

Ecostaph PM+3

Reg. SAGARPA B-7149003

Suspensión Inyectable.

FORMULA:

Cultivos puros de *E.coli* entero adherentes y Entero toxigénicos 10^4 UFC.
Cultivos puros de *Staphylococcus aureus*, coagulasa Positivo y Negativo con títulos 10^4 UFC. Inactivados con formaldehído. Adyuvante PM+3. Excipiente c.b.p. 100 ml.

USO EN: Ganado lechero.

TIEMPO DE EXPIRACIÓN: 24 meses.

PRESENTACIÓN: Frasco de polietileno, 100 ml suspensión acuosa estéril / 25 dosis.

INDICACIONES: Para la prevención de las colibacilosis entéricas y de las infecciones de la glándula mamaria causadas por *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *hyicus*, *epidermidis* y *xylosus*. Agite bien y desinfecte la tapa antes de usarse. De preferencia consuma todo el producto una vez usado el envase.

DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION:

Vía de administración: Intramuscular.

Dosis: Para vacas adultas: 4 ml vía intramuscular en los músculos crurales externos a la altura del nacimiento de la glándula mamaria y nódulos linfoides supra mamarios.

APLICACIÓN:

Durante el manejo de secado o en vacas en lactación: Las vacas sin inmunización previa con EcoStaph PM+3: Dos aplicaciones de 4 ml I.M. en la pierna a la altura de los nódulos linfáticos supra mamarios, con un lapso de 30 días entre cada una. Vacas ya inmunizadas con EcoStaph PM+3: Refuerzo de 4 ml I.M. cada seis meses o al tiempo del manejo del secado del siguiente ciclo.

ADVERTENCIAS:

Como cualquier biológico, después de su aplicación es posible se genere choque anafiláctico. Vigile a los animales y en caso de anafilaxia proporcione el tratamiento en forma oportuna. La empresa fabricante se deslinda de la responsabilidad de sus bienes por mal uso o descuido del productor.

ALMACENAJE: NO CONGELE. Preserve de 2°C a 8°C.

ACCIÓN: DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO:

Los antígenos presentes en el biológico representan varios factores de virulencia de *E.coli* tanto de componentes de membrana y fimbrias como de factores de toxinas y para *Staphylococcus aureus* de proteínas de virulencia de la pared celular enriquecidas para el factor de clonación y adhesión a la fibronectina.

Una vez aplicado el biológico por la vía IM los antígenos son presentados a células inmunes y llevados al tejido linfóide para su ulterior proceso de síntesis de inmunoglobulinas del sub tipo IgG2. Las inmunoglobulinas permean de su nicho vascular hacia el acino glandular junto con la leche producida. Las inmunoglobulinas se adhieren a la superficie de las bacterias en forma específica y favorece la incorporación por fagocitosis a células inmunes especializadas en donde son destruidas.

Ecostaph PM+3

La bacterina EcoStaph PM+3 es un biológico preparado para el control de los gérmenes más frecuentes y/o de mayor riesgo inductoras de mastitis. Su construcción cuenta con; cuatro variables de *Escherichia coli* que expresan adhesinas y factores de virulencia. *Staphylococcus* totales, así como selectivos en su biofilm para factores de adhesión. Es un producto inactivado con aldehídos por lo que los microorganismos no se multiplican. Se puede aplicar en cualquier etapa de la producción. Si es aplicado en la etapa de lactancia, se espera reducción del 3% de la producción de leche de un solo día, recuperando la producción anterior. Su aplicación durante la etapa pre parto evita esa pérdida y prepara un calostro con protección particular de inmunoglobulinas IgG. Entre las IgG destacan las protectoras de adhesión de *E.coli* K 99 controlando las diarreas en los recién nacidos. No induce reacciones colaterales locales en el sitio de aplicación, ni sistémicas graves, dado el control de esterilidad y de concentración de endotoxinas. Contiene el adyuvante PM+3, compuesto constituido por dos tipos de glicósidos inmuno estimulantes. En forma eventual de presentar choque anafiláctico, aplicar epinefrina y proporcionar tratamiento sintomático.

