



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl.[®]: **A 61 K 35/74 (2006.01)** **A 61 K 39/09 (2006.01)**
(21) Patentansøgning nr: **PA 2006 00871**
(22) Indleveringsdag: **2006-06-29**
(24) Løbedag: **2004-12-01**
(41) Alm. tilgængelig: **2006-06-29**
(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2009-02-09**
(86) International ansøgning nr: **PCT/EP2004/053201**
(86) International indleveringsdag: **2004-12-01**
(85) Videreførelsesdag: **2006-06-29**
(30) Prioritet: **2003-12-03 EP 03104529.7**
- (73) Patenthaver: **Intervet International B.V., Wim de Körverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer, Holland**
(72) Opfinder: **Luc Grisez, 6 Greenleaf Avenue, B 279588 Singapore, Belgien**
Ruud Philip Antoon Maria Segers, Groenling 3, 5831 MZ Boxmeer, Holland
Chow Yong NG, Blk 348 #04-46 Clementi Ave %, 120348 Singapore, Singapore
- (74) Fuldmægtig: **Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Streptococcus phocae vaccine**

(56) Fremdragne publikationer:
US B1 6379677

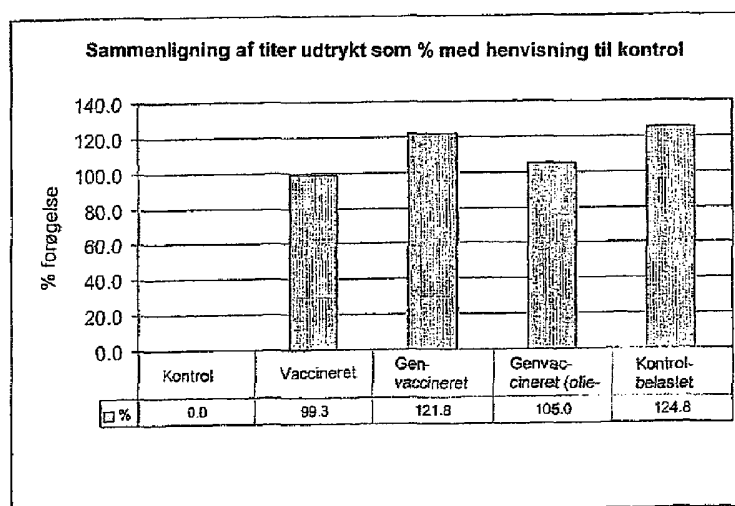
ELDAR A ET AL: "Development and efficacy of a vaccine against Streptococcus iniae infection in farmed rainbow trout" VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, vol. 56, no. 1-2, 1997, pages 175-183.

SKAAR I ET AL: "Streptococcus phocae sp. nov., a New Species Isolated from Clinical Specimens from Seals" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 44, no. 4, 1994, pages 646-650.

NEWMAN SG: "Bacterial Vaccines for Fish" ANNUAL REVIEW OF FISH DISEASES, 1993, pages 145-185.

(57) Sammendrag:

Den foreliggende opfindelse angår anvendelse af bakterier af arten *Streptococcus phocae* til fremstilling af en vaccine, til fremgangsmåder til fremstilling af sådanne vacciner, til bakterier af arten *Streptococcus phocae* til anvendelse i en vaccine og til fremgangsmåder til bekæmpelse af *Streptococcus phocae* infektion i fisk.



Figur 3

Titel: Streptococcus phocae vaccine

Den foreliggende opfindelse angår anvendelse af Streptococcus phocae bakterier til fremstilling af en vaccine, fremgangsmåder til fremstilling af sådanne vacciner, Streptococcus phocae bakterier til anvendelse i en vaccine.

En hidtil ukendt sygdom er for nylig fundet i laks, specifikt i atlantehavslaks (Salmo salar) fra chilenske kystfarvande. Sygdommen er karakteriseret ved hudblødninger, som punktformede blodudtrædninger tæt ved gattet og på begge sider af fisken, bylder og læsioner, der påvirker musklerne, indre blødninger og kongestion. Udbruddene er akutte, og det første sygdomstegn under udbrud er ofte en forøget mortalitet, der derefter kan relateres til de ovenfor nævnte symptomer. Udbrud finder oftest sted mellem midt i december og midt i april, og mortaliteten forøges, når vandtemperaturen overstiger 13,5°C. Hvis et udbrud starter i sommertiden, kan den gerne udstrække sig indtil efteråret, når vandtemperaturerne falder til under 11°C. Der er ikke nogen sammenhæng mellem vandets salinitet og udbruddene. Der er ikke nogen aldersafhængig modtagelighed, og fisk fra efter unglaksstadiet til fisk på stadiet lige før fangst kan påvirkes. I december ses en mortalitet på ca. 4%, 8% i februar og 10-15% i marts.

Sygdommen er indtil nu kun fundet i atlantehavslaks og ikke (endnu) i andre laksefisk (salmonider), såsom Coho-laks eller regnbueørred. Årsagen til sygdommen er dog hidtil ukendt.

Det har nu overraskende vist sig, at årsagen til denne hidtil ukendte sygdom er en bakterie af arten Streptococcus phocae. Denne bakterie blev fundet for første gang omkring 1994, hvor den blev identificeret som en af de endelige årsager til død i sæler, der lider af phocin-hundesygge-virus. Populationen af sæler, der var hårdest ramt af virusset, omfatter hovedsageligt spættede sæler (Phoca vitulina) og gråsæler (Halichoerus grypus). Bakterien, der ofte blev isoleret fra syge sæler, blev givet navnet Streptococcus phocae, og den er blevet omfattende karakteriseret af Ida Skaar et al., (Int. J. of System. Bacteriol. 44: 646-650 (1994)). Den såkaldte type stamme af bakterien kan skaffes fra National Collection of Type Cultures (NCTC), PHLS Central Public Health Laboratory, 61 Co-

lindale Avenue, London NW9 5HT, United Kingdom under deponeringsnummer NCTC 12719, og fra Culture Collection of the University of Göteborg, Department of Clinical Bacteriology, Mikrobiologen, Guldhedsgatan 10, SE-413 46, Göteborg, Sverige under deponeringsnummer CCUG 35103.

