



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712804-5 A2**

(22) Data de Depósito: 29/05/2007
(43) Data da Publicação: 23/10/2012
(RPI 2181)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/09

(54) Título: USO DE UMA BACTÉRIA DO GÊNERO STREPTOCOCCUS

(30) Prioridade Unionista: 30/05/2006 EP 06114710.4,
30/05/2006 US 60/809660

(73) Titular(es): Intervet International B.V.

(72) Inventor(es): Chow Yong NG, Luc Grisez

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007055167 de
29/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/138036de
06/12/2007

(57) Resumo: USO DE UMA BACTÉRIA DO GÊNERO STREPTOCOCCUS. A presente invenção diz respeito ao uso de bactérias do gênero Streptococcus para a fabricação de uma vacina para combater infecção de organismo tipo Rickettsia.

“USO DE UMA BACTÉRIA DO GÊNERO *STREPTOCOCCUS*”

A presente invenção diz respeito ao uso de bactérias do gênero *Streptococcus* para a fabricação de uma vacina para combater infecção de organismo tipo *Rickettsia*.

5 Infecção de diversos peixes salmonídeos e não salmonídeos com organismo tipo *Rickettsia/Rickettsia* foi reportada por décadas, o primeiro relato datando de 1939, quando um organismo tipo *Rickettsia* foi encontrado em *Tetrodon fahaka* do rio Nilo. Entretanto, demorou até 1975 antes que uma primeira observação da presença de um organismo tipo
10 *Rickettsia* em células de tecido corado fosse feita pela Ozel M. and Schwanz-Pfizer, I., (Zentralblatt für Bacteriologie, Microbiologie and Hygiene, I abt Originale A 1975; 230: 1-14 (1975)).

A importância real de *Piscirickettsia salmonis* como um patógeno tornou-se dramaticamente clara em 1989, quando, no Chile, salmão
15 Coho com valor de mercado de 1,5 milhão morreu de um agente infeccioso até então desconhecido. (Bravo, S. e Campos, M. FHS/AFS Newsletter 17:3 (1989), Cvitanich *et al.*, FHS/AFS Newsletter 18:1-2 (1990), Fryer *et al.*, Fish Pathol. 25: 107-1114 (1990)). Observou-se que este agente infeccioso desconhecido é *Piscirickettsia salmonis*.

20 Infecção por *Piscirickettsia salmonis* de corvinata branca foi recentemente mostrado por Arkush, K.D. *et al.*, em Diseases of Aquatic Organisms 64: 107-119 (2005).

Vacina contra organismos tipo *Rickettsia*, também referida adicionalmente como RLOs, foi agora descrita *i.a.* em Tilápia (Chem, R.S. and Chao, C.B., Fish Pathology 29: 61-71 (1994), Chen, S.C. *et al.*, J. Fish Diseases 17: 591-599 (1994), Mauel *et al.*, Diseases of aquatic organisms, 53: 249-255 (2003), Fryer, J.L and Mauel, M.J., Emerging Infectious Diseases 3: 137-144 (1997)), grouper, (Chen, S.C. *et al.*, J. Fish Dis. 23: 415-418 (2000)), blue-eyed plecostomus (Khoo, L. *et al.*, J. Fish Diseases 18:35-48 (1995)) and

Sea bass (Comps, M. *et al.*, Bull. Europ. Ass. Fish Pathol. 16, 30-33 (1996)). Estas espécies são peixes tropicais ou mediterrâneos. Recentemente, RLOs mostraram infectar igualmente espécies atlânticas. Nylund *et al.* observaram que RLOs causam mortalidade em bacalhau norueguês.

5 As diferenças entre a *Rickettsia* real, isto é, *Piscirickettsia salmonis*, descritas por Fryer, J.L *et al.*, (Int. J. Syst. Bacteriol 42: 120-126 (1992)), e a vacina contra organismos tipo *Rickettsia* tal como a Tilápia-RLO descrita uma década atrás por Chern (ver anteriormente) foram bastante explicadas. Nesta revisão, Mauel e Miller uma vez mais descrevem as
10 diferenças (Veterinary Microbiology 87: 279-289 (2002)).

 A despeito dos esforços até então, não existe nenhuma vacina baseada em *Rickettsia* ou RLO realmente eficaz contra *Rickettsia* ou RLO. As vacinas atualmente em uso são experimentais, e elas compartilham uma característica comum que elas oferecem apenas uma proteção moderada.
15 Além do mais, seu nível de proteção é inconsistente (Mauel & Miller, ver acima).

 Apenas dois pedidos de patente, WO 01/68865 e CA 2.281.913, relacionados a vacinas *Piscirickettsia salmonis* foram publicados. Eles reivindicam diversas vacinas de subunidade *Piscirickettsia*. Uma
20 experiência no campo com uma vacina na base de uma bacterina de *Piscirickettsia salmonis*, em salmão Coho foi descrita por Smith *et al.*, (Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 15(4): 137-141 (1995)). até então, entretanto, resultados com bacterinas de *Piscirickettsia salmonis* foram variáveis, não muito consistentes e freqüentemente abaixo dos padrões aceitáveis de proteção de
25 vacina.

 Estes problemas são refletidos pelo fato de que atualmente nenhuma vacina baseada em *Rickettsia*- ou RLO contra *Rickettsia* ou vacina contra organismos tipo *Rickettsia* comercial completamente efetiva está no mercado.

Atualmente, tratamento com antibióticos, especificamente quinolonas, é o tratamento apenas contra infecção de RLO. Até então, a maioria do uso de antibióticos é terapêutico. Tratamento profilático *i.a.* inclui injeção i.p. de estoque de reprodutores antes da desova, e incorporação de antibióticos na água durante endurecimento dos ovos.

O uso de antibióticos não é entretanto o método preferido de um ponto de vista ecológico, se ao menos em virtude do fato de que a resistência contra vários antibióticos ter sido reportada.

É claro que realmente existe uma necessidade de vacinas RLO inéditas, mais eficazes.

É um objetivo da presente invenção fornecer tais vacinas.

Atualmente, observa-se surpreendentemente que bactérias do gênero *Streptococcus*, isto é, bactérias não RLO Gram-positivas, podem fornecer um alto nível de proteção duradouro contra infecção de RLO. Esta proteção é conferida por bactérias *Streptococcal* quando dadas como uma bacterina e/ou quando dadas em uma forma atenuada viva.

O mecanismo funcional por trás desta observação inesperada é atualmente desconhecido. Considera-se, entretanto, que um componente presente ou anexado na superfície celular e comum a todas as bactérias *Streptococcal* é um estimulador potente de imunidade específica cruzada em peixe contra RLO. Específico cruzado a este respeito significa não induzido por RLO, mas fornecendo no entanto proteção contra RLO.

Assim, a invenção diz respeito ao uso de uma bactéria do gênero *Streptococcus* para a fabricação de uma vacina para combater infecção de RLO.

Para a fabricação de uma vacina como essa, o estado da bactéria; viva ou inativada, não é realmente importante. O que é importante é o fato de que o estimulador de imunidade específica cruzada em peixe contra RLO está ainda presente. Isto pode ser assegurado usando preparações

bacterianas totais. Como dito anteriormente, não é importante se a bactéria na preparação está viva, morta ou mesmo fragmentada (por exemplo, pressionando-a através de um French Press). O que é importante, é que os componentes que constituem a bactéria estão ainda presentes na vacina.

5 Bactérias vivas atenuadas são muito adequadas, em virtude de elas por definição carregarem o fator estimulante da imunidade específica cruzada contra RLO. E bactérias vivas atenuadas têm a vantagem sobre bacterinas, de que elas podem facilmente ser dadas sem um adjuvante. Entretanto elas se auto-replicam até o ponto em que elas sejam interrompidas
10 pelo sistema imune, em decorrência do que um menor número de células pode ser dado.

Portanto, em uma forma preferida, a invenção diz respeito ao uso de bactérias *Streptococcal* atenuadas vivas para a fabricação de uma vacina para combater *infecção de organismo tipo Rickettsia* de acordo com a
15 invenção.

Por um outro lado, o fator estimulante da imunidade específica cruzada contra RLO está também presente nas bactérias quando estas bactérias são na forma de uma bacterina. Bacterinas têm a vantagem sobre bactérias vivas atenuadas de que elas são muito seguras. Portanto, em uma
20 outra forma preferida, a invenção diz respeito ao uso de uma bacterina *Streptococcal* para a fabricação de uma vacina para combater infecção de organismo tipo *Rickettsia* de acordo com a invenção.

O gênero *Streptococcus* compreende *i.a.* *Streptococcus iniae*, *Streptococcus difficile* e *Streptococcus agalactiae*.

25 Vacinas para uso, de acordo com a invenção podem ser preparadas começando de uma cultura bacteriana de acordo com técnicas bem conhecidas pelos versados na tecnologia.

Review artigos relacionados a vacinas de peixe e sua fabricação são *i.a.* por Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E. and Frost, P.

em *Expert Review of Vaccines* 4: 89-101 (2005), por Buchmann, K., Lindenstrom, T. and Bresciani, em *J. Acta Parasitologica* 46: 71-81 (2001), por Vinitnantharat, S., Gravningen, K. and Greger, E. em *Advances in veterinary medicine* 41: 539-550 (1999) e por Anderson, D.P. em *5 Developments in Biological Standardization* 90: 257-265 (1997).

Uma bactéria viva atenuada é uma bactéria que é menos patogênica do que sua contraparte tipo selvagem, embora induzindo ainda uma resposta imune eficaz. Cepas atenuadas podem ser obtidas ao longo de vias clássicas, há muito conhecidas na tecnologia tal como mutagênese química, radiação UV e similares, ou por mutagênese de sítio dirigido.

Uma bacterina é definida aqui como bactérias em um forma inativada. O método usado para inativação parece não ser relevante para a atividade da bacterina. Métodos clássicos para a inativação tal como tratamento térmico, tratamento com formalina, etileno imina binário, timerossal e similares, todos bem conhecidos na tecnologia, são igualmente aplicáveis. Inativação de bactérias por meio de tensão física, usando por exemplo, um French Press fornece um material de partida igualmente adequado para a fabricação de uma vacina de acordo com a invenção.

Vacinas de acordo com a invenção basicamente compreendem uma quantidade efetiva de uma bactéria para uso de acordo com a invenção e um carreador farmacologicamente aceitável. O termo "efetivo" da maneira aqui usada é definido como a quantidade suficiente para induzir um resposta imune no peixe alvejado.

A quantidade de células administrada dependerá das espécies *Streptococcus* usadas, da presença de um adjuvante, da via de administração, do momento da administração, da idade do peixe a ser vacinado, da saúde geral, da temperatura da água e da dieta. No início do uso das vacinas comercialmente disponíveis, o fabricante fornecerá sua informação.

De outra forma, versados na tecnologia encontram uma diretriz

suficiente nas referências supramencionadas e na informação dada a seguir, especialmente nos exemplos.

No geral, vacinas para o uso de acordo com a invenção que são baseadas em bacterinas podem ser dadas em geral em uma dosagem de 10^3 a 10^{10} , preferivelmente 10^6 a 10^9 , mais preferivelmente entre 10^8 e 10^9 bactérias. Uma dose excedente de 10^{10} bactérias, embora imunologicamente adequada, será menos atrativa por razões comerciais. Vacinas de acordo com a invenção que são baseadas em bactérias vivas atenuadas podem ser dadas em uma dose menor, em virtude do fato de que as bactérias continuarão replicando por um certo tempo após a administração.

Exemplos de carreadores farmacologicamente aceitáveis que são adequados para o uso em uma vacina para o uso de acordo com a invenção, são água estéril, salina, tampões aquosos tal como PBS e similares. Além do mais, uma vacina de acordo com a invenção pode compreender outros aditivos tais como adjuvantes, estabilizantes, antioxidantes e outros, da maneira descrita a seguir.

Vacinas para o uso de acordo com o presente invenção, especialmente as vacinas compreendendo uma bacterina, podem em uma apresentação preferida também conter uma substância imunoestimuladora, um assim chamado adjuvante. Adjuvantes em geral compreendem substâncias que estimula a resposta imune do hospedeiro de uma maneira não específica. Inúmeros adjuvantes diferentes são conhecidos na tecnologia. Exemplos de adjuvantes freqüentemente usados na fazenda de peixe e marisco são muramildipeptídeos, lipopolissacarídeos, diversos glucanos e glicanos e Carbopol^(R). Um visão geral extensiva de adjuvantes adequados para vacinas de peixe e marisco é dado na revisão de trabalho por Jan Raa (Reviews in Fisheries Science 4(3): 229-288 (1996)).

A vacina pode também compreender um assim chamado "veículo". Um veículo é um composto ao qual a bactéria adere, sem estar

covalentemente ligado a ela. Tais veículos são *i.a.* biomicrocápsulas, microalginatos, lipossomos e macrossóis, todos conhecidos na tecnologia.

Uma forma especial de um veículo como esse, em que o antígeno é parcialmente incorporado no veículo, é o assim chamado ISCOM (patentes europeias EP 109.942, EP 180.564, EP 242.380).

Além do mais, a vacina pode compreender um ou mais compostos ativos de superfície adequada ou emulsificantes, por exemplo, Span ou Tween.

Adjuvantes de óleo adequados para o uso em emulsões água em óleo são por exemplo, óleos minerais ou óleos metabolizáveis. Óleos minerais são por exemplo, Bayol[®], Marcol[®] e Drakeol[®].

Um exemplo de um adjuvante de óleo não mineral é por exemplo, Montanide-ISA-763-A.

Óleos metabolizáveis são por exemplo, óleos vegetais, tal como óleo de amendoim e óleo de soja, óleos animais tais como os óleos de peixe esqualano e esqualeno, e tocoperol e seus derivados.

Adjuvantes adequados são por exemplo, emulsões p/o, emulsões duplas o/p e p/o/p. Emulsões muito adequadas p/o são por exemplo, obtidas começando da fase aquosa 5-50% p/p e adjuvante de óleo 95-50% p/p, mais preferivelmente fase aquosa 20-50% p/p e adjuvante de óleo 80-50% p/p.

Um exemplo de um adjuvante nano partícula a base de água é por exemplo, Montanide-IMS-2212.

A quantidade de adjuvante adicionada depende da natureza do adjuvante em si, e informação com relação a tais quantidades será fornecida pelo fabricante.

Freqüentemente, a vacina é misturada com estabilizantes, por exemplo, para impedir que proteínas propensas a degradação se degradarem, para aumentar a vida em prateleira da vacina, ou para melhorar a eficiência da

5 liofilização. Estabilizantes usados são *i.a.* SPGA (Bovamik et al; J. Bacteriology 59: 509 (1950)), carboidratos, por exemplo, sorbitol, manitol, trealose, amido, sacarose, dextrano ou glicose, proteínas tais como albuminas ou caseína ou produtos de degradação destes, e tampões, tais como fosfatos de metal alcalino.

Além do mais, a vacina pode ser suspensa em um diluente fisiologicamente aceitável. Não precisa dizer, que outros meios de adjuvar, adicionar compostos do veículo ou diluentes, emulsificar ou estabilizar uma proteína são também concebidos na presente invenção.

10 Muitos meios de administração, todos conhecidos na tecnologia podem ser aplicados. As vacinas de acordo com a invenção são preferivelmente administradas aos peixes por meio de injeção, imersão, mergulho ou por via oral. Deve-se ter em mente, entretanto, que a via de administração depende altamente da maneira que a vacina *Streptococcal* para
15 o uso de acordo com a invenção é normalmente dada.

Meramente como um exemplo, se a bactéria *Streptococcus* atualmente usada para a fabricação de uma vacina para combater infecção de RLO for, por exemplo, uma bactéria viva atenuada, a vacina pode ser administrada *i.a.* por vacinação por imersão ou banho, em virtude da fácil
20 administração. Tais vacinas são freqüentemente aplicadas por vacinação por imersão.

Se por um outro lado a bactéria *Streptococcus* atualmente usada para a fabricação de uma vacina para combater infecção de RLO é na forma de uma bacterina, aplicação oral e por exemplo, aplicação
25 intraperitonal são meios atrativos de administração.

No geral: se a vacina pode ser melhorada misturando um adjuvante, o meio de administração seria preferivelmente a via intraperitonal. De um ponto de vista imunológico, a vacinação intraperitonal com uma bacterina é uma via de vacinação muito efetiva, especialmente em virtude de

ela permitir a incorporação de adjuvantes.

O protocolo de administração pode ser otimizado de acordo com prática de vacinação padrão. Versados na tecnologia saberiam como fazer isto, ou encontrariam uma diretriz nos trabalhos supramencionados.

5 A idade do peixe a ser vacinado não é crítica, embora claramente possa-se querer vacinar contra o RLO em um estágio mais cedo possível, isto é, antes da exposição possível ao patógeno.

10 Para as vacinas baseadas nas bactérias *Streptococcal* descritas anteriormente, no geral, estas seriam administradas no momento em que elas são normalmente administradas a fim de proteger contra infecção *Streptococcal*. A partir desse momento, o peixe seria então adicionalmente protegido contra o RLO.