La bio-variabilidad de *Escherichia coli* en lo que respecta a sus determinantes antigénicos, es muy amplia. Las variables determinantes de virulencia y patogenicidad en *Escherichia coli* se caracterizan por la adhesión a la membrana citoplásmica a las células del huésped. En forma eventual las *E.coli* son invasivas intra celulares al huésped y de alta virulencia. Esos determinantes se encuentran en los pilis y fimbrias de la superficie de *Escherichia coli* y son los determinantes K30, K35, K85 y K99 que conforman los antígenos de adhesinas de EcoStaph PM+ 3. Los factores de virulencia secretados al medio de cultivo se encuentran en vesículas cuyo diámetro oscila entre los 150 a 350 nanómetros. Las vesículas contienen factores de membrana como; lipopolisacárido y proteínas de virulencia de flagelos, fimbrias, pared celular (Sánchez Almazán M J 2016). Las proteínas de virulencia excretadas al medio son capturadas y purificadas para su dosificación dentro de la formulación.

Escherichia coli es una bacteria comensal del tracto entérico en el intestino grueso, de la mayoría de los mamíferos. Sin embargo, algunas variables mutantes son las responsables de presentación de diarreas o mastitis, una vez que se adhieren a las microvellosidades del intestino y/o a la superficie de revestimiento de las células que constituyen los epitelios de cisterna del pezón cisterna de la glándula, conductos y acinos galactóforos, respectivamente. La adhesión a las células modifica las microvellosidades y el transporte iónico de los enterocitos, originando la salida de líquidos intracelulares (diarrea). En la glándula mamaria, se estimula por quimiotaxis la atracción de leucocitos polimorfonucleares procedentes de la circulación en sangre periférica, permeando por el proceso de diapédesis hacia las luces acinares, modificando tanto los contenidos iónicos como las características físicas de la leche, propiciando la aglutinación. En los bovinos, *Escherichia coli* con pilis K-99 son las entero bacterias responsables de la diarrea de los recién nacidos. La bacterina EcoStaph PM+3 contiene en su formulación dos variables de *Escherichia coli* K-99 con producción de toxinas termo sensibles y termoestables. El resultado de

inmunizar a las vacas en la “etapa de secado” es el de un calostro enriquecido en inmunoglobulinas IgG-2 que protegen al recién nacido mediante inmunidad pasiva, previniendo la colonización de *Escherichia coli* productoras de diarrea.

La inmunización requiere de dos aplicaciones de 4 ml por la vía intramuscular espaciadas una de otra por 30 días a terneras después de 3 meses de edad. En forma posterior y por la memoria inmunológica, solo requerirá cada bovino de un refuerzo cada 6-9 meses.

Referencias

Romero Pastrana F, dirección; Hernández Jáuregui A. P Tesis maestría FMVZ UNAM, 2014.

Sánchez Almazán Jahir, dirección; Hernández Jáuregui A. P. Tesina de fin de carrera Ingeniería en Biotecnología. Identificación de las vesículas de la membrana externa de *E.coli* obtenida de un caso de mastitis en bovinos. Universidad Politécnica de Puebla, 2016.

Antecedentes

Escherichia coli

Escherichia coli es una de las bacterias predominantes en el tracto entérico de la mayoría de los mamíferos. La colonización por esta bacteria ocurre después del nacimiento como contaminante del agua y alimento ingerido y que proviene de otros individuos afines al medio ambiente. Una vez establecida la contaminación, *E.coli* puede persistir durante meses en el tracto intestinal y en forma predominante en el intestino grueso.

Escherichia coli contiene tres antígenos de superficie; O localizados en la pared celular de la bacteria. K o Vi, localizado en la superficie de la pared celular. H ubicado en los flagelos. Estos determinantes antigénicos son definidos en forma genética. Las combinaciones de los determinantes antigénicos son múltiples por lo que la biodiversidad es amplia, sin embargo, de 14,000 aislamientos solo 708 mostraron combinaciones diferentes de los antígenos H y O.

Toxinas Termo Estable (TS) y Termo Lábil (TL)

Son dos las toxinas presentes en las cepas de *E. coli* entero toxigénicas, la toxina termo estable (TS) y la termolábil (TL). La TL es una proteína de 86,000 Dalton y parecida en su composición y por ende en su efecto y/o acción con la toxina de vibro cholera. La TS está constituida por pequeños polipéptidos entre 18 y 50 aminoácidos. Ambas toxinas son responsables de modificaciones en la fisiología del enterocito dando lugar a la salida de solutos. En la colonización de la glándula mamaria, las toxinas inducen alteraciones inflamatorias locales y/o sistémicas. Al absorberse las toxinas al sistema sanguíneo, las toxinas inducen el cuadro de choque séptico.

Las Vesículas Endoplásmicas (OMVs) como sistema de secreción y liberación de factores microbianos.