5

Sygdommen er fundet i sæler fra mange fjerntliggende steder, fra nordøsteuropæiske lande, såsom England, Skotland, Holland, Norge, Tyskland, Danmark og Sverige til sydafrikanske farvande og i kystfarvande i dele af Sydamerika, f.eks. Chile.

10

Det var overraskende, at denne bakterie, som helt klart er et mammalt patogen, kunne isoleres fra syge fisk. Dette er aldrig tidligere set eller beskrevet, ikke i Afrika, eller i Sydamerika eller nordøsteuropæiske lande eller en hvilken som helst anden del af verden. Sygdommen i fisk er indtil videre kun rapporteret fra

15 Chile, og ikke fra Nordøsteuropa, på trods af det faktum, at der er et omfattende kommercielt opdræt af laks i det nordøstlige Europa. Sandsynligvis er det kun et spørgsmål om tid, før sygdommen begynder at påvirke laksefisk i andre dele af verden.

20 Det har endnu mere overraskende vist sig, at denne bakterie ser ud til at være et primært patogen i fisk, dvs., den er i stand til at forårsage sygdom i raske fisk.

Til slut har det vist sig, at denne bakterie kan danne basis for en vaccine til bekæmpelse af *Streptococcus phocae* infektion.

25

En udførelsesform af den foreliggende opfindelse angår derfor anvendelse af *Streptococcus phocae* bakterier til fremstilling af en vaccine til bekæmpelse af *Streptococcus phocae* infektion i fisk.

30 Siden det nu overraskende har vist sig, at *Streptococcus phocae* er i stand til at skifte fra pattedyrearter til fiskearter, er det højst sandsynligt kun et spørgsmål om tid, før bakterien inficerer andre fiskearter, hvor den første art er i gruppen af laksefisk. I en foretrukken udførelsesform er *Streptococcus phocae* derfor an-

vendt til fremstilling af en vaccine til bekæmpelse af *Streptococcus phocae* infektion i laksefisk.

- 5 Idet de mest akutte problemer i øjeblikket ses i atlantehavslaks, er anvendelse af *Streptococcus phocae* bakterierne til fremstilling af en vaccine til bekæmpelse af *Streptococcus phocae* infektion i atlantehavslaks en mere foretrukken udførelsesform.

- Vaccinen kan omfatte bakterier af arten *Streptococcus phocae* som en bakterin
10 og/eller i en levende attenueret form. En levende attenueret bakterie er en bakterie, der er mindre sygdomsfremkaldende (patogen) end dennes vildtypemodpart, mens den dog inducerer et tilsvarende immunrespons. Attenuerede stammer kan opnås ved anvendelse af klassiske teknikker, såsom kemisk mutagenese, UV-bestråling og deslige, og ved stedsspecifik mutagenese. En bakterin
15 defineres her som bakterier af arten *Streptococcus phocae* i en inaktiveret form. Fagmanden vil notere sig, at fremgangsmåden, der anvendes til inaktivering, ikke er relevant for aktiviteten af bakterinet. Klassiske fremgangsmåder til inaktivering, såsom UV-bestråling, gamma-bestråling, behandling med formalin, binnært ethylenimin, thimerosal og deslige, er velkendte for fagmanden, og er alle
20 anvendelige. Inaktivering af bakterier ved hjælp af fysisk stress, ved anvendelse af f.eks. en fransk presse, tilvejebringer et på lignende vis egnet udgangsmateriale til fremstilling af en vaccine ifølge opfindelsen. Et bakterin behøves således ikke nødvendigvis være i form af inaktiverede hele celler; cellerne kan være sprængte.

25

Bakteriner har den fordel i forhold til levende attenuerede bakterier, at de er yderst sikre. Derfor angår opfindelsen i en foretrukken udførelsesform anvendelse af inaktiverede *Streptococcus phocae* bakterier.

- 30 Vacciner, som er beskrevet og fremstillet ifølge opfindelsen, kan fremstilles ud fra en udgangskultur ved hjælp af teknikker, der er velkendte for fagmanden. Vacciner omfatter basalt set en effektiv mængde bakterier til anvendelse ifølge

opfindelsen og en farmaceutisk acceptabel bærer. I eksempelafsnittet gives eksempler på fremstillingen ifølge opfindelsen af en vaccine.

- Benævnelsen "effektiv" som anvendt heri defineres som en mængde, der er tilstrækkelig til at inducere et immunrespons i den målsatte fisk, der resulterer i et sygdomsniveau, der er mindst det samme som 50% af sygdomsniveauet, der ses i fisk under samme forhold, men inficeret med vildtype *Streptococcus phocae*.
- 10 Generelt kan vacciner fremstillet ifølge opfindelsen, der er baseret på bakterier, indgives i en dosering på 10^3 til 10^{10} , fortrinsvis 10^6 til 10^9 , mere fortrinsvis mellem 10^8 og 10^9 bakterier. En dosis, der overstiger 10^{10} bakterier, vil på trods af, at denne er immunologisk egnet, være mindre attraktiv af økonomiske grunde. Vacciner fremstillet ifølge opfindelsen, der er baseret på levende attenuerede bakterier, kan gives i lavere doser, grundet det faktum, at bakterien vil fortsætte med at formere sig en vis tid efter administration. Vacciner fremstillet ifølge opfindelsen, der er baseret på levende attenuerede bakterier kan generelt gives i en dosis på 10^2 til 10^8 , fortrinsvis 10^3 til 10^5 bakterier.
- 20 Eksempler på farmaceutisk acceptable bærere, der er særligt egnede i en vaccine, er sterilt vand, saltopløsninger, vandige buffere, såsom PBS og lignende. Yderligere kan en vaccine omfatte andre tilsætningsstoffer, såsom adjuvanter, stabiliseringsmidler, antioxidanter og andre som beskrevet nedenfor.
- 25 Vacciner, der fremstilles som beskrevet i den foreliggende opfindelse kan i en foretrukken fremstilling også indeholde et immunstimulerende middel, en såkaldt adjuvant. Adjuvanter omfatter generelt midler, der fremmer (booster) værts immunforsvar på en ikke-specifik måde. En række forskellige adjuvanter er velkendte. Eksempler på adjuvanter, der hyppigt anvendes i fiske- og skaldyrsoopdræt er muramyldipeptider, lipopolysaccharider, forskellige glucaner og glycaner og Carbopol®. Et omfattende overblik over adjuvanter, der er egnede til fiske- og skaldyrsvacciner, gives i oversigtsartiklen af Jan Raa (Reviews in Fisheries Science 4(3): 229-288 (1996)).
- 30

