

REIVINDICACIONES

1. Vacuna subunitaria, polivalente, altamente inmunogénica contra mastitis, en mamíferos CARACTERIZADA porque consiste que en una formulación que comprende una mezcla de fragmentos
5 de pared y membranas celular y liposomas de tamaño menor a 1 μm originados desde la membrana celular de patógenos seleccionados de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis*, donde dichos fragmentos de pared celular y membranas liberan al menos uno elemento molecular
10 intracelular seleccionado de proteínas de membrana, lipopolisacárido, peptidoglicano, exopolisacáridos, DNA, entre otros elementos moleculares intracelulares inmunoestimulantes provenientes de la pared y membrana celular del patógeno o una mezclas de los mismos.
- 15 2. La vacuna de la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque sirve en mamíferos de crianza para la producción de carne o sus derivados, leche o productos utilizados en alimentación humana.
3. La vacuna de la reivindicación 2 CARACTERIZADA porque
20 dicho mamífero se selecciona del grupo consistente de bovino, porcino, oveja, caprino, camélido o equino.
4. La vacuna de la reivindicación 3 CARACTERIZADA porