



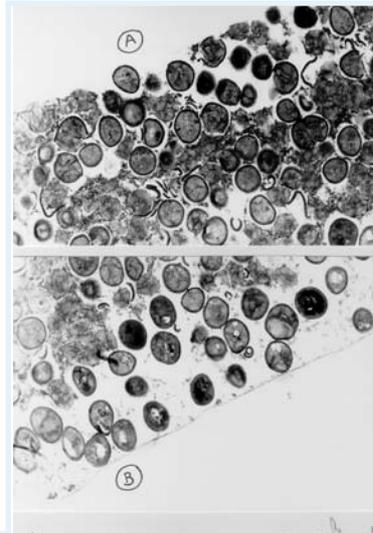
AUTOVACUNAS FRENTE A ESTAFILOCOCCOS

Rafael Baselga
exopol@exopol.com

Los Staphylococcus son patógenos de hombres y de animales y son especialmente importantes en cunicultura produciendo mamitis, metritis, neumonías, abscesos, mal de patas, etc.

Staphylococcus aureus produce dos tipos de exopolisacáridos (cápsula y slime) y ambos se han utilizado para desarrollar vacunas en humanos que han demostrado su efectividad y ya se han registrado (Nabi-StaphVAX, StaphVAX). Los mismos dos tipos de exopolisacáridos también se han encontrado en Staphylococcus epidermidis, hyicus y otros Staphylococcus coagulasa-negativo, y nosotros también los hemos identificado en aislamientos en conejos, ovejas, cabras, cerdos y vacas realizados en nuestro laboratorio.

La función de estos exopolisacáridos es proteger a las bacterias frente a la fagocitosis además de facilitar la colonización bacteriana mediante la formación de biofilms. Si quieres saber más puedes consultar:



En la foto se observa un biofilm formado por células bacterianas de *S. aureus*. Entre las bacterias aparece un exopolisacárido que une las bacterias entre si y con la superficie epitelial, es el slime, diferente de la cápsula. El biofilm permite el paso de nutrientes pero impide la fagocitosis y facilita la unión a las superficies.

Maira-Litran T, Kropec A, Goldmann D, Pier GB.

Biologic properties and vaccine potential of the staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide.

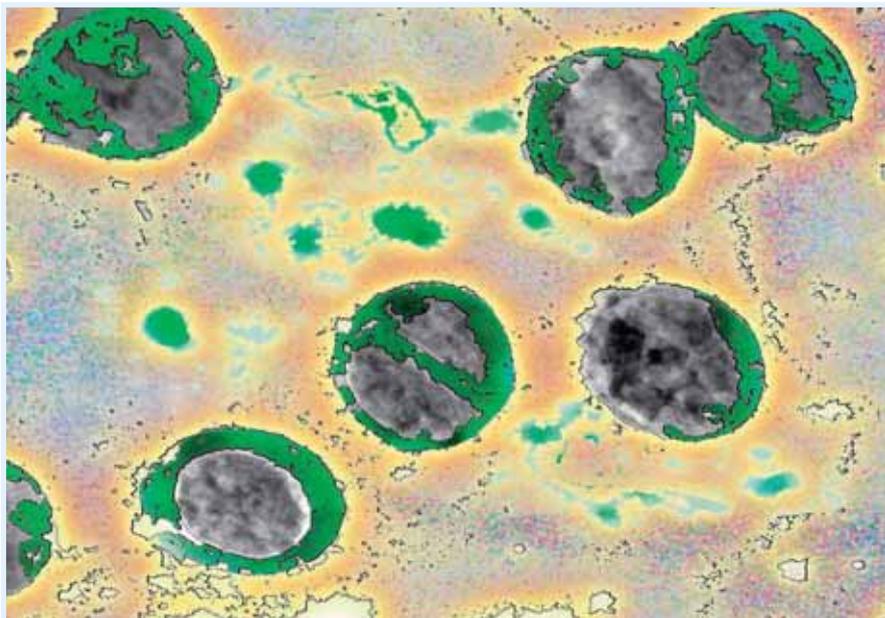
Vaccine. 2004 Feb 17;22(7):872-9 o aquí
<http://www.exopol.com/autovac/basecientifica.html>

PROTOCOLOS VACUNALES FRENTE A STAPHYLOCOCCUS

Normalmente aparecen afectados animales de todas las edades.