Vaccinen kan også omfatte en såkaldt "vehikel". En vehikel er en forbindelse, til hvilken bakterien klæber, uden dog at være covalent bundet hertil. Sådanne vehikler er f.eks. bio-mikrokapsler, mikroalginater, liposomer og makrosoler, som alle er velkendte for fagmanden. En speciel form af sådanne vehikler, i

5 hvilke antigenet er delvist indlejret i vehiklen, er det såkaldte ISCOM (europæiske patenter EP 109.942, EP 180.564, EP 242.380).

Derudover kan vaccinerne omfatte en eller flere egnede overfladeaktive forbindelser eller emulgeringsmidler, f.eks. Span eller Tween.

10

Olieadjuvanter, der er egnede til anvendelse i vand-i-olie-emulsioner er f.eks. mineralolier eller metaboliserbare olier. Mineralolier er f.eks. Bayol[®], Marcol[®] og Drakeol[®]. Metaboliserbare olier er f.eks. vegetabiliske olier, såsom jordnøddolie eller sojabønneolie, animalske olier, såsom fiskeolierne squalan og squalen

15 og tocopheroler og disses derivater. Egnede adjuvanter er f.eks. vand/olie-emulsioner, olie/vand-emulsioner og vand/olie/vand-dobbeltemulsioner.

Særligt egnede olie/vand-emulsioner er f.eks. opnået startende fra 5-50 vægt% vandfase og 95-50 vægt% olieadjuvanter, mere foretrukket 20-50 vægt% vand-

20 fase og 80-50 vægt% olieadjuvanter.

Mængden af tilsat adjuvant afhænger af adjuvansens egenskaber, og information angående sådanne mængder vil blive tilvejebragt af fremstilleren.

25 Ofte blandes vaccinen med stabiliseringsmidler, f.eks. for at beskytte nedbrydningsfølsomme proteiner fra at blive nedbrudt, for at forlænge vaccins holdbarhed eller for at forbedre frysetørringseffektivitet. Anvendelige stabiliseringsmidler er f.eks. SPGA (Bovarnik et al; J. Bacteriology 59: 509 (1950)), carbohydrater, f.eks. sorbitol, mannitol, trehalose, stivelse, sucrose, dextran eller glucose,

30 cose, proteiner, såsom albumin eller casein eller nedbrydningsprodukter deraf og buffere, såsom alkalimetaphosphater.

Fortrinsvis fremstilles de beskrevne vacciner i en frysetørret form.

Derudover kan vaccinerne suspenderes i et fysiologisk acceptabelt fortyndingsmiddel. Det er naturligvis således, at andre måder, hvorpå man adjuverer proteiner, tilsætter vehikelforbindelser eller fortyndingsmidler, emulgeringsmidler eller stabiliseringsmidler til proteiner også falder inden for den foreliggende opfindelses udførelsesformer.

Flere administrationsveje, der alle er velkendte for fagmanden, kan anvendes. Vaccineme administreres som beskrevet fortrinsvis til fiskene via en injektion, såsom f.eks. intraperitoneal injektion, immersion, spraying, dypning eller per oralt. Det skal dog huskes, at administrationsruten også kan afhænge af vaccinetypen: hvis vaccinen omfatter levende attenuerede *Streptococcus phocae* bakterier, kunne denne let administreres ved dypning, på grund af lethedens ad denne administrationsvej. Hvis på den anden side vaccinen omfatter *Streptococcus phocae* bakterier i form af et bakterin, eller mere generelt, hvis vaccinen kan forbedres ved blanding med en adjuvans, ville den foretrukne administrationsvej være den intraperitoneale rute. Set fra et immunologisk standpunkt er intraperitoneal vaccination langt den mest effektive rute til vaccination i fisk, særligt for bakteriner, specielt idet det også tillader indarbejdelse af adjuvanter.

Administrationsprotokollen kan optimeres i overensstemmelse med standardvaccinationsudførelse. Et nyligt overblik over fiskevaccinationer, skrevet af Bowden et al., (Fisheries Research Service Marine Laboratory, Aberdeen, Skotland) er tilgængeligt fra www.intrafish.com.

Alderen på den fisk, der skal vaccineres, er ikke kritisk, selv om man klart ville ønske at vaccinere imod *Streptococcus phocae* infektion på et tidligt stadium. For mange laksefiskevacciner er det således, at de administreres, når fisken endnu ikke er i unglaksestadiet (presmolt stæge) og har en vægt på mellem 15 og 35 g. Dette er ligeledes et særdeles egnet tidspunkt til vaccination imod *Streptococcus phocae*.

Til oral administration er vaccinen fortrinsvis blandet med en egnet bærer til oral administration, f.eks. cellulose, føde eller en metaboliserbar substans, såsom α -

- cellulose eller forskellige olier af vegetabilsk eller animalsk oprindelse. En anden effektiv metode er administration af vaccinen til høje koncentrationer af levende foderorganismer, efterfulgt af fodring af fiskene med disse levende foderorganismer. Særligt foretrukne foderbærere til oral indgivelse af vaccinen
- 5 ifølge opfindelsen er levende foderorganismer, som er i stand til at indkapsle vaccinen. Egnede levende foderorganismer inkluderer plankton-lignende ikke-selektive filtreringsernærende organismer, fortrinsvis medlemmer af Rotifera, Artemia og lignende. Særligt foretrukket er saltvandsrejen *Artemia* sp.
- 10 Det ville være fordelagtigt, sammen med *Streptococcus phocae* bakterier, at anvende yderligere en eller flere andre fiskepatogene bakterier eller vira, eller antigener af sådanne bakterier eller vira til fremstilling af en vaccine, som derefter kunne være en kombinationsvaccine.
- 15 Eksempler på almindeligt kendte kommercielle vigtige fiskepatogener er *Vibrio*-arter, såsom *Vibrio ordalii*, *Vibrio anguillarum* serotype O1 og *Vibrio anguillarum* serotype O2, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnarum*, *Tenacibaculum maritimum*, *Edwardsiella*-arter såsom *Edwardsiella ictaluri* og *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela* underart *piscidida*, *Flavobacterium*
- 20 *psychrophilum*, *Piscirickettsia salmonis*, *Moritella viscosa* (tidligere kendt som *Vibrio viscosus*), *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, Infectious Pancreatic Necrotic Disease virus (IPNV), Infectious Salmon Anaemia virus (ISAV) og Salmon Pancreatic Disease virus (SPDV).
- 25 Fordelen ved sådanne kombinationsvacciner er, at de ikke blot tilvejebringer beskyttelse imod *Streptococcus phocae*, men også imod andre sygdomme. Derfor anvendes *Streptococcus phocae* bakterierne i en foretrukken udførelsesform sammen med en eller flere andre fiskepatogene bakterier eller vira, eller antigener af sådanne bakterier eller vira til fremstilling af en vaccine.
- 30 I en mere foretrukken udførelsesform er de fiskepatogene bakterier eller vira eller antigener af sådanne bakterier eller vira valgt fra gruppen af velkendte kommercielt vigtige fiskepatogener, som beskrevet kort ovenfor.

Blot som eksempel ville en kombinationsvaccine, der omfatter (ud over *Streptococcus phocae*) *Aeromonas salmonicida*-bakterier eller antigene underenheder deraf og Infectious Pancreatic Necrotic Disease virus (IPNV) som et viralt antigen, beskytte mod bylder (furunculosis), bugspytkirtelnekrose og *Streptococcus*

5 *phocae* infektion på samme tid. Andre vigtige virale antigener, som ville være egnede komponenter af en sådan kombinationsvaccine er Infectious Salmon Anaemia virus (ISAV) og Salmon Pancreatic Disease virus (SPDV) eller antigenene underenheder af disse vira.

- 10 Det virale antigen kan være hele vira eller blot underenheder af virus, såsom f.eks. VP2-proteinet fra IPN-virus. I dette tilfælde siges det virale antigen at være afledt fra den hele virus.

Et eksempel på en særlig egnet kombinationsvaccine er en vaccine, der ud

15 over *Streptococcus phocae* omfatter *Vibrio salmonicida* og *Aeromonas salmonicida* sammen med IPN-VP2. En sådan vaccine tilvejebringer beskyttelse imod vibriosis, infektiøs bugspytkirtelnekrose, furunculosis og *Streptococcus phocae* infektion.

- 20 For så vidt angår Chile, hvor de tre mest almindelige sygdomme, næst efter *Streptococcus phocae* i laksefisk er a-typisk furunculosis, *Piscirickettsia salmonis* (SRS) og infektiøs bugspytkirtelnekrose, ville en foretrukken vaccine omfatte en *Aeromonas salmonicida*-komponent, en anti-*Rickettsia*-komponent og IPN-VP2 som viralt antigen, ud over *Streptococcus phocae* vaccinekomponenten.

25

En ellers stærkt foretrukken kombinationsvaccine er en vaccine, der omfatter i det mindste to, men fortrinsvis flere af følgende komponenter: *Vibrio anguillarum* serotype O1, *Vibrio anguillarum* serotype O2, *Aeromonas salmonicida*, *Moritella viscosa*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida* og IPNV-VP2, ud over *Streptococcus phocae* komponenten.

30

En anden udførelsesform ifølge den foreliggende opfindelse angår *Streptococcus phocae* bakterier til anvendelse i en vaccine.

Endnu en udførelsesform af den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af vacciner til bekæmpelse af *Streptococcus phocae* infektion i fisk. Sådanne fremgangsmåder omfatter blanding af *Streptococcus phocae* bakterier i en levende attenueret eller inaktiveret form og en farmaceutisk acceptabel bærer.

En foretrukken form af disse udførelsesformer angår en fremgangsmåde, der yderligere omfatter blanding af en adjuvans.

10 Følgende eksempler illustrerer opfindelsen nærmere.

EKSEMPLER

Eksempel 1

15

Bestemmelse af "relationsafstand" af 77 streptokokarter og andre grampositive arter isoleret fra fisk og sæler på basis af deres biokemiske beslægtethed. Blandt de testede stammer er *Streptococcus phocae* isolater, der var isoleret fra syge laksefisk i Chile.