15 A vacinação por imersão seria a vacinação de escolha especialmente quando o peixe é ainda pequeno, por exemplo, entre 2 e 5 gramas. Peixe de 5 gramas ou mais pode também ser vacinado por meio de injeção.

20 Para administração oral a vacina é preferivelmente misturada com um carreador adequado para administração oral isto é, celulose, alimento ou uma substância metabolizável tais como alfa-celulose ou óleos diferentes de origem vegetal ou animal. Um método também atrativo é a administração da vacina em altas concentrações de organismos de alimento vivo, seguido por alimentação dos organismos de alimento vivo para o peixe. Particularmente, carreadores preferidos de alimento para distribuição oral da vacina de acordo com a invenção são organismos de alimento vivo que podem
25 encapsular a vacina.

Preferivelmente, a bactéria *Streptococcal* para o uso de acordo com a invenção, é das espécies *Streptococcus iniae*, *agalactiae* ou *difficile*.

Mais preferivelmente, a bactéria para o uso de acordo com a invenção é da espécie *Streptococcus difficile*.

Em geral, as vacinas para o uso de acordo com a invenção seriam preferivelmente vacinas que protegem contra RLO e adicionalmente contra mais do que um microorganismo patogênico de não RLO. Seria benéfico usar, após as bactérias *Streptococcal* para a fabricação da vacina, também pelo menos um outro microorganismo patogênico de peixe ou vírus, um antígeno de tal microorganismo ou vírus ou material genético que codifica um antígeno como esse, em uma vacina de combinação.

A vantagem de uma vacina como essa é que ela não fornece apenas proteção contra RLO e contra infecção *de Streptococcal*, mas também contra outras doenças.

Portanto, uma forma preferida desta modalidade diz respeito a uma vacina, cuja vacina compreende pelo menos um outro microorganismo ou vírus que é patogênico para o peixe, ou um outro antígeno ou material genético que codifica o outro dito antígeno, em que o outro dito antígeno ou material genético é derivado de um vírus ou microorganismo patogênico ao peixe.

Exemplos de patógenos de peixe comercialmente importantes em peixe tropical e/ou mediterrâneo são subespécies *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela piscicidae*, *Tenacibaculum maritimum*, *Flavobacterium sp.*, *Flexibacter sp.*, *Lactococcus garvieae*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, Vírus de necrose viral, iridovírus e herpesvírus Koi.

Exemplos de patógenos de peixe de água fria comercialmente importante são *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicidae*, *Vibrio salmonicidae*, *Moritella viscosa*, *Vibrio ordalii* *Flavobacterium sp.*, *Flexibacter sp.*, *Streptococcus sp.*, *Lactococcus garvieae*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, *Piscirickettsia salmonis*, vírus da doença pancreática do salmão, vírus da doença do sono, vírus de necrose nervosa viral, vírus de necrose pancreática infeccioso e iridovírus.

Parasitas que infectam os salmonídeos são *i.a. Lepeophtherius*

salmonis, *Caligus elongatus*, *Cryptobia salmositica*, *Myxobolus cerebralis* e *Kudoa thyrsites*. Um parasita que infecta peixe de água fresca é, por exemplo, *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitas de Tilápia são por exemplo, *Dactylogyrus spp.* e *Trichodina spp.* Peixe marinho pode sofrer i.a do parasita

5 *Benedenia seriolae*

Assim, em uma forma mais preferida desta modalidade, o outro microorganismo ou vírus é selecionado do grupo seguinte de patógenos de peixe: *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* subespécies *piscicidae*, *Tenacibaculum maritimum*, *Flavobacterium sp.*, *Flexibacter sp.*,
 10 *Lactococcus garvieae*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, Vírus de necrose viral, iridovírus e Herpesvírus Koi, *Aeromonas salmonicidae*, *Vibrio salmonicidae*, *Moritella viscosa*, *Vibrio ordalii*, *Piscirickettsia salmonis*, vírus de doença pancreática do Salmão, vírus da doença do Sono, vírus da necrose nervosa viral, vírus da Necrose Pancreática Infecciosa, iridovírus, *Lepeophtherius*
 15 *salmonis*, *Caligus elongatus*, *Cryptobia salmositica*, *Myxobolus cerebralis*, *Kudoa thyrsites*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Dactylogyrus spp.*, *Trichodina spp.* e *Benedenia seriolae*.

Os Exemplos dados a seguir fornecem ampla diretriz de qual uso das bactérias do gênero *Streptococcus* para a fabricação de uma vacina
 20 para combater infecção de organismo tipo *Rickettsia*.

Exemplos.

Exemplo 1:

Neste Exemplo, uma comparação é dada entre a eficácia de vacinas baseadas em RLO, vacinas baseadas em *Streptococcus* e uma vacina
 25 Gram-negativa não *Streptococcal*

Vacinas:

1) vacinas baseadas em RLO

Uma cepa de RLO originalmente isolada da tilápia doente, cultivada em sinais de doença RLO típicos mostrados na Indonésia foi usada

tanto como cepa de vacina quanto como cepa de desafio. Esta cepa foi subcultivada em Ágar de chocolate e subseqüentemente inoculada e crescida em um caldo líquido em um misturador orbital a 26°C - 150 RPM. Após aproximadamente 24 horas de incubação, a cultura atingiu um OD_{660nm} de 0,674 e foi inativada pela adição de 0,5% de formalina e transferida para um novo vaso. A quantidade total de células bacterianas na cultura inativada foi 3,7 x 10⁹ células/mL. Sessenta mL de cultura inativada por toda a noite foram centrifugados a 3.000 RPM por 30 minutos a 4°C e o precipitado foi re-suspenso em 20 mL de sobrenadante resultando em um concentração celular efetiva de 1,11 x 10¹⁰ células por mL. Este antígeno foi usado para a preparação da vacina.