- Vacunar y revacunar reproductores con 15-21 días de intervalo. La segunda dosis debe ponerse unos 15 días antes del parto cuando aparecen problemas en lactantes.
- Vacunar y revacunar la reposición con 15-21 días de intervalo.
- Poner una dosis de recuerdo aproximadamente cada 6 meses, en palpación positiva. Si no es posible, vacunar todos los reproductores en sábana.

Cuando existen problemas mixtos recomendamos la utilización de autovacunas conjuntas frente a Staphylococcus y Pasteurella.



En la foto se observa la cápsula bacteriana (en verde) que envuelve a las bacterias individualizadas de *S. aureus* (la cápsula es diferente del slime). En este caso el exopolisacárido actúa como un escudo protector individual para cada bacteria, presentando a los fagocitos una superficie difícil de reconocer y digerir.

En nuestro laboratorio utilizamos la tecnología de los liposomas para inmunopotenciar a los exopolisacáridos bacterianos esencialmente tal y como se describe en: Amorena B, Baselga R, Albizu I Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. Vaccine 1994;12(3):243-9. La misma tecnología la hemos aplicado a otros patógenos como Mycoplasmas y Pasteurella.

Bacterias	Liposomas	Días
<i>Escherichia coli</i>	No	10
<i>Salmonella sp</i>	No	10
<i>Escherichia coli</i> + <i>Salmonella</i>	No	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sí	10
<i>Pasteurella multocida</i>	Sí	10
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Pasteurella multocida</i>	Sí	10
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Bordetella bronchiseptica</i>	Sí	10

Tabla 1. Autovacunas que se elaboran más frecuentemente en conejos, tiempo requerido y precio aproximado por dosis.

CÓMO SE HACEN LAS AUTOVACUNAS.

En muchos de los pasos no indicamos los tiempos porque son procesos que sólo llevan unas horas y que pueden, o no, realizarse en el mismo día.

Al recibir un pedido por fax, teléfono o a través de la web se pide confirmación firmada al veterinario, recuerda que una autovacuna necesita una receta como cualquier otro medicamento.

Día 1. Cuando un veterinario nos solicita una autovacuna, descongelamos la cepa guardada y la sembramos en medios de crecimiento sólidos. A veces las bacterias acaban de ser aisladas y evitamos el tiempo empleado en descongelar las cepas. La gran mayoría de las bacterias congeladas crecen en 24 horas (*Pasteurella*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, etc.). Se comprueba que el inóculo inicial que se emplea no está contaminado.



Vial de congelación. Las cepas se guardan congeladas e identificadas en viales de congelación durante al menos 5 años.

El mismo día preparamos y esterilizamos un volumen de medio de crecimiento suficiente para fabricar las dosis solicitadas, aunque la concentración final de antígeno se estandariza después de realizar el recuento final de bacterias. Algunos medios de crecimiento llevan suplementos muy especializados. El medio se inocula con una suspensión del cultivo original.