20

Chilenske *Streptococcus* sp.-stammer

INS/AS-kode

AS 968

25 INS 248

AS 972

AS 973

AS 970

Stamme isoleret	fra	INS/AS-kode
februar 2001	atlanterhavslaks, 1500 g	AS 960
marts 2002	atlanterhavslaks, 2000 g	AS 958

marts 2003 atlantehavslaks, 1500 g AS 959

Disse stammer var isoleret fra forskellige opdræt. Stammerne var isoleret fra forårs- og sommerudbrud i atlantehavslaks, der blev opdrættet i estuarine eller marine farvande, resulterende i høj mortalitet.

5

Typestammer opnået fra stammesamlinger

Stamme	Beskrivelse	INS/AS-kode
CCUG 35103	typestamme	AS 969
CCUG 35104	referencestamme	AS 971
CCUG 35105	referencestamme	AS 980

10 Stammer isoleret fra sæler, der lider af lungebetændelse, var fra Ida Skaar Norge (18. august 2003) beskrevet i: Skaar et al., 1994 (se ovenfor):

Stamme	Beskrivelse	INS kode
7908	P2	AS 974
8026	L2	AS 975
8056	P2	AS 976
8059	P2	AS 977
8205	H2	AS 978
8252		AS 979

Identifikation

15 Alle stammer (Chile-stammerne, *S. phocae* type- og referencestammer og yderligere ikke-deponerede stammer fra Norge) blev identificeret i 46 phenotypiske og morfologiske tests (gram-reaktion, katalase-reaktion, oxidase-reaktion, hæmolyse, vækst på 40% galdesalte, gelatinase-produktion, API (API 20 Strep test kit BioMerieux), oxidation/fermentationstest (vand & vand/olie olie), Kligler tri-

20 sukkerreaktioner (laktose, glucose, gasproduktion, H₂S-produktion), fermentation af amygdalin, galactose, glycerol, maltose, melibiose, melizitose, sucrose,

nitrat, vækst ved pH 9,6 i 6,5% salt, 3% salt tolerance, indolproduktion og motilitet).

Identifikationsprofilerne blev indarbejdet i en eksisterende datamatrix indeholdende gram-positive bakterielle fiskepatogener (*Streptococcus agalactiae*, *S. difficile*, *S. iniae*, *Carnobacterium piscicola*, *Vagococcus salmoninarum*, *Nocardia seriolae* og *Lactococcus garvieae*), såvel som referencestammer af *S. mutans*, *S. zooepidermicus* og *S. equi*, og ensartetheder blev databehandlet ved anvendelse af UPGMA-analyse. Resultaterne af denne analyse af phylogenetisk træ er vist i dendrogrammet i figur 1. Alle stammer i rækken mellem og inkluderende INS 248 og AS 958 tilhører den samme gruppe, dvs. de hører til *S. phocae* arten.

Baseret på fænotypiske og morfologiske tests er det ikke muligt at skelne mellem stammer isoleret fra Chile og stammer, der originalt er isoleret fra sæler med lungebetændelse i Norge.

Konklusion: bakteriestammerne isoleret fra atlanterhavslaks i Chile blev identificeret som den forårsagende årsag til Streptococ-sygdomme på basis af deres biokemiske slægtskab som *Streptococcus phocae*.

Eksempel 2.

Bestemmelse af phylogenetisk afstand mellem *S. phocae* stammer og andre streptokokstammer på basis af deres 16S rRNA-sekvensanalyse. En 16S rRNA-sekvensanalyse er udført på *Streptococcus phocae* typereferencestammen NCTC 12719 og to *Streptococcus phocae* isolater (AS 972 og AS 973), der var isoleret fra syge laksefisk i Chile. En sammenligning mellem *S. phocae* typestammen, de to chilenske isolater og flere medlemmer af andre streptokokarter: *S. dysgalactiae*, *S. iniae* og *S. agalactiae* blev foretaget.

16S rRNA-sekvenser blev bestemt som beskrevet af Kuhnert et al., (Int. J. Syst. Bacteriol., 46; 1174-1176 (1996)). For begge stammer blev der opnået en se-

kvens på ca. 1410 nucleotider. Disse sekvenser blev sammenlignet med tilgængelige nucleotidsekvensdatabaser ved anvendelse af BlastN software. De højst scorende sekvenser blev fremstillet ved anvendelse af Clustal X i Vector NTI-softwarepakken (Informax Inc.) med følgende indstillinger: en gap opening
 5 penalty på 15 og en gap extension penalty på 6,66, begge med parvise og multiple sammenstillinger. Til opbyggelse af træet blev nabosammenlægningsfremgangsmåden (Neighbor-Joining method) af Saitou, N. og Nei, M. anvendt. (The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425 (1987)). Positioner med huller (gaps) blev eksklude-
 10 ret fra analysen.

Det phylogenetiske træ, vist i fig. 2, indikerer slægtskabet mellem de forskellige streptokokstammer.

15 **Konklusion:** det ses hurtigt og tydeligt af fig. 2, at de chilenske isolater AS 972 og AS 973 er på samme gren som *S. phocae* typestammen. Dette er fuldt i overensstemmelse med udfaldet og konklusionerne af det phylogenetiske træ i fig. 1, som repræsenterer det biokemiske slægtskab mellem de forskellige *S. phocae* isolater fra sæler og fisk.

20

Eksempel 3

Sikkerhedsforsøg og seroomdannelse i asiatisk havaborre (*Lates calcarifer*).

25

Det blev besluttet først at teste sikkerheden og seroomdannelsen af *S. phocae* vacciner i en fiskeart, der ikke er modtagelig over *S. phocae*.

Vaccinefremstilling:

30

En råvaccine blev fremstillet ved at dyrke stammen AS 972 i 22,5 timer i SGM 5 x glucosemedie på en orbital-omryster (129 rpm) ved 32°C. Efter inkubation var det opnåede totaltællingstal $2,9 \times 10^9$ celler/ml. Kulturen blev inaktiveret med

0,5% formalin og derefter koncentreret ved centrifugering til en slutkoncentration på $1,5 \times 10^{10}$ celler/ml. Bakterieceller blev resuspenderet i kultursupernatanten.

