL DOS SALMONÍDEOS"

Âmbito da Invenção

A presente invenção relaciona-se com o uso de uma estirpe viva de *Arthrobacter* na preparação de um medicamento para tratar ou prevenir a septicémia rickettsial de salmonídeos (SRS), e vacinas à base destas bactérias.

Antecedentes da Invenção

A *Piscirickettsia salmonis* é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória que causa septicémia sistémica (síndrome rickettsial dos salmonídeos, SRS, ou piscirickettsiose) em peixes salmonídeos. As bactérias do tipo *Piscirickettsia* são actualmente encontradas com uma maior frequência em muitas outras espécies de peixe, tanto de água doce como de água salgada em todo o mundo.

A Piscirickettsiose e doenças do tipo da piscirickettsiose têm afectado a produtividade em aquacultura, a rentabilidade, as espécies compatíveis para criação comercial, e o transporte de peixe de sítio para sítio. A indústria da aquacultura Chilena sozinha atribui perdas anuais às piscirickettsioses dos salmonídeos de \$150 milhões. No Chile, a síndrome levou a uma mudança do salmão prateado mais desejável comercialmente para o salmão do Atlântico menos desejável mas mais resistente à piscirickettsiose como a principal espécie cultivada.

Os antimicrobianos têm sido testados como uma terapia para SRS, mas sem sucesso consistente. Outras medidas sugeridas incluem a tentativa de reduzir o stress nos peixes

reduzindo a densidade da população, e removendo os peixes mortos dos tanques rapidamente. A solução mais prática para a SRS epidémica deve ser encontrar uma vacina eficaz para prevenir a doença em primeiro lugar. Preparações de bacterina inactivada a partir de *P. salmonis* têm mostrado ter algum efeito protector, e podem ser a única opção adequada para co-administração em preparações de óleo multivalentes, mas são relativamente dispendiosas para produção a uma escala comercial. As vacinas à base de antigénios recombinantes de *P. salmonis* ainda não alcançaram posição de mercado.

Deste modo, há uma necessidade urgente de fazer disponível uma vacina capaz de reduzir significativamente as mortalidades devidas à piscirickettsiose em peixes. A presente invenção é baseada na descoberta surpreendente de que um produto de vacina comercial existente é marcadamente eficaz na prevenção da doença. Esta vacina é comercializada sob o nome "Renogen™" e compreende uma estirpe viva, não virulenta de *Arthrobacter*. Correntemente, esta vacina está indicada para proteger salmão e outros peixes de viveiro contra a doença bacteriana renal (BKD). As características desta estirpe são descritas na WO 98/33884.

Sumário da Invenção

Num aspecto da invenção é fornecido o uso de células vivas de *Arthrobacter* na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção da piscirickettsiose em peixes. Os alvos preferidos do medicamento são peixes salmonídeos expostos ao risco da infecção SRS. As células de *Arthrobacter* são preferencialmente de uma estirpe depositada sob o número de registo ATCC 59921, ou uma estirpe equivalente.

Ainda num outro aspecto da invenção é fornecida uma composição de vacina compreendendo células vivas de *Arthrobacter* e antigénio de *Piscirickettsia salmonis* inactivado, pelo que a vacina é opcionalmente fornecida na forma de um kit compreendendo uma cultura de células vivas de *Arthrobacter* liofilizada e um diluente estéril compreendendo o antigénio *P. salmonis* inactivado.

Descrição Pormenorizada da Invenção

A vacina RenogenTM tem sido usada há algum tempo para o combate à Doença Bacteriana Renal (BKD) em peixes salmonídeos. Esta vacina é única uma vez que é a primeira cultura viva a ter sido licenciada para uso em aquacultura, e compreende uma cultura viva de *Arthrobacter sp. nov.*, depositada com o Registo No ATCC 55921 com a American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) em 20 Dezembro 1996. A *Arthrobacter* não é patogénica para peixes; tão pouco é o agente causador da BKD (o qual é o *Renibacterium salmoninarum*).