2) Vacinas baseadas em *Vibrio anguillarum*

As vacinas *V. anguillarum* foram preparadas começando de uma cepa *V. anguillarum* serotipo 02 A. Métodos de crescimento *V. anguillarum* padrões foram aplicados. Vacinas compreendendo 2,4 x 10⁹ e 1,0 x 10¹⁰ células foram preparadas.

3) Vacinas baseadas em *Streptococcus iniae*/*S. difficile*

A cultura *S. iniae* e a cultura *S. difficile* foram misturadas com tampão padrão e levaram a uma contagem total de 5 x 10⁹ células por mL cada. Duas vacinas separadas foram preparadas de cada mistura inicial, a vacina a base de água foi derivada das misturas anteriores diluindo-a com 1,0 x 10¹⁰ células por mL com tampão padrão, enquanto uma vacina com adjuvante de óleo foi preparada com uma concentração celular final de 2,4 x 10⁹ células por mL de vacina. Uma visão geral das vacinas usadas é apresentada na Tabela 1.

Cepa de desafio

O RLO usado para desafio cresceu da maneira descrita sob a preparação de material de desafio.

Escala de vacinação e desafio

A vacinação foi feita por injeção de tilápia IP com 0,1 mL das vacinas respectivas (Ver tabela 1). Os peixe foram mantidos por 3 semanas após a vacinação e subseqüentemente desafiados com uma cultura de RLO viável. Os peixe desafiados foram mantidos separados e a mortalidade foi acompanhada por um período de 1 semana pós o desafio. A eficácia foi avaliada por expressão da sobrevivência percentual relativa de peixe vacinado comparada com os controles.

Tabela 1: Composição da vacina com relação ao número de células e presença de adjuvante.

<i>Vacina</i>	<i>Antígeno - células/mL</i>	<i>Adjuvante</i>
210205-2	<i>S. iniae</i> $1,2 \times 10^8$ / <i>S. difficile</i> $1,2 \times 10^9$	emulsão p/o
210205-5	<i>S. iniae</i> $5,0 \times 10^9$ / <i>S. difficile</i> $5,0 \times 10^9$	-
210205-3	RLO $2,4 \times 10^9$	emulsão p/o
210205-6	RLO $1,0 \times 10^{10}$	-
210205-1	<i>V. anguillarum</i> 02 / $2,4 \times 10^9$	emulsão p/o
210205-4	<i>V. anguillarum</i> 02 / $1,0 \times 10^{10}$	-
Controle	PBS	emulsão p/o
Controle	PBS	-

10 Preparação de material de desafio

Um frasco de estoque de glicerol de semente de RLO foi congelado e inoculado em Ágar de chocolate e incubado a 26°C por 24 horas. O que cresceu das placas foi coletado e inoculado como crescimento sólido em 100 mL de caldo líquido e incubado em um misturador orbital (150 RPM) a 26°C. Após aproximadamente 24 horas de crescimento, a pureza da cultura foi checada e o OD₆₆₀ foi medido. Foi preparada uma suspensão de desafio correspondente a OD₆₆₀ = 0,250/10 com salina estéril 0,9% (p/v). Esta suspensão foi usada diretamente para desafio. A pureza da suspensão de desafio foi avaliada riscando uma porção da suspensão de desafio em Ágar de chocolate e incubação subseqüente a 26°C.

20 Desafio

Grupos de aproximadamente 15 peixes foram retirados dos tanques e injetados com a suspensão de desafio da maneira descrita anteriormente. Os peixes foram desafiados por IP por injeção com 0,1 mL da

suspensão. O mesmo procedimento foi seguido por todos os grupos. Após o desafio os peixes foram transferidos para tanques diferentes e mantidos para observação e a ocorrência de mortalidade.

Observações de mortalidade

5 Após o desafio, os peixes foram checados duas vezes
diariamente e os peixes mortos foram removidos do tanque, peso e
comprimento foram registrados e os órgãos internos, notavelmente rim e baço
foram avaliados pela presença de granulomas típicos. A partir de um número
representativo de peixe, amostras de baço foram plaqueadas em Ágar de
10 chocolate para confirmar a presença do organismo de desafio e verificar dessa
forma a causa da mortalidade.

RESULTADOS

Mortalidade após o desafio

15 A mortalidade iniciou em todos os grupos desafiados no dia 2
após o desafio e aumentou rapidamente na maioria dos grupos. Todos os
peixes que morreram durante os primeiros 3 dias apresentaram acúmulo de
fluido na cavidade corporal e liquefação generalizada dos órgãos internos.
Entretanto, até o fim do período de observação, os mesmos peixes mostraram
os sinais de doença típicos associados com infecções de RLO da maneira vista
20 no campo, isto é, formação de granuloma no rim e baço.

 Durante a observação da mortalidade no dia 3 após o desafio é
aparente que uma distinção pode ser feita entre a maioria das vacinas a base
de água e os controles comparado com todas as vacinas baseadas em óleo.
Vacinas com adjuvante de óleo apresentam uma mortalidade atrasada
25 comparado com as vacinas a base de água, entretanto, bactérias sem óleo PBS
não mostram esta mortalidade atrasada.

 A mortalidade observada por grupo foi usada para o cálculo de
valores de RPS. Uma visão geral dos valores de RPS, da maneira expressa
contra o grupo de controle de PBS é dada na Figura 1. Os resultados mostram

que:

a) surpreendentemente, uma vacina contendo antígenos *Streptococcal* pode proteger os peixes contra infecção de RLO.