5 Vaccinering:

I alt 56 fisk (asiatisk havaborre) blev injiceret intraperitonealt (IP) med 0,1 ml af den ovenfor nævnte vaccine, hvorimod 55 fisk blev injiceret med PBS. Den sidstnævnte gruppe var en kontrolgruppe. Gennemsnitsvægten af de vaccinerede og kontrolfiskene ved eksperimentets start var henholdsvis 19,7 og 20,1 g.

Umiddelbart efter vaccinationen observeredes ingen mortalitet. Vaccinerede og kontrolfisk blev holdt i den samme tank, adskilt ved hjælp af vertikale adskillesesnet placeret i tankens midte.

15

Sikkerhedsevaluering:

Fiskene blev overvåget i i alt 21 dage efter vaccinationen. Hverken i kontrolgruppen eller i den vaccinerede gruppe observeredes mortalitet i denne periode. Fiskenes gennemsnitsvægt ved slutningen af observationsperioden var for vaccinerede og kontrolfisk henholdsvis 25,7 og 25,0 g. Det kan konkluderes, at den fremstillede vaccine var sikker for asiatisk havaborre.

20

Patogenicitetsevaluering:

25

En belastningsmodel blev evalueret ved IP-injektion af levende *Streptococcus phocae* stammer AS 972/AS 960 (5×10^4 , 5×10^6 og 5×10^7 CFU/fisk).

Der observeredes ingen mortalitet med nogen af de bakterielle koncentrationer/stammer, der blev undersøgt: det viste sig, at havaborre ikke er følsom over for *S. phocae* infektion. Effektiviteten af vaccinerne kunne derfor ikke evalueres i asiatisk havaborre.

30

Seroomdannelse:

Som det følger direkte af tabellen i fig. 3, er den opnåede seroomdannelse tre uger efter den første vaccination med en vand-baseret vaccine allerede omkring

5 80% af seroomdannelsen, der ses tre uger efter belastning med levende *Streptococcus phocae*. Genvaccination (booster vaccination), tre uger efter den første vaccinerings, med en vandbaseret vaccine gav det samme titer som efter første belastning. Genvaccination tre uger efter første vaccination med en vand/olie-emulsionsbaseret vaccine gav et lidt lavere titer end den første vaccination derimod efter belastning. Dette er en normal effekt, der ses generelt med

10 vand/olie-emulsionsbaserede vacciner; effekten af genvaccinerings vil blive observeret efter en længere tidsperiode sammenlignet med vandbaserede vacciner.

15 Seroomdannelse blev bestemt som følger:

Streptococcus phocae blev overfladebelagt natten over på NUNC Maxisorb ved 10^7 bakterier/brønd. ELISA blev udviklet ved anvendelse af monoklonale antistoffer fra mus rettet imod den lette kæde af europæisk havaborre IgM (der er

20 kryds-reaktiv med asiatisk havaborre IgM), efterfulgt af inkubation med peroxidasekonjugeret gede-anti-mus-antistoffer. Titre udtrykkes som OD₄₅₀-målinger.

Konklusion: selv en enkelt vaccination er allerede i stand til at inducere antistof-titer, der er tæt på dem, der findes i belastede fisk, hvorimod en genvaccination giver et antistof-titer, der er det samme som dem, der findes i belastede

25 fisk.

Eksempel 4

30 **Sikkerhedsforsøg og seroomdannelse i atlantehavslaks.**

Vaccinefremstilling:

Vacciner blev fremstillet som beskrevet i eksempel 3.

Vaccination:

- 5 I alt 250 fisk (atlanterhavslaks) blev injiceret intraperitonealt (IP) med 0,1 ml af ovenfor nævnte vaccine, hvorimod 130 fisk blev injiceret med PBS. Sidstnævnte gruppe var en kontrolgruppe. Gennemsnitsvægten af de vaccinerede og kontrolfiskene var ved forsøgets start 28 g.
- 10 Umiddelbart efter vaccinationen observeredes ingen mortalitet. Vaccinerede og kontrolfisk blev afmærket ved hjælp af Panjet-afmærkning og holdt i den samme tank.

Sikkerhedsevaluering:

15

Fiskene blev observeret i totalt 42 dage efter vaccinationen. Der observeredes ingen mortalitet, hverken hos kontrolgruppen eller den vaccinerede gruppe under denne periode. Der blev heller ikke observeret nogen abnormal adfærd. Det kan konkluderes, at vaccinen er sikker for atlanterhavslaks.

20

Belastningen vil udføres med $1,5 \times 10^9$ CFU levende *Streptococcus phocae*/fisk.

Seroomdannelse:

25

Formalininaktiverede *Streptococcus phocae* stamme INS 972 bakterier blev fortyndet i overfladebehandlingsbuffer til 10^7 bakterier/ml. Efterfølgende blev 0,1 ml tilsat individuelle brønde på 96 brønds NUNC Maxisorb-plader, inkuberet natten over ved 2-8°C og vasket tre gange. Brøndene blev derefter inkuberet med serielle fortyndinger af lakseserum. Efterfølgende blev de bundne antistoffer kvantificeret ved anvendelse af kanin-antilaks, HR-peroxidase-konjugeret gede-anti-kanin-IgG og peroxidasesubstrat. Titer udtrykkes som OD₄₉₂-målinger.

30

Som det ses direkte fra figur 4, giver vaccination med en vand-baseret vaccine et relativt forøget titer på 500% efter seks uger, hvorimod en vand/olie-emulsionsbaseret vaccine giver en relativ forøgelse i titer på 200%.