Foi observado num dos locais do viveiro que o uso de RenogenTM numa população de salmões em risco de contrair BKD conduziu a uma redução drástica nas taxas de mortalidade em comparação com peixes não tratados. O ganho em peso médio do grupo tratado com Renogen foi 18% superior ao do grupo de peixes não tratados. A SRS foi também comum no local, o que leva os presentes investigadores a especular que o RenogenTM pode ter conferido protecção oculta contra SRS assim como para a BKD.

Com vista a testar este conceito, os peixes mantidos no tanque foram imunizados com RenogenTM e subsequentemente sujeitos a *P. salmonis*, conforme descrito no Exemplo 2. No

grupo de controlo negativo, o qual recebeu injeção de soro fisiológico, quase todos os peixes sucumbiram à SRS. Os grupos de teste que receberam a vacina RenogenTM apresentaram taxas de mortalidade extremamente baixas após 471 gd (graus-dia), aumentando para entre 88 e 100 a percentagem relativa de sobrevivência (RPS). Mesmo após 1441 gd (equivalente a um ano em água do mar) os grupos de teste tinham uma RPS de entre 69 e 85%, comparado com os 48,6% no grupo "padrão ouro" de *P. salmonis* inactivado.

Outra evidência do potencial da vacinação com RenogenTM é demonstrada pela reactividade cruzada do antigénio de *P. salmonis* quando sondado com anticorpos anti-*Arthrobacter* policlonais de coelho (Exemplo 1).

Nós mostrámos que o RenogenTM é mais eficaz do que qualquer outra vacina conhecida na prevenção de SRS. Bactérias *Arthrobacter* vivas são conhecidas como sendo capazes de entrar nas células e replicarem-se por um período de tempo limitado. Os presentes investigadores acreditam que isto permite o processamento de antigénio tanto de antigénios de hidrato de carbono como de proteína com homologia suficiente para os epitopos das células T de *P. salmonis* para produzir um alto nível de protecção ao desafio directo com *P. salmonis* virulento.

A invenção fornece portanto o uso de células de *Arthrobacter* na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de piscirickettsiose em peixes, em especial em peixes salmonídeos, incluindo espécies de salmão e truta, particularmente salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*), salmão real (*Oncorhynchus tshawytscha*), salmão japonês (*Oncorhynchus masou*), salmão

rosa (*Oncorhynchus gorbuscha*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), e salmão do Atlântico (*Salmo salar*). No entanto, quaisquer outras espécies de peixes susceptíveis a piscirickettsiose ou doenças semelhantes podem beneficiar, tais como, *Tilapia* sp., serrano estriado (*Dicentrarchus* sp.), corvinata branca (*Atractoscion nobilis*), peixe garoupa, ciclídeos, etc.

A RenogenTM tem como base uma estirpe de *Arthrobacter* particular depositada (ATCC 59921). Na realização da presente invenção, esta estirpe ou estirpes de *Arthrobacter* equivalentes podem ser empregues. Estirpes de *Arthrobacter* equivalentes partilham as características de identificação da *Arthrobacter* ATCC 59921. Elas apresentam capacidades protectoras contra a SRS semelhantes. Uma espécie de *Arthrobacter* com uma sequência de 16S rDNA idêntica ou uma sequência de 16S rDNA tendo uma divergência de menos de 3% em relação à estirpe ATCC 59921 é considerada como sendo equivalente. Esta sequência 16S rDNA está depositada sob o Registo número AF099202 do Genbank. Outro método de definir uma estirpe equivalente é por ensaios de RAPD usando o primer F12-373 (5'-ACGGTACCAG-3'), conforme descrito em Griffiths, SG et al. (1998) *Fish & Shellfish Immunology* 8: 607-619. Um fragmento distintivo de cerca de 373 pb é gerado quando este ensaio é realizado em *Arthrobacter* ATCC 59921 e estirpes equivalentes. Um ensaio de RAPD alternativo descrito na mesma publicação usando primers RsxII-67f (5'-CTGTGCTTGACGGGGGATTA-3') e RsxII-284r (5'-GTGGCCGGTCACCCTCTCAG-3') produz um fragmento de 260 pb quando realizado em *Arthrobacter* ATCC 59921 ou estirpes equivalentes.