5 b) Uma vacina RLO contendo a cepa de desafio, isto é, um vacina homóloga, é notavelmente menos eficiente do que vacinas baseadas em antígenos *Streptococcal*.

c) Vacinas com adjuvante de óleo têm melhor desempenho do que vacinas a base de água

10 d) Mesmo uma vacina *Streptococcal* a base de água fornece melhor proteção do que uma vacina a base de óleo com base em RLO's

e) Como esperado, um vacina Gram-negativa mas *não Streptococcal* escolhida aleatoriamente, neste caso, a cepa *Vibrio anguillarum* 02 A patogênica do peixe não fornece proteção contra infecção de RLO.

CONCLUSÕES

15 Acredita-se que as vacinas testadas sejam seguras. Um desafio de peixe vacinado foi realizado 3 semanas após a vacinação de IP com RLO's crescidos em meio artificial. A doença bem como os sinais de doença típicos podem ser reproduzidos e o organismo de desafio pode ser isolado novamente do peixe morto.

20 Deduz-se diretamente da figura 1, que tilápia pode ser protegida contra infecções de RLO através de vacinação com injeção IP tanto com vacinas *Streptococcal* a base de óleo quanto a base de água. Surpreendentemente, o desempenho mesmo das vacinas *Streptococcal* a base de água é notavelmente melhor do que o desempenho das vacinas a base de
25 óleo em RLO. Entretanto, vacinas *Streptococcal* com adjuvante de óleo são melhores do que as vacinas sem adjuvante.

Os valores relativamente baixos de RPS neste experimento são o resultado da dose de desafio de RLO muito alta aplicada neste experimento específico.

Exemplo 2:

O objetivo deste experimento foi avaliar se a proteção contra infecções de RLO é obtida quando tilápias são vacinadas com vacinas bivalentes a base de óleo contendo *Streptococcus iniae* e *S. difficile*. Também, a relação entre o nível de proteção e o número de bactérias presentes na vacina a base de *Streptococcus* foi determinada neste Exemplo. Duas diferentes vacinas, contendo tanto *Streptococcus iniae* quanto *S. difficile* em diferentes concentrações em uma emulsão de água não mineral em óleo foram injetadas com IP em tilápia jovem. Os níveis de antígeno nas vacinas foram $6,8 \times 10^8$ e $1,7 \times 10^8$ células de cada antígeno por mL de vacina. Três semanas após a vacinação, os peixes de cada grupo de vacina e grupos de controle não vacinados foram desafiados com uma suspensão de bactérias tipo *Rickettsia*.

Projeto Experimental

Grupos de tilápia originados do mesmo lote foram vacinados com uma das duas vacinas experimentais com adjuvante de óleo. As vacinas testadas continham *S. iniae* e *S. difficile*, mas as duas vacinas diferiam na concentração das células. Um grupo de peixe não foi vacinado e foi mantido como controle.

Três semanas após a vacinação, todos os grupos foram desafiados com um inóculo de desafio padronizado de bactérias de RLO e os peixes foram mantidos para observação por um período de 2 semanas após o desafio. Diariamente, os peixes mortos foram removidos e a bactéria causadora foi isolada novamente de um número representativo de peixe que foi morto. A eficácia das vacinas foi expressa como sobrevivência percentual relativa (RPS) nos grupos vacinados comparado com o controle.

As vacinas foram preparadas começando de uma cultura fermentadora de *S. iniae* e uma cultura fermentadora de *S. difficile*. Todas as formulações de vacina foram preparadas em um adjuvante de água não mineral em óleo. As vacinas usadas no estudo são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Vacinas usadas no estudo

Vacina	Concentração final de vacina <i>S. iniae</i> (Células/mL vac.)	Concentração final de vacina <i>S. difficile</i> (Células/mL vac.)
120105-a	$6,8 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$
120105-b	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$

As concentrações de antígeno especificadas na Tabela 2 representam a concentração final de vacina, isto é, após misturar com a emulsão PBS/óleo.

5 Vacinação

Os peixes foram privados de alimento por 48 horas antes da vacinação para assegurar esvaziamento completo do trato intestinal e reduzir dessa forma a possibilidade de danificar os órgãos internos durante a injeção. A vacinação foi realizada por injeção IP. O experimento incluiu 3 grupos experimentais (2 grupos de vacina e 1 grupo de controle), cada qual consistindo em 25 peixes. Cada peixe dos grupos de vacina foi injetado com 0,1 mL de vacina de acordo com a Tabela 2. Os peixes de controle não foram injetados.

Preparação de cultura de desafio

Um frasco de um estoque de glicerol de sementes de RLO foi congelado e inoculado em Ágar de chocolate e incubado a 26°C por 48 horas. O que cresceu das placas foi coletado e inoculado como crescimento sólido em 100 mL de caldo líquido e incubado em um misturador orbital (150 RPM) a 26°C. Após aproximadamente 48 horas de crescimento, a pureza da cultura foi checada e o OD₆₆₀ foi medido. As suspensões de desafio foram preparadas começando desta cultura por diluição da cultura em um OD₆₆₀ = 0,027 com salina estéril 0,9% (p/v). Esta suspensão foi em seguida usada diretamente para desafio. A pureza da suspensão de desafio foi avaliada riscando uma porção da suspensão de desafio em Ágar de chocolate e incubação subsequente a 26°C.

Desafio

O desafio foi realizado por injeção. Os peixes foram privados de alimento por 48 horas antes do desafio para assegurar esvaziamento completo do trato gastrintestinal. De todos os grupos de vacina e do grupo de controle, 20 peixes foram injetados com 0,1 mL de uma suspensão bacteriana padronizada. Para isto cada grupo foi aprisionado, anestesiado em Aqui-S até ser sedado e injetado intraperitoneal no lado do corpo logo atrás da extremidade da nadadeira peitoral. Imediatamente após a injeção os peixes foram transferidos para seu tanque alocado e a recuperação foi acompanhada.