Las OMVs constituyen un mecanismo de liberación a distancia de factores microbianos, la liberación se lleva a cabo en una envuelta protectora y por tanto en un entorno más estable que la secreción de proteínas solubles.

Las OMVs permiten la secreción de lípidos bacterianos, proteínas de membrana y otros componentes insolubles. Algunas proteínas de la membrana externa de patógenos son adhesinas, importantes para la colonización de tejidos del huésped. Las vesículas representan un medio por el cual, las proteínas solubles pueden ser liberadas al medio ya sean englobadas en el lumen o asociadas a la superficie de vesículas. Las proteasas extracelulares a menudo degradan las proteínas secretadas, sin embargo, las moléculas presentes en OMVs y las proteínas solubles asociadas a la superficie externa son altamente resistentes a las proteasas. En cambio, el transporte por OMVs puede permitir que las moléculas menos estables como toxinas puedan llegar a más destinos. Las OMVs permiten, además que las proteínas se liberen a altas concentraciones. Mediante el uso de las OMVs las bacterias pueden liberar moléculas efectoras, llegar a un mismo sitio a la vez y de forma dirigida a través de la especificidad de unión entre adhesinas bacterianas expuestas a la superficie y receptores de la célula huésped.

El proceso de vesiculación tiene un aspecto importante el cual es su capacidad inmunogénica. Las OMVs están siendo utilizadas como base para el desarrollo de vacunas frente a varios patógenos debido a sus características (Schwechhimer et al., 2013) son capaces de proteger contra infecciones, se ha visto que las vesículas pueden inducir una respuesta inmune protectora con la producción de anticuerpos IgG cuando son inoculados intramuscular e intranasal mente. Por tal motivo y debido al éxito que se presenta la utilización de las OMVs como vacunas, algunas proteínas son transportadas dentro de las vesículas y han demostrado ser buenos inmunógenos que se han expresado con la finalidad de aumentar la respuesta protectora.

Bibliografía

Falkow S., Mekalanos J. The enteric bacilli and vibrio. 561- 581. In; Microbiology Fourth ED. Ed. Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S. Lippincott Comp 1990.

Schwecheheimer, C, Sullivan, C.J., and Kuehn, M.J. (2003) Envelope control of outer membrane vesicles production in Gram-negative bacterial. Biochemistry 52: 3031-40.

Identificación de las vesículas de la membrana externa de E. coli obtenida de un caso de mastitis en bovinos. Manuel Jahir Sánchez Almazán para obtener el título de: Ingeniero en biotecnología director del proyecto: Dr. Pablo Hernández Jáuregui y Álvarez. Programa Académico de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Puebla. San Mateo Cuanalá, Puebla. 27 de abril de 2016.

N R. Tartaglia, K. Breyne, E. Meyer³, Ch. Cauty, J. Jardin, D. Chrétien, A. Dupont, K. Demeyere³, N. Berkova, Vasco Azevedo², E. Guédon, Y. Le Loir. Staphylococcus aureus Extracellular Vesicles Elicit an Immunostimulatory Response in vivo on the Murine Mammary Gland. Front Cel Infect Microb. 8, 277 2018.

***Escherichia coli* como antígeno vacunal**

No obstante, la biodiversidad de *E.coli* en el ambiente intestinal de los bovinos por ello en las heces en un establo, se ha demostrado por el método experimental, la respuesta inmune ante la aplicación de *E.coli* como antígeno vacunal y la respuesta regulatoria después del desafío con la misma cepa vacunal. Raynard P, y Caffin J.P. (1983) informaron sobre la estimulación de inmunoglobulinas del tipo IgG1 y 2, e IgM y el aumento en la concentración de estas globulinas en dos vacas inmunizadas, comparadas con 3 no inmunizadas. La aplicación de *E.coli* cepa B117 asociada a un adyuvante fue realizada durante el período de secado de la lactancia, seguida cinco semanas después de la infusión intramamaria de la vacuna sin adyuvante. Los dos grupos de vacas, (Inmunizadas y no inmunizadas) fueron desafiadas con 10 unidades formadoras de colonias de la cepa de *E.coli* B117. La concentración de IgG1 aumentó considerablemente en la leche así mismo la IgM, la mayor actividad bactericida hacia *E.coli* se desarrolló en los cuartos inmunizados. Este trabajo, representa el primer ensayo publicado sobre la inmunización intra glandular de antígenos.