Espécies do género *Arthrobacter* são numerosas e abundantes em diversos habitats, incluindo ambientes marinhos. Muitas estirpes de *Arthrobacter* estão disponíveis a partir de instituições depositárias comerciais. Não é uma sobrecarga para o especialista rastrear uma selecção de estirpes conhecidas ou estirpes recentemente isoladas em relação às características de identificação e/ou propriedades imunogénicas de SRS aqui identificadas. As propriedades imunogénicas de SRS podem ser identificadas por métodos de ensaios de rastreio descritos no parágrafo anterior e/ou por procedimentos experimentais descritos no Exemplo 1 e Exemplo 2.

A via preferida de administração da vacina é por injeção na cavidade peritoneal mas existem outras opções de administração, incluindo oralmente na ração, por injeção intradérmica ou intramuscular, ou por imersão em água salgada ou água doce. Os peixes geralmente são anestesiados antes de receberem a vacina por injeção. É recomendado que os peixes tenham 10 gramas ou mais de peso corporal para administração da vacina da invenção por injeção intraperitoneal. Por imersão ou administração oral, é preferido um peso corporal de pelo menos 2 gramas.

A dose eficaz da vacina pode variar dependendo do tamanho e da espécie do indivíduo, e de acordo com o modo de administração. A dose óptima pode ser determinada através de um ensaio de tentativa e erro por um veterinário ou um especialista em aquacultura. Uma gama de dose adequada pode variar desde cerca de 10^2 até 10^9 ufc por dose unitária, preferencialmente cerca de 10^4 até 10^7 ufc por dose unitária, mais preferencialmente cerca de 10^5 até 10^8 ufc por dose unitária, o mais preferencialmente cerca de 10^5

ufc por dose unitária. Porém, doses maiores ou menores podem também ser eficazes. Preferencialmente, uma dose única é administrada ao peixe a ser tratado. Peixes mais pequenos podem beneficiar de uma dose de cerca de 10^4 até 10^7 ufc/mL com administração por mergulho (imersão), por exemplo com um tempo de contacto de cerca de 60 segundos. Para a administração por imersão, a vacina pode ser diluída a 1 para 10 volumes de água antes de adicionar aos tanques ou aos compartimentos contendo os peixes.

Um volume de dose preferido para injeções é cerca de 0,05-0,5mL, preferencialmente 0,075-0,25mL, mais preferencialmente 0,1-0,2mL, opcionalmente cerca de 0,1mL.

Devido à dependência do desenvolvimento da imunidade na temperatura da água, é preferido que os peixes não sejam expostos à infecção de SRS até pelo menos 400 graus dia após a vacinação com a vacina de *Arthrobacter* da invenção (graus dia = no. de dias x temperatura média da água em °C).

Numa forma de realização da invenção, as células vivas de *Arthrobacter* são combinadas com um transportador ou veículo farmacologicamente aceitável numa composição farmacêutica. Transportadores/veículos adequados incluem excipientes convencionais, e podem ser, por exemplo, solventes tais como água, óleo, ou soro fisiológico, dextrose, glicerol, agentes molhantes ou emulsionantes, agentes de volume, revestimentos, ligantes, enchimentos, desintegrantes, diluentes, lubrificantes, agentes tamponantes de pH, ou adjuvantes convencionais tais como dipéptidos de muramilo, avridina, hidróxido de alumínio, óleos, (e.g. óleo mineral), saponinas, copolímeros de bloco e outras

substâncias conhecidas na técnica. Uma composição farmacêutica preferida compreende um diluente salino.

Tipicamente, as vacinas são preparadas como soluções ou suspensões líquidas para injeção ou para distribuição na água. Formas sólidas (e.g. pós) adequadas para dissolução em, ou suspensão em, veículos líquidos, ou para misturar com alimentos sólidos antes da administração podem também ser preparadas.

Preferencialmente a vacina é uma cultura liofilizada. Nesta forma, a vacina é adequada para reconstituição com um diluente estéril. Por exemplo, as células liofilizadas podem ser reconstituídas em soro fisiológico 0,9% (opcionalmente fornecido como parte do produto de vacina embalado). As composições farmacêuticas de vacina da invenção podem ser administradas numa forma para libertação imediata ou de libertação prolongada.