EXOPOL

autovacunas & diagnóstico
animales & producción

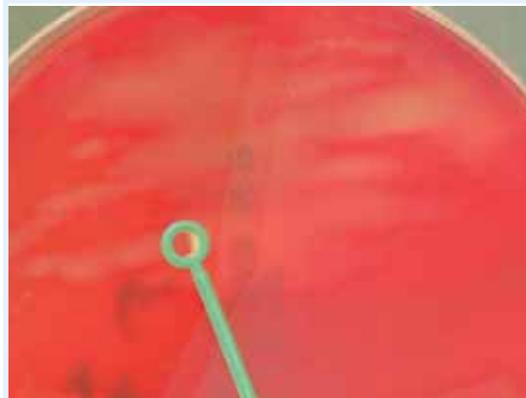
www.exopol.com

ISO 9001
EC-1597/04



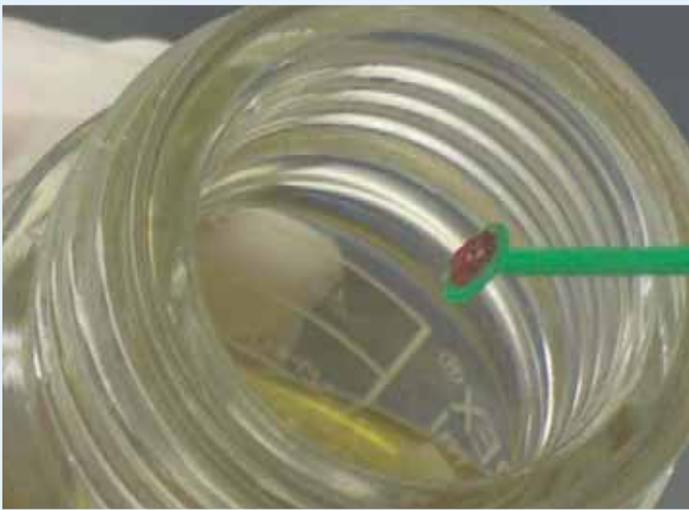
Los medios deshidratados se disuelven en agua destilada.

Día 2. Una colonia se siembra en el medio líquido que se incubará a 37° C. durante 18-24 horas. Cuando en una autovacuna se incluye más de una cepa se siembran botellas diferentes.



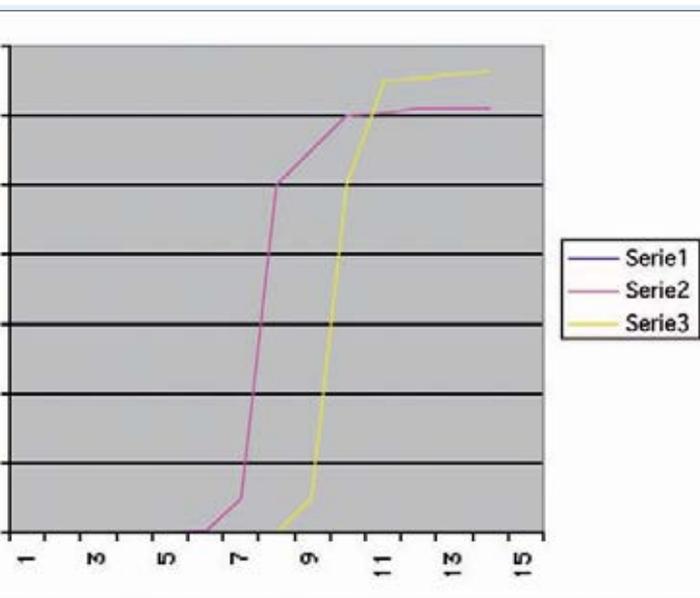
El crecimiento de una placa de Agar sangre se transfiere a una botella con caldo nutritivo.

1400000000
1200000000
1000000000
800000000
600000000
400000000
200000000
0



Inoculación del caldo de cultivo con la cepa de *Staphylococcus* recogida de la placa de agar sangre.

Día 3. En las primeras horas después de la siembra las bacterias se multiplican de un modo exponencial, justo hasta que consumen la mayoría de los nutrientes del medio. En ese momento dejan de multiplicarse, pero es precisamente ahora cuando comienzan a producirse mayores cantidades de exopolisacáridos bacterianos.



Crecimiento de bacterias y producción de exopolisacáridos.

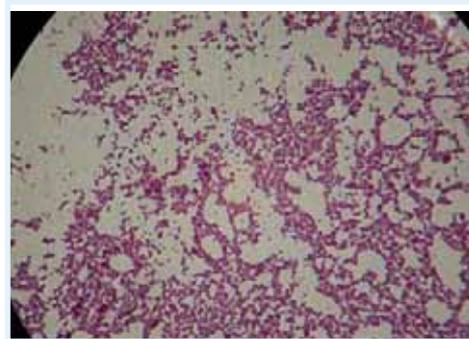


Las botellas inoculadas se incuban a 37°C durante 24-48 horas.



Botellas de autovacunas con crecimiento

Día 4. Inactivamos las bacterias añadiendo formol al medio donde se han multiplicados y dejamos que el formol actúe durante otras 18-24 horas. Antes de inactivar el cultivo nos aseguramos de la pureza y ausencia de contaminación del cultivo.