En un experimento paralelo, Rainard P. analizó la respuesta celular inflamatoria y la actividad de los anticuerpos opsonizantes en la leche en las vacas inmunizadas. Antes del desafío, la leche libre de células y en contacto con leucocitos polimorfo nucleares agregados, destruyó la *E.coli* vacunal también incorporadas al sistema, mientras que la leche de vaca no inmunizada, permitió la sobrevivencia de *E.coli* vacunal y su multiplicación después del desafío in vivo, la respuesta inflamatoria se inició entre las 8 y 10 horas post inoculación en los dos grupos de vacas, sin embargo en el grupo inmunizado, la reacción inflamatoria fue notable y de gran celularidad desde las 6 horas. Los estudios in vitro demostraron la alta actividad bactericida. Estos experimentos demostraron con claridad que se formaron inmunoglobulinas específicas contra los determinantes antígenicos presentados mediante la inmunización al sistema inmune. La mayor actividad bacteriana obedece a la opsonización de las bacterias y a la fagocitosis por células mono nucleares estimuladas.

Raynard P, Caffin J.P. Sequential changes in serum albumin, immunoglobulin (IgG1, IgG2, IgM) and lactoferrin concentrations in milk following infusion of *Escherichia coli* into the udder of immunized and cows. Ann Rech Vet 1983; 14 (3) 271-279

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) pertenece a la familia *Micrococcaceae*, son cocos Gram positivos, con un diámetro entre 0,5 a 1,7 micras. La división celular que se produce en los tres planos perpendiculares no conduce a la separación total de las células hijas por lo que *S.aureus* aparece en forma individual, en pares o en cadenas cortas en forma de racimos. *S.aureus* es un anaerobio facultativo, sin embargo, su desarrollo es más abundante en condiciones aerobias. La proliferación ocurre en un amplio espectro de temperatura que oscila de 18 a 40°C. No obstante, la temperatura óptima es de entre 30 a 37°C. El pH óptimo es de 7.0 a 7.5. Presenta requerimientos nutricionales complejos, desarrollándose bien en casi todos los medios de laboratorio de rutina (1, 2).

S.aureus solía ser considerado un patógeno no invasivo, se sabe ahora que puede invadir diversos tipos de células debido a un mecanismo que involucra la formación de un puente de fibronectina en las proteínas de adherencia a la fibronectina de la bacteria y las integrinas del hospedero que activan el proceso de internalización de *S.aureus* (3, 4, 5). El microorganismo puede sobrevivir al interior de la célula en estado semiactivo generalmente referido como variantes de colonias pequeñas (6). Después de la colonización con *Staphylococcus aureus*, el sistema inmune del huésped induce anticuerpos contra la toxina beta, lipasa y ácido teicoico de la bacteria (7); sin embargo, esos anticuerpos no protegen contra nuevas infecciones causadas por el mismo germen (8). El desempeño de los anticuerpos producidos por infección previa o inducidos por vacunas de *Staphylococcus aureus* completos, se podría explicar por la producción in vivo por de una membrana de composición compleja, principalmente conformada por polisacáridos, llamada “biofilm”, que interfiere con la fagocitosis con las células competentes del sistema inmune (9). Las vacunas completas de *Staphylococcus aureus* inactivadas, solo logran protección parcial (10, 11). Las adhesinas son consideradas como el factor de virulencia más importante durante la fase temprana de la infección por *S.aureus* (12). Las adhesinas son una familia de proteínas presentes en la pared celular de la bacteria, son las encargadas de promover la adhesión al unirse a las moléculas de la matriz extracelular del hospedero, como son la fibronectina, el fibrinógeno y el colágeno. Sin embargo, las adhesinas que reconocen a la fibronectina y al fibrinógeno se ubican incluidas en el biofilm, inducen respuesta inmune, cuando están en su entorno habitual (13-14). Una de estas adhesinas que se une a la fibronectina (Fn), es la proteína de adhesión a la fibronectina (fibronectin-binding protein, FnBP). Otra adhesina de importancia en el proceso de adhesión al hospedero es aquella que se une al fibrinógeno. Existen varias adhesinas en *S.aureus* encargadas de adherirse al fibrinógeno, entre las mejor estudiadas están las proteínas “Clumping factor A y B (ClfA y ClfB”, presentes en la superficie de la bacteria (15, 16).

Referencias Bibliográficas.

1. Rhoden DL, Miller JM. Four-year prospective study of STAPH-IDENT system and conventional method for reference identification of *Staphylococcus*, *Stomatococcus*, and *Micrococcus spp.* J Clin Microbiol. 1995. 33: 96-98.
2. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. Microbiología. 20 Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, SA; 1994. pp. 554-575.
3. Schwarz-Linek U, Hook M, Potts JR. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. Mol Microbiol. 2004. 52: 631–641.