A vacina de *Arthrobacter* pode compreender também um imunoestimulante. O imunoestimulante pode ser qualquer imunoestimulante conhecido, mas é preferencialmente uma preparação bacteriana morta. Preferencialmente, o imunoestimulante é material celular morto de *Arthrobacter*, o qual é opcionalmente morto pelo calor e é opcionalmente de uma cultura de *Arthrobacter* ATCC 59921. Exemplos adequados de preparações bacterianas mortas incluem: "Peptimune" (uma cultura de *Arthrobacter* ATCC 59921 morta pelo calor) e "Ultracorn" (lisado de *Corynebacterium cutis* ultrasonicado). Uma dosagem óptima de imunoestimulante bacteriano morto é (por dose unitária de vacina) 1 até 100 µg, preferencialmente numa gama de 5 até 50 µg, mais preferencialmente 10 até 20 µg e opcionalmente cerca de 12

µg de matéria celular. O imunoestimulante bacteriano morto é opcionalmente dissolvido ou suspenso em diluente estéril (e.g. soro fisiológico) para mistura com células vivas de *Arthrobacter* liofilizadas.

A invenção num aspecto fornece uma composição de vacina compreendendo células vivas de *Arthrobacter* e que compreende adicionalmente pelo menos um outro imunogénio (onde um "imunogénio" é definido como uma molécula tal como um antígeno capaz de provocar uma resposta imune específica num peixe). O imunogénio é opcionalmente seleccionado a partir do grupo que consiste em: antígeno inactivado preparado a partir de *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*); um antígeno recombinante de *P. salmonis*; e um vector de ácido nucleico transportando um antígeno de *P. salmonis* expressável. Em alguns casos, pode ser desejável combinar a vacina RenogenTM da invenção com uma vacina de SRS convencional (bacterina de *P. salmonis* ou vacina de antígeno recombinante ou vacina de ácido nucleico) num kit compreendendo ambos os componentes para administração separada, sequencial ou simultânea, para tratamento ou prevenção de SRS.

Numa forma de realização preferida, a invenção relaciona-se com uma vacina compreendendo células vivas de *Arthrobacter* e antígeno de *P. salmonis* inactivado. O antígeno de *P. salmonis* pode ser preparado por inactivação usando qualquer agente de inactivação conhecido, mas é preferencialmente preparado por inactivação por formalina. O antígeno de *P. salmonis* pode ser preparado a partir de qualquer isolado de bactérias. Opcionalmente, a estirpe LF-89 depositada sob a ATCC número VR-1361, ou uma estirpe daí derivada, é usada para preparar o antígeno inactivado.

Um procedimento adequado para inactivar o antigénio de *P. salmonis* é pela recolha do sobrenadante a partir de culturas de células CHSE-14 infectadas com *P. salmonis* e adicionando formalina (solução de formaldeído 37%) até uma concentração final de 0,125% (v/v). A mistura de fluido da cultura/formalina é agitada até à homogeneidade e depois mantida a $4\pm 2^{\circ}$ C com agitação constante durante um mínimo de 72 horas. O material de recolha inactivado pode ser concentrado por ultra-filtração estéril. Uma concentração final adequada da preparação de antigénio de *P. salmonis* definida por uma taxa do imunoensaio de enzima (EIA) expressa como $OD_{405/490}$ do antigénio/ $OD_{405/490}$ padrão, é de $1,5\pm 0,2$ unidades.

A combinação de componentes de *Arthrobacter* e de *P. salmonis* numa única vacina conduz a um aumento significativo da protecção contra SRS comparado com a vacina de células vivas de *Arthrobacter* isoladamente. Num ensaio de desafio de SRS semelhante àquele descrito no Exemplo 2, mostrou-se que a longo prazo (passado 1400 graus dia) a vacina bivalente adiciona mais de 20 pontos de RPS (percentagem de sobrevivência relativa) comparada com a vacina viva monovalente de *Arthrobacter*.