Observações de mortalidade

Após o desafio, os peixes foram checados duas vezes diariamente e os peixes mortos foram removidos do tanque, peso e comprimento foram registrados e órgãos internos, notavelmente rim e baço foram avaliados pela presença de granulomas típicos. Amostras do baço foram plaqueadas em Ágar de chocolate de poucos peixe, para confirmar a presença do organismo de desafio e verificar dessa forma a causa da mortalidade.

RESULTADOS

Mortalidade após o desafio

A mortalidade nos diferentes grupos de vacina e nos grupos de controle observada é apresentada na Figura 2 e figura 3. As vacinas são representadas no gráfico com relação à concentração (célula/mL) de cada antígeno na vacina final. Ré isolamento foi realizado a partir dos peixes que morreram após o desafio. Estes peixes mostraram ré-isolamento positivo claro.

Avaliação de eficácia

Com base nas figuras de mortalidade obtidas, os valores de RPS foram calculados por condição. Os resultados são expressos nas Figura 2 e 3. Os peixe, vacinados com IP com um vacina de *Streptococcus* com adjuvante de óleo bivalente contendo *S. iniae* e *S. difficile* mostraram proteção

contra desafios RLO. Entretanto, os resultados sugerem um tipo de resposta de dose de reação em que uma vacina de alta dose fornece melhor proteção do que uma vacina de baixa dose. Um RPS de 73% foi obtido com uma vacina contendo $6,8 \times 10^8$ células de *S. iniae* e $6,8 \times 10^8$ células de *S. difficile*. A mortalidade no peixe de controle não vacinado foi 75%.

Exemplo 3:

Neste experimento, foi testada a eficácia de uma vacina de *Streptococcus difficile* monovalente (Sd) em uma emulsão de água não mineral em óleo. Grupos de tilápia foram vacinados com uma vacina de *Streptococcus difficile* monovalente compreendendo $6,8 \times 10^7$ Sd células em uma emulsão de água não mineral em óleo, ou deixado sem vacinar como um grupo de controle. As vacinas foram preparadas da maneira descrita nos Exemplos 1 e 2. Foram realizados os desafios seguintes com RLO:

a) em 10 dias após a vacinação foi realizado um desafio de coabitação. O momento de desafio em dez dias foi escolhido uma vez que isto representa a situação de campo normal. Coabitação foi escolhida uma vez que este modelo mostrou o desenvolvimento de sinais de doença típicos na tempo apropriado da maneira vista em erupções no campo em um experimento pré-desafio.

b) Na semana 6 após a vacinação foi realizado um desafio de injeção.

Conclusão geral:

Desafio de coabitação feito nos 10 dias PV e desafio de injeção realizado nas 6 semanas PV ambos mostram que uma vacina com adjuvante de óleo monovalente contendo *Streptococcus difficile* fornece proteção contra infecção de RLO. O valor de RPS após a vacinação no experimento de desafio de coabitação foi 89%.

A figura 4 mostra, que em 6 semanas pós a vacinação com uma vacina de *Streptococcus difficile* monovalente seguido por desafio de

injeção, a mortalidade cumulativa nos peixes de controle atingiu 90%, ao passo que dos peixes vacinados apenas 20% morreram. Isto resulta em um RPS de 78%.

Legenda para as figuras.

5 Figura 1: valores de RPS por grupo de vacina da maneira calculada comparado ao grupo de controle vacinado com PBS simulado.

 Figura 2: É dada a Mortalidade Percentual Cumulativa com o tempo, com relação à dose de vacina. É dado o efeito do número de células na vacina na sobrevivência da porcentagem relativa após desafio de RLO.

10 Figura 3: Sobrevivência percentual cumulativa final (comparar figura 2), com relação à dose de vacina dada.

 Figura 4: Sobrevivência percentual relativa de peixes vacinados com uma vacina de *Streptococcus difficile* monovalente compreendendo $6,8 \times 10^7$ Sd células em uma emulsão de água não mineral em
15 óleo.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma bactéria do gênero *Streptococcus*, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de uma vacina para combater infecção de organismo tipo *Rickettsia*.
- 5 2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita bactéria é uma bactéria viva atenuada.
3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as ditas bactérias são na forma de uma bactéria.
4. Uso de acordo com as reivindicações 1-3, caracterizado pelo
10 fato de que a dita bactéria do gênero *Streptococcus* é das espécies *Streptococcus iniae*, *agalactiae* ou *difficile*.
5. Uso de acordo com as reivindicações 1-3, caracterizado pelo fato de que a dita bactéria do gênero *Streptococcus* é da espécie *Streptococcus difficile*.
6. Uso de acordo com as reivindicações 1-5, caracterizado pelo
15 fato de que a dita vacina compreende pelo menos um outro microorganismo ou vírus que é patogênico para o peixe, ou um outro antígeno ou material genético que codifica o outro dito antígeno, em que o outro dito antígeno ou material genético é derivado de um vírus ou microorganismo patogênico para o peixe.
7. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo
20 fato de que o outro dito microorganismo ou vírus é selecionado do grupo que consiste em *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* sub espécies *piscicidae*, *Tenacibaculum maritimum*, *Flavobacterium sp.*, *Flexibacter sp.*, *Lactococcus garvieae*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, vírus da necrose viral, iridovírus, herpesvírus Koi, *Aeromonas salmonicidae*, *Vibrio salmonicidae*, *Moritella viscosa*,
25 *Vibrio ordalii*, *Piscirickettsia salmonis*, vírus de doença pancreática do salmão, vírus da doença do sono, vírus da necrose nervosa viral, vírus da necrose pancreática infecciosa, iridovírus, *Lepeophtherius salmonis*, *Caligus elongatus*, *Cryptobia salmositica*, *Myxobolus cerebralis*, *Kudoa thyrsites*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Dactylogyrus spp.*, *Trichodina spp.* e *Benedenia seriola*.