5

Konklusion: en enkelt vaccination med en vandbaseret vaccine var i stand til at forøge antistofniveauerne med ca. 500% sammenlignet med den saltopløsningsinjicerede kontrolgruppe, 6 uger efter vaccination. Når en vand/olie-emulsions-baseret vaccine anvendes i samme vaccinationsregime, observeres en forsinket igangsættelse, der resulterer i en forøgelse af antistofniveauer med ca. 200% sammenlignet med den saltopløsningsinjicerede kontrolgruppe.

10

Figurtekster:

15 Figur 1: phylogenetisk træ af 77 arter af streptokokker og andre gram-positive arter isoleret fra fisk og sæler på basis af deres biokemiske beslægtethed.

Figur 2: phylogenetisk træ af *S. phocae* stammer (referencestammen NCTC 12719 og to chilenske *Streptococcus phocae* isolater fra fisk) og andre streptokokstammer på basis af 16S rRNA-sekvensanalyse.

20

Figur 3: ELISA-bestemmelse af vaccination/belastning af *S. phocae* i havaborre.

25 Figur 4: ELISA-bestemmelse af vaccination/belastning af *S. phocae* i atlantehavslaks.

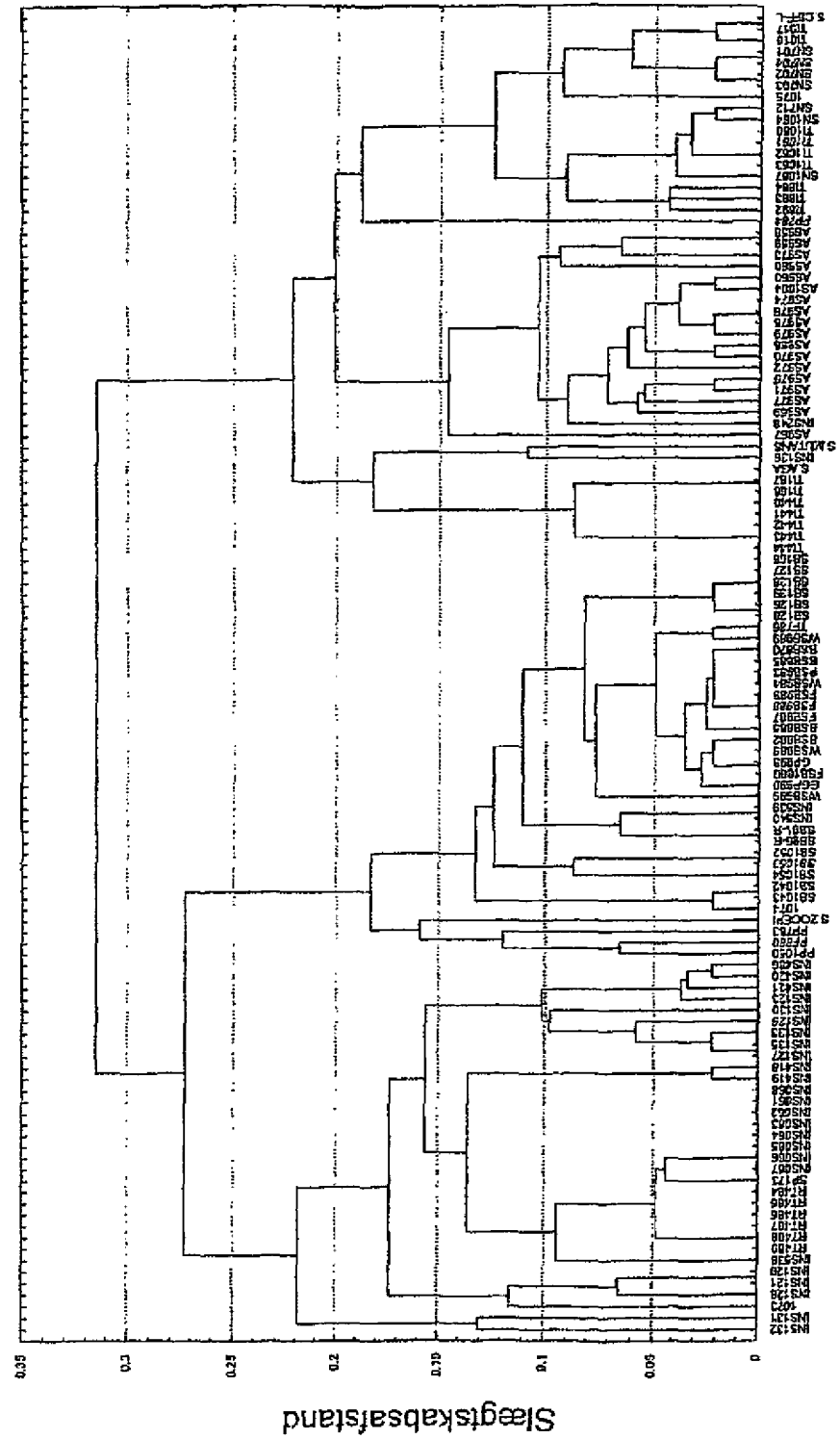
Patentkrav

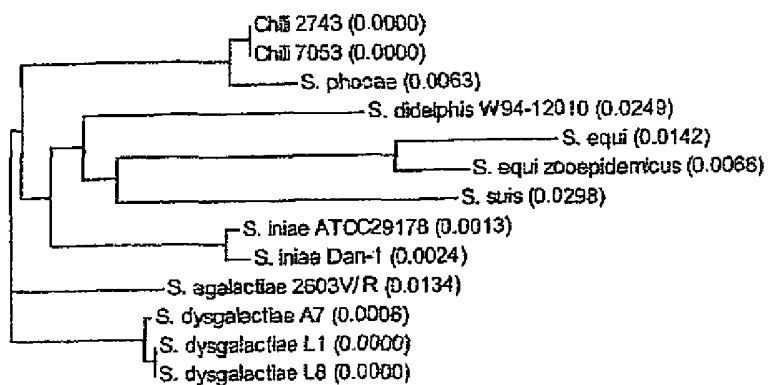
1. Anvendelse af bakterier af arten *Streptococcus phocae* til fremstilling af en vaccine til bekæmpelse af *Streptococcus phocae* infektion i fisk.
5
2. Anvendelse ifølge krav 1, **kendetegnet ved**, at fisken hører til laksefiskefamilien.
3. Anvendelse ifølge krav 2, **kendetegnet ved**, at fiskene er atlanterhavslaks.
10
4. Anvendelse ifølge krav 1-3, **kendetegnet ved**, at bakterierne af arten *Streptococcus phocae* er i en inaktiveret form.