Preferencialmente, esta vacina é produzida e vendida na forma de um kit compreendendo uma cultura liofilizada de células vivas de *Arthrobacter*, em conjunto com um diluente estéril tal como soro fisiológico no qual o antigénio de *P. salmonis* inactivado (e opcionalmente um imunoestimulante bacteriano morto) é dissolvido ou suspenso. Por exemplo, o antigénio de *P. salmonis* preparado feito conforme descrito acima pode ser misturado com o diluente a uma concentração

de entre cerca de 10 até cerca de 150 mL/litro, preferencialmente cerca de 20 até cerca de 100 mL/litro, e o mais preferencialmente 75 mL/litro.

Vacinas que incorporam células vivas de *Arthrobacter* protegem não só contra SRS mas também originam protecção dos peixes contra a infecção de BKD.

Exemplos

Exemplo 1 Reactividade cruzada do antigénio de *P. salmonis* com os anticorpos policlonais anti-*Arthrobacter*

Aproximadamente 25µg de células bacterianas de *P. salmonis*, lavadas três vezes, recolhidas da cultura de células CHSE-214, foram misturados com 100µL de tampão de Laemmli e aquecidos a 95°C durante 3 minutos. Amostras de 10 µL foram colocadas em gel de acrilamida a 9% e submetidas a electroforese a 150 volts durante 1 hora para separar as proteínas. As proteínas foram transferidas para uma membrana de 100% de nitrocelulose usando um "transblotter" semi-seco (BIORAD). A transferência da proteína foi realizada a 20 volts durante 50 minutos.

O depósito foi incubado com 20 µL de anticorpos policlonais de coelho anti-*Arthrobacter* durante 45 minutos em 15mL de soro fisiológico tris-borato caseína (cTBS) 1%. O depósito foi depois exposto a 5µL de fosfatase alcalina imunoglobulina de cabra anti-coelho (GAR-AP), e revelado. Muitas proteínas foram destacadas no depósito, indicando que os anticorpos de proteínas anti-*Arthrobacter* têm uma forte afinidade para algumas proteínas de *P. salmonis*. Este resultado foi também confirmado num "Western blot" 2D.

Esta experiência mostra que algumas proteínas de *P. salmonis* e *Arthrobacter* têm reacção cruzada, indicando que estas proteínas de *Arthrobacter* podem preparar o sistema imune para produzir anticorpos potencialmente capazes de reconhecer e de proteger contra bactérias virulentas de *P. salmonis*.

Exemplo 2 Protecção de uma vacina de *Arthrobacter* contra SRS

Salmões prateados (n=110 por grupo de tratamento, peso médio 10 g) foram mantidos sob condições de criação normais em água de tanque de acordo com procedimentos operacionais padrão a 12 °C. Após uma semana de aclimatização, os Grupos 1, 2 e 3 foram vacinados intraperitonealmente com 0,1mL de 10^5 , 10^6 , e 10^7 ufc/dose, respectivamente, de células liofilizadas de *Arthrobacter sp. nov* (Renogen™) reconstituídas em diluente de soro fisiológico. Os Grupos 4 e 5 foram tratados de modo idêntico ao Grupo 1, mas com a adição de 12,2 µg e 50 µg por dose, respectivamente, de "Peptimmune" no diluente de soro fisiológico. O Peptimmune é uma preparação de *Arthrobacter* morto pelo calor, desenvolvido em cultura líquida (caldo MTSB) até uma densidade de células $> 1 \times 10^9$, e padronizado por ensaio de proteína para administrar 12 e 50 µg por dose. Os Grupos 6 e 7 eram controlos positivos vacinados com bacterina de *P. salmonis*. A bacterina foi preparada a partir do sobrenadante de uma cultura de células CHSE-14 infectadas com a estirpe LF-89 do tipo *P. salmonis* usando formalina 0,125% a 4°C durante um período mínimo de 72h. Foi empregue concentração U/F e o sobrenadante concentrado foi usado para incorporar 8 µg (proteína) por dose de 0,1mL. A vacina de bacterina foi administrada com Ultracorn (Virbac,

França) a 20 (Grupo 6) e a 100 µg (Grupo 7) por peixe. O Ultracorn é um imunoestimulante à base de um lisado de *Corynebacterium cutis* ultrasonificado. Os antígenos foram emulsionados com um volume igual de adjuvante de óleo mineral antes da injeção. O grupo de controlo negativo (Grupo 8) recebeu uma injeção de soro fisiológico.