Figuras

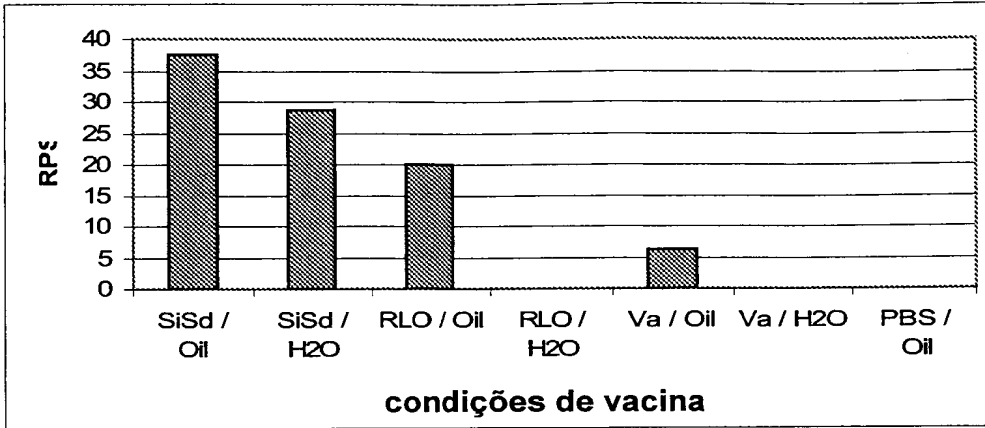


Figura 1

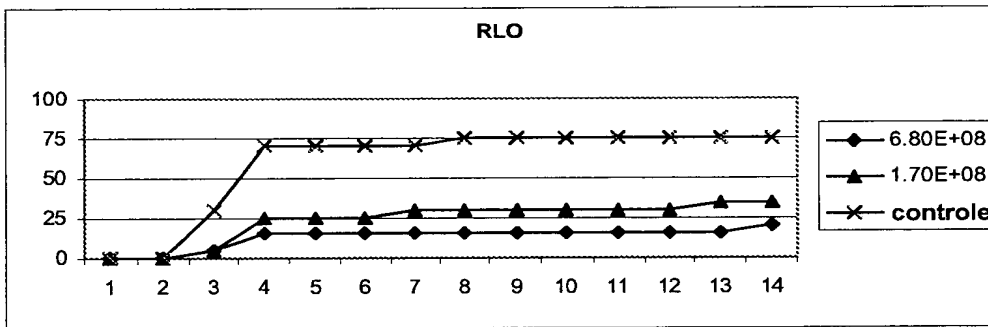


Figura 2

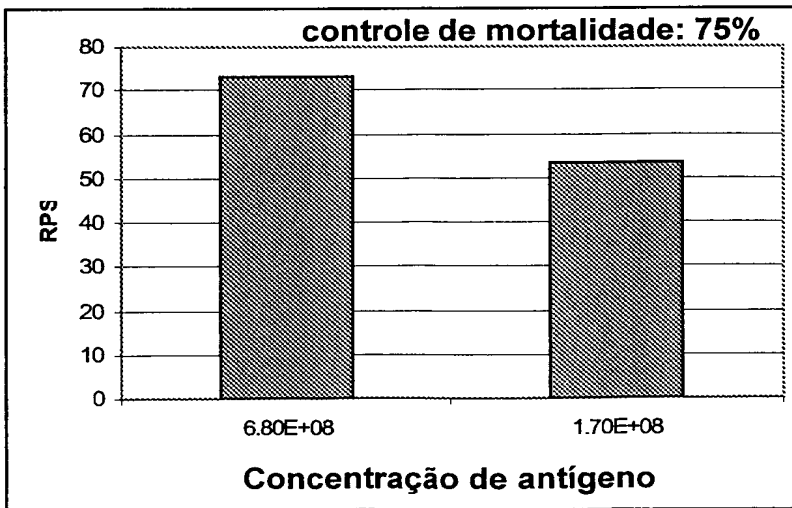


Figura 3

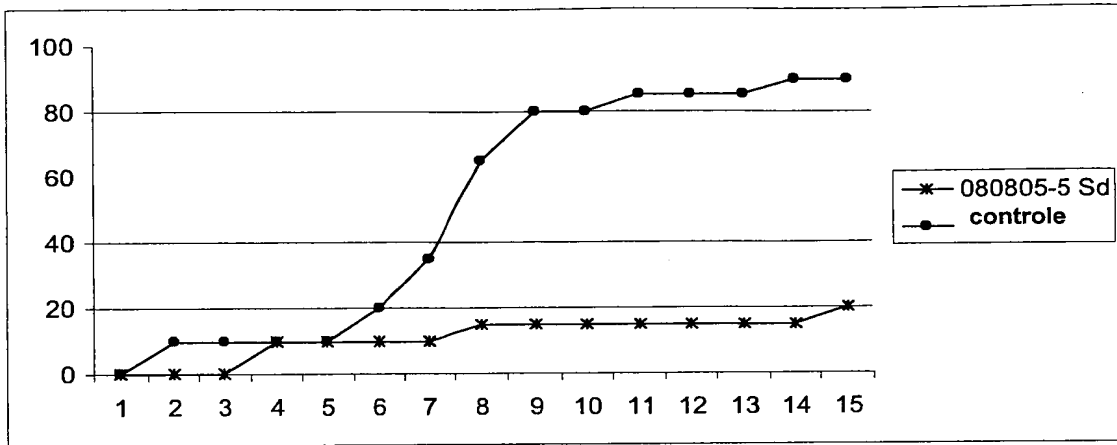


Figura 4

RESUMO“USO DE UMA BACTÉRIA DO GÊNERO *STREPTOCOCCUS*”

A presente invenção diz respeito ao uso de bactérias do gênero *Streptococcus* para a fabricação de uma vacina para combater infecção de organismo tipo *Rickettsia*.