5. Anvendelse ifølge krav 1-4, **kendetegnet ved**, at en yderligere fiskepatogen mikroorganisme eller et virus eller antigen deraf anvendes til fremstillingen af vaccinen.
15
6. Anvendelse ifølge krav 5, **kendetegnet ved**, at nævnte yderligere fiskepatogene mikroorganisme eller virus er valgt fra gruppen *Vibrio ordalii*, *Vibrio anguillarum* serotype O1, *Vibrio anguillarum* serotype O2, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnarae*, *Flexibacter maritimum*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela* underart *salmonis*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, Infectious Pancreatic Necrotic Disease virus, Infectious Salmon Anaemia virus og Salmon Pancreatic Disease virus.
20
7. Anvendelse ifølge krav 1-6, **kendetegnet ved**, at der yderligere anvendes en adjuvans til fremstillingen af vaccinen.
25
8. Anvendelse ifølge krav 1-7, **kendetegnet ved**, at nævnte vaccine er i en frysetørret form.
30
9. Bakterier af arten *Streptococcus phocae* til anvendelse i en vaccine.

10. Fremgangsmåde til fremstilling af en vaccine til at bekæmpe Streptococcus phocae infektion, hvor nævnte fremgangsmåde omfatter blanding af Streptococcus phocae bakterier i en levende attenueret eller inaktiveret form og en farmaceutisk acceptabel bærer.

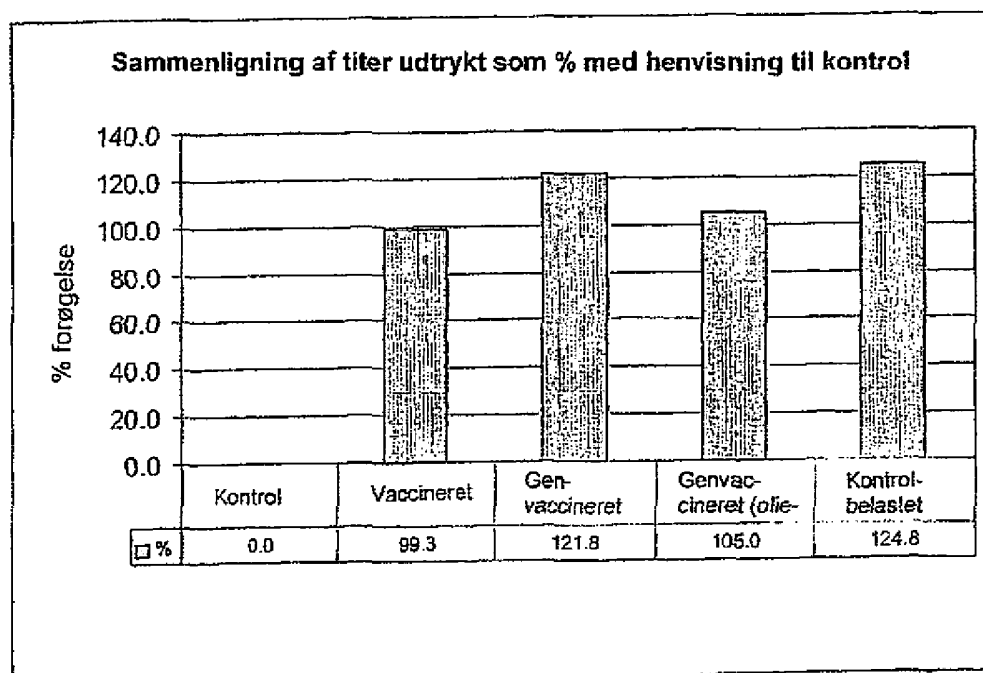
Uafvejjet par-gruppe
gennemsnitlig procentvis uoverensstemmelse

Figur 1

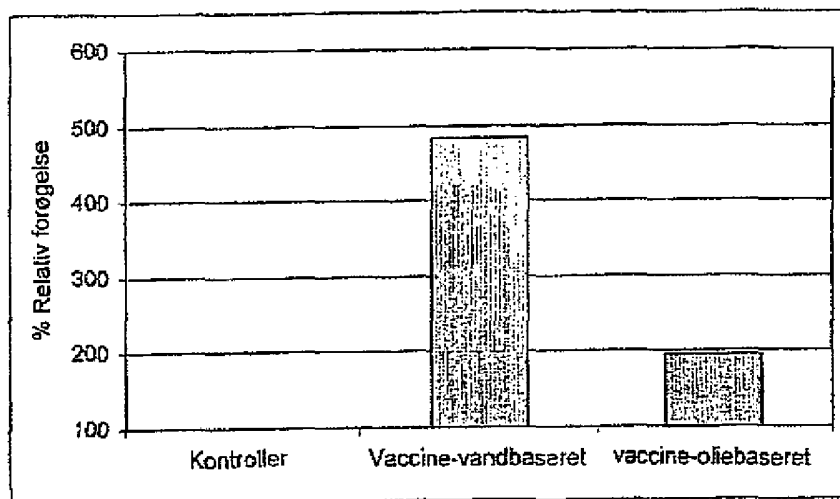




Figur 2



Figur 3



Figur 4