A Tabela 1 resume os grupos de tratamento (volume de dose (0,1 mL por peixe) para 20 mLs):

Grupo	Tratamento	Concentrado de Antígeno (mL)	Ultracorn (20 mg/mL)	Soro fisiológico	Adjuvante em Óleo (mL)
1	Renogen™ 10 ⁵ ufc	nada	nada	1 frasco/1000 mL	
2	Renogen™ 10 ⁶ ufc	nada	nada	1 frasco/ em um mL (99 mL de soro fisiológico)	
3	Renogen™ 10 ⁷ ufc	nada	nada	2 frascos/2 mL (18 mL de soro fisiológico)	
4	10 ⁵ +100 mL (12,2 µg por dose de Peptimune)			Como 1	
5	10 ⁵ +400 mL (50 µg por dose de Peptimune)			Como 1	
6	Bact. P. salmonis 20 µg - 3x	3	0,2	6,8	10
7	Bact. P. salmonis 100 µg -3x	3	1,0	5,8	10
8	Soro fisiológico			0,1	

Método do desafio

Aos 471 e 1441 gd (graus dia) após vacinação, grupos duplicados de 25 peixes por tratamento foram desafiados com *P. salmonis* virulento por injeção intraperitoneal. O *P. salmonis* virulento foi cultivado em células CHSE-14 durante um mínimo de 2-3 semanas. Os sobrenadantes das culturas que atingiram pelo menos 50% de CPE foram usados para as injeções i.p. As injeções de *P. salmonis* virulento foram

dadas em diluições de 10^{-2} ou mais a 0,1 mL por peixe (n=25). Os peixes desafiados foram mantidos a 12°C.

Antes de acabar o desafio 1, foram sacrificados 10 peixes das populações sobreviventes dos Grupos 1, 7 e 8 (apenas 8 peixes sobreviveram neste grupo) e uma amostra de 0,5 g de tecido esplênico e renal foi recolhida, homogeneizada e diluída em 10 mL meio de cultura de tecido. Foi determinada uma TCID₅₀ em placas de 96 poços contendo células CHSE-214 confluentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Tabela 1: Mortalidade durante o teste de segurança de 28 d, mantido a 9-12 °C durante o período de segurança e pré-desafio.

Grupo	Tratamento	Tanque	Perda por tratamento (N)	Total (N)	% Mortalidade
1	Dose 10^5 de Renogen™	1	0	110	0
2	Dose 10^6 de Renogen™	2	0	110	0
3	Dose 10^7 de Renogen™	3	7	110	6,3
4	Dose 10^5 de Renogen™ +12,2 µg de Peptimmune	4	1	110	0,9
5	Dose 10^5 de Renogen™ +50 µg de Peptimmune	5	4	110	3,6
6	20U P. salmonis/Óleo	6	0	110	0
7	100U P. salmonis/Óleo	7	0	110	0
8	Soro fisiológico	8	0	110	0

Durante o estudo de segurança, foi observado que os peixes no Grupo 3 sofreram algumas perdas (6,3%) próximo do fim do período de segurança de 28 d. O investigador do laboratório tratou todos os peixes da população com um tratamento de formalina de três dias para a doença das guelras

bacteriana. A mortalidade (3,6%) no Grupo 5 foi registada durante o período inicial de três dias pv, indicando que a inclusão do Peptimune como 40% do diluente foi algo tóxica. Não foram cultivadas placas positivas a partir das perdas durante o período de segurança, quer para a estirpe de vacina viva, quer para quaisquer culturas bacterianas acidentais.

Tabela 2: Mortalidade cumulativa e Percentagem de Sobrevivência Relativa do salmão prateado (peso médio 10 g) 471 gd após a vacinação com células de *Arthrobacter sp. nov* (Grupos 1-5), vacinas de SRS inactivadas, ou soro fisiológico quando desafiados com *P. salmonis* virulento por injeção intraperitoneal (TCID₅₀ 3 x 10^{2,9} por peixe) a 12 °C.