Cepa pura de *Staphylococcus aureus* teñida con Gram. Microscopía de campo claro x1000

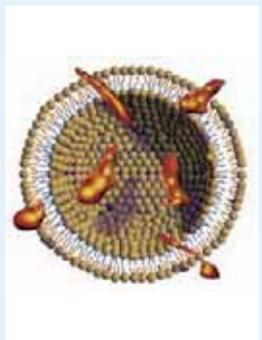
Día 5. Separamos los exopolisacáridos capsulares. Para hacerlo, primero eliminamos las bacterias y cualquier resto de proteínas. También eliminamos los restos de metabolitos del medio.

Después de la inactivación y utilizando una alícuota hacemos el recuento total de bacterias mediante citometría de flujo. Esto nos permite ajustar las concentraciones bacterianas de modo que en las autovacunas utilizamos cantidades análogas y reproducibles de antígeno.



Recuento de bacterias en citómetro

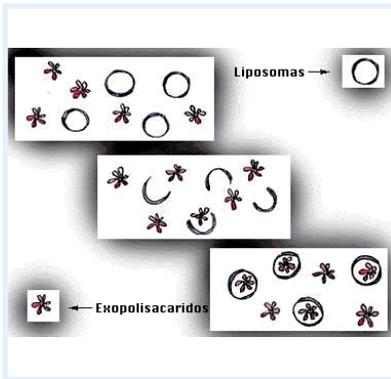
Comprobamos que el sobrenadante contiene los exopolisacáridos en la concentración adecuada. Una vez conocidas las concentraciones de exopolisacáridos del sobrenadante lo mezclamos con los liposomas que hemos fabricado independientemente. La mezcla se congela.



Los liposomas de la autovacuna se han fabricado independientemente. Los liposomas son pequeñas vesículas de lípidos que después de la liofilización encerrarán en su interior el antígeno purificado de las *Brachyspiras*. Los liposomas se elaboran con una mezcla de lípidos que se conserva congelada.

Los liposomas son pequeñas vesículas de lípidos que incorporan en su interior (hidrosolubles) o en su membrana (liposolubles) los antígenos con los que se mezclan.

Antes de la liofilización mezclamos los liposomas con una suspensión de antígeno, que liofilizamos. En la liofilización congelamos la muestra y extraemos el agua, de modo que los liposomas se rompen. Al resuspender la autovacuna, los liposomas se cierran de nuevo incorporando el antígeno en su interior.



El proceso de elaboración de los liposomas se ejemplifica aquí. Las vesículas de lípido se rompen en la liofilización y al reconstituir las con agua atrapan al antígeno.

Día 6. La mezcla de liposomas y exopolisacáridos ya congelada se liofiliza. En el proceso de liofilización eliminamos el agua sin que se descongele la muestra. El proceso dura dos días.

La autovacuna se envía liofilizada lo que facilita su conservación.