4. Schwarz-Linek U, Werner JM, Pickford AR, Gurusiddappa S, Kim JH, Pilka ES, Briggs A, Gough TS, Hook M, Campbell ID, Potts JR. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem betazipper. *Nature*. 2003. 423:177–181.
5. Peacock SJ, Foster TJ, Cameron BJ, Berendt AR. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology*. 1999. 145: 3477–3486.
6. Von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of *staphylococcal* SCVs in persistent infections. *Injury*. 2006. 37: S26-33.
7. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998. 339: 520-532.
8. Baselga R, Albizu I, Amorena B. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet Microbiol*. 1994. 39: 195-204
9. Guidry A, Fattom A, Patel A, O'Brien C. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. *Vet Microbiol*. 1997. 59: 53-58.
10. Cameron CM, Fuls WJ, Botha WF. Composition and evaluation of the efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccine. *J Vet Res*. 1979. 46: 1-8.
11. Giraudo JA, Calzolari A, Rampone H, Rampone A, Giraudo AT, Bogni C, Larriestra A, Nagel R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *J Dairy Sci*. 1997. 80: 845-853.
12. Zhou H, Xiong ZY, Li HP, Zheng YL, Jiang YQ. An immunogenicity study of a newly fusion protein CnaFnBP vaccinated against *Staphylococcus aureus* infections in a mice model. *Vaccine*. 2006. 24: 48304837.
13. Amorena B, Baselga R, Albizu I. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis *staphylococcal* vaccine. *Vaccine*. 1994. 12: 243-249.
14. Colque-Navarro P, Palma M, Sonderquist B, Flock JI, Mollby R. Antibody responses in patients with *staphylococcal* septicemia against two *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins: clumpingfactor and an extracellular fibrinogen binding protein. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000. 7: 14-20.
15. Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Hook M, Foster TJ. Clumping factor B (ClfB), a new surfacelocated fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 1998. 30: 245-257.
16. O'Connell DP, Nanavaty T, McDevitt D, Gurusiddappa S, Hook M, Foster TJ. The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* has a Ca²⁺-dependent inhibitory site. *J Biol Chem*. 1998. 273: 6821-6829.
17. . *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles Elicit an Immunostimulatory Response in vivo on the Murine Mammary Gland. *Front Cel Infect Microb*. 8, 277 2018.

CyTA Farma S.C
Manual de Procedimientos de Calidad
Control de calidad de producto terminado EcoStaph PM+3

Producto: EcoStaph PM+3 **Código de producto:** 580001

Presentación: 100 mL **Ingrediente Activo:** Cultivos puros de *E.coli* entero adherentes y enterotoxigénicos 10,000 UFC. Cultivos puros de *S. aureus* (+) y (-) 10, 000 UFC inactivados con formaldehído. Adyuvante PM+3, alérgenos y excipiente.

Número de lote: **Fecha de producción:**

Cantidad de lote: **Fecha de caducidad:**

Dosis: **Fecha de realización de los ensayos:**

Fecha de expedición del certificado:

Prueba / Especificación	Resultado
PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS	
Determinación de pH Método con potenciómetro pH entre los rangos de 5-7	6.20
Valoración de volumen Medición del volumen con balanza. igual a 100 mL	Cumple
Inactivación Siembra de <i>E.coli</i> en Agar Mac Conkey	S/C
Siembra de <i>S. aureus</i> en Agar Sal y Manitol	S/C
Siembra de <i>S. hyicus</i> en Agar Sal y Manitol	S/C
Siembra de <i>S. epidermidis</i> en Agar Sal y Manitol	S/C
Siembra de <i>S. xylosus</i> en Agar Sal y Manitol	S/C
PARÁMETROS BIOLÓGICOS:	
Inocuidad No se presentan bajas de muerte de animales ni disminución de peso.	Cumple
Inmunogenicidad Se considera positivo por encima de la densidad óptica del suero de ratón testigo/control.	Positivo
PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS	
Esterilidad Prueba realizada en agar soya Trypticaseína para producto terminado de EcoStaph PM+3 (Sin crecimiento).	S/C
Prueba realizada en Agar Dextrosa Sabouraud para producto terminado de EcoStaph PM+3 (Sin crecimiento)	S/C

LOTE APROBADO

LOTE RECHAZADO

Responsable de Control de calidad.

MVZ, PhD Pablo Hernández Jauregui
Director Técnico y de Investigación