Grupo	Tratamento	Tanque	Perda por tanque duplicado (N)	Total	Perda por tratamento	% Morte	RPS
1	Dose 10 ⁵ de Renogen™	L1, L2	0/25, 1/25	50	1/50	2	97,6
2	Dose 10 ⁶ de Renogen™	L3, L4	1/26, 0/24	50	1/50	2	97,6
3	Dose 10 ⁷ de Renogen™	L5, L6	2/25, 3/25	50	5/50	10	88,1
4	Dose 10 ⁵ de Renogen™ + 12,2 µg de Peptimune	L7, L8	0/25, 0/25	50	0/50	0	100
5	Dose 10 ⁵ de Renogen™ +50 µg de Peptimune	L9, L10	0/25, 0/25	50	0/50	0	100
6	20U <i>P. salmonis</i> /Óleo	L11, L12	9/25, 12/25	50	21/50	42	50,0
7	100U <i>P. salmonis</i> /Óleo	L13, L14	7/25, 6/25	50	13/50	26	69,1
8	Soro fisiológico	L15, L16	19/25, 23/25	50	42/50	84	—

Aos 471 gd após a vacinação, os peixes no Grupo 1 tinham uma percentagem de sobrevivência relativa (RPS) de 97,6, um elevado nível de protecção em relação a infecção directa

com *P. salmonis* durante 32 dias, enquanto que a mortalidade no grupo de controlo com soro fisiológico foi de 84%. Isto é favoravelmente comparado com a protecção obtida pela vacinação com vacinas inactivadas padrão (Grupos 6 e 7), que apresentaram valores de RPS de 50 e 69% respectivamente.

Análise TCID₅₀ dos Peixes Sobreviventes nos Grupos 1, 7 e 8.

Nível de infecção de SRS nas amostras de tecido dos peixes sobreviventes do desafio de 471 gd (n=7-10), 32 dias após a infecção:

Grupo	Tratamento	% de peixes TCID ₅₀ >10 ² /mL	TCID ₅₀ média
1	Renogen™	20	104,5/mL
7	100U <i>P. salmonis</i> /óleo	44	104,6/mL
8	Soro fisiológico	50	104,7/mL

A TCID₅₀ dos peixes da amostra do grupo do Renogen™ foi mais baixa do que a do grupo da vacina inactivada, e ambas foram mais baixas do que os controlos de soro fisiológico. Isto não tem relevância clínica aparente, visto que a contribuição dos grupos de títulos elevados nega as doses infecciosas mais baixas quando se calcula a média. No entanto, o grupo do Renogen™ teve a percentagem mais baixa de positivos (<20%) uma vez que se considerou que as amostras com menos de 10² não estavam clinicamente infectadas com SRS. Isto é comparável com as mesmas amostras do grupo de controlo com soro fisiológico em que 50% dos peixes deram positivos para SRS, e favoravelmente em relação ao grupo da vacina inactivada com 44% dos peixes positivos para SRS.

Tabela 3: Mortalidade cumulativa e Percentagem de Sobrevivência Relativa do salmão prateado (peso médio 10 g) 1441 gd após a vacinação com células *Arthrobacter sp. nov* (Grupos 1-5), vacinas de SRS inactivadas, ou soro fisiológico quando desafiados com *P. salmonis* virulento por injeção intraperitoneal (TCID 3 x 10^{2,9} por peixe) a 12 °C.

Grupo	Tratamento	Tanque	Perda por tanque duplicado (N)	Total	Perda por tratamento	% Mort	RPS
1	Dose 10 ⁵ de Renogen™	L1, L2	8/25, 3/25	50	11/50	22	69,4
2	Dose 10 ⁶ de Renogen™	L3, L4	2/24, 3/25	49	5/49	10,2	85,8
3	Dose 10 ⁷ de Renogen™	L5, L6	3/19, 2/19	38	5/38	13,2	81,7
4	Dose 10 ⁵ de Renogen™ +12,2 µg de Peptimune	L7, L8	4/25, 5/25	52	9/52	17,2	76,1
5	Dose 10 ⁵ de Renogen™ +50 µg de Peptimune	L9, L10	2/24, 5/24	48	7/48	14,6	79,7
7	100U <i>P. salmonis</i> /Óleo	L11, L12	10/23, 7/23	46	17/43	37	48,6
8	Soro fisiológico	L13, L14	20/25, 16/25	50	36/50	72	—

Nota: os peixes de reserva no Grupo 6 previstos para o estudo de eficácia a longo prazo foram perdidos devido ao corte accidental do fluxo de água neste tanque (17).