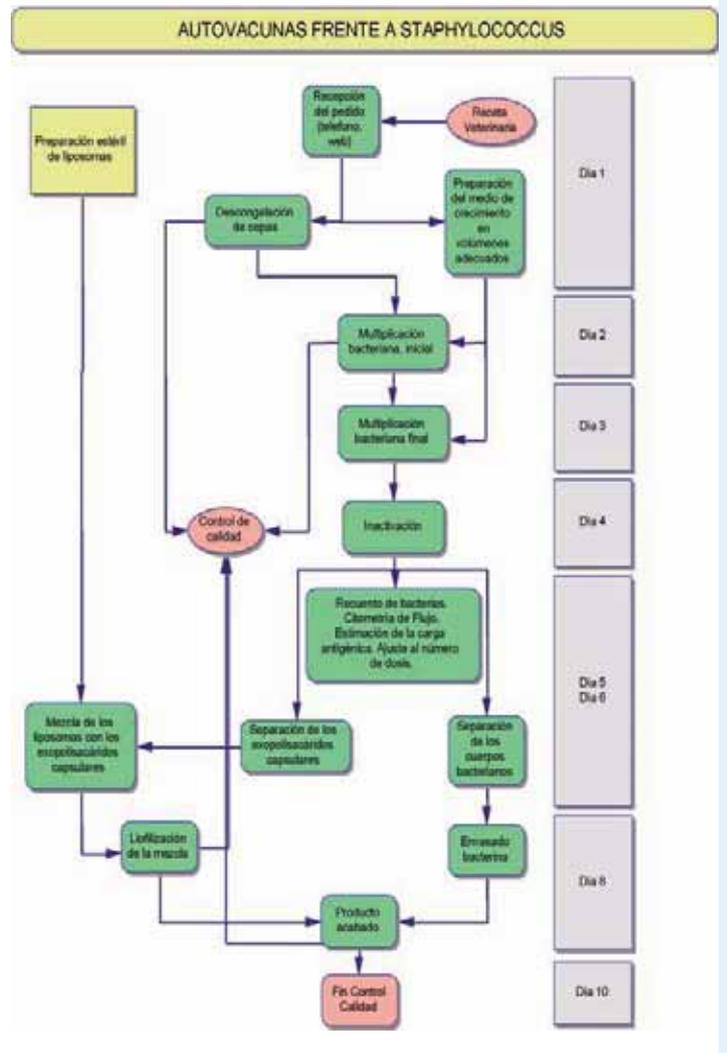
Día 8. Los viales se retiran del liofilizador y se hacen los ensayos para confirmar la ausencia de contaminación.



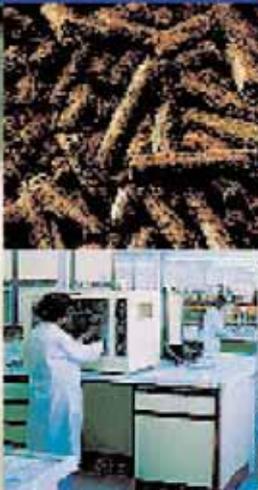
El producto final se ensaya en diferentes medios para confirmar la total ausencia de contaminación.



Liofilizador trabajando. En su interior se observan viales con liposomas liofilizándose.



Calidad alimentaria



Menos coste y mejor conversión

Corporación
Alimentaria
Guissona, S.A.



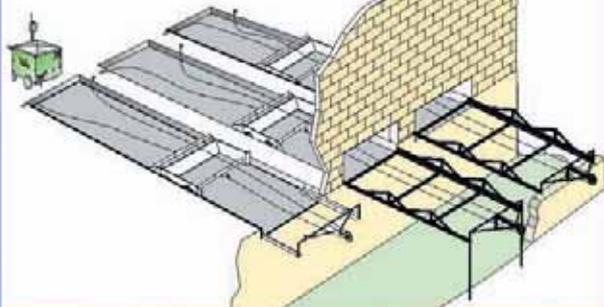
Traspalau, 8
25210 Guissona (Lleida)
Tel. 973 550 000
Fax 973 550 882

www.cag.es

Mecanismos automáticos para la limpieza de granjas

Sistema patentado y homologado

Voladizo de vaciado
(según adaptación necesaria)



SISTEMA INNOVADOR

Dejando los cables pasados en cada foso.
Usted sólo tendrá que unir los cables a los de la máquina
manualmente y sin necesidad de utillaje alguno.

Ello de la forma más fácil, rápida y segura.
La automatización de nuestros equipos junto con la
utilización de este sistema INNOVADOR, permite un gran
ahorro de tiempo en el trabajo más engorroso de la limpieza
de la granja, ello con la mínima inversión que representa el
dejar cables pasados en cada foso.

Este sistema, igual que los accesorios que pudieran
precisar, están especialmente diseñados y fabricados
con piezas de fácil adaptación y transporte, pudiendo
efectuar el montaje y puesta en funcionamiento el
propio usuario.

NUEVA GENERACIÓN
EN EQUIPOS DE LIMPIEZA



MANDO A DISTANCIA

Programa y ordene
maniobras desde
cualquier punto



Fabricado por Especial Inox, S.L., C/ Reus, 20 Parc d'activitats econòmiques 08500 VIC (Barcelona)

Comercializado en España por Cunlequip, S.L. Tel. 93 846 67 88

Distribución y servicio técnico: Tel. 659 78 12 75 - 93 857 04 80