Após ter decorrido um período de 1140 gd, foi avaliada a resposta duracional da protecção observada no período de teste anterior (471 gd). Os resultados do segundo desafio onde foi observado um nível de 72% de mortalidade no grupo de controlo com soro fisiológico, indicam que o nível de protecção ainda é elevado com peixes tratados com Renogen™

(69,4% RPS), com alguma indicação de que uma dose mais elevada pode melhorar a protecção de longo prazo (10^6 e 10^7 ufc/dose tiveram uma RPS de 85,8 e 81,7 respectivamente). A adição do imunoestimulante Peptimune a 12 e 50 µg ao diluente forneceu uma melhoria da eficácia do produto na dose (76,1 e 79,7 % respectivamente). A perda accidental da vacina de referência padrão (grupo 6) só permitiu a comparação com o Grupo 7, e este grupo teve uma RPS de 48,6%.

CONCLUSÕES:

O Renogen forneceu protecção significativa contra o desafio directo com *P. salmonis* aos 471 gd e aos 1441 gd após a vacinação. A vacina foi superior à protecção fornecida pela vacina em óleo padrão. Nós conseguimos demonstrar que poucos dos peixes sobreviventes no grupo do Renogen™ estavam clinicamente infectados com *P. salmonis*. O estudo demonstra que a vacina viva de *Arthrobacter sp. nov.* fornece um elevado grau de protecção contra a infecção por *P. salmonis*, e que o efeito protector é a longo prazo. A inclusão de uma preparação de *Arthrobacter* morto na vacina teve um efeito imunoestimulante, resultando em melhores taxas de sobrevivência.

Lisboa, 21 de Setembro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de células vivas de *Arthrobacter* na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de piscirickettsioses em peixes.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1 em que os peixes são peixes salmonídeos incluindo espécies de salmão e de truta.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 em que a piscirickettsiose é a Septicémia Rickettsial dos Salmonídeos (SRS).

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 3 em que as células de *Arthrobacter* são da estirpe depositada sob o número de registo ATCC 55921 ou uma estirpe equivalente com capacidades imunoprotectoras contra piscirickettsioses em peixes.

5. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 4 em que os peixes são seleccionados a partir do grupo que consiste em: salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*), salmão real (*Onchorhynchus tshawytscha*), salmão japonês (*Onchorhynchus masou*), salmão rosa (*Onchorhynchus gorbuscha*), truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*).

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5 em que o medicamento compreende também antigénio(s) de *Piscirickettsia salmonis*.

7. Composição de vacina compreendendo células vivas de *Arthrobacter* e compreendendo ainda pelo menos um outro

imunogénio, em que o referido imunogénio é seleccionado a partir do grupo que consiste em: antigénio inactivado preparado a partir de *P. salmonis*; um antigénio recombinante de *P. salmonis*; e um vector de ácido nucleico transportando um antigénio de *P. salmonis* expressável.

8. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 7 compreendendo células vivas de *Arthrobacter* e um antigénio de *P. salmonis* inactivado por formalina.

9. Kit compreendendo uma primeira vacina compreendendo células vivas de *Arthrobacter* e uma segunda vacina compreendendo um imunogénio seleccionado a partir do grupo que consiste em: antigénio inactivado preparado a partir de *P. salmonis*; um antigénio recombinante de *P. salmonis*; e um vector de ácido nucleico transportando um antigénio de *P. salmonis* expressável; para administração separada, sequencial ou simultânea aos peixes.

10. Kit de acordo com a reivindicação 9 compreendendo células vivas liofilizadas de *Arthrobacter* e um diluente estéril compreendendo antigénio de *P. salmonis* inactivado.

Lisboa, 21 de Setembro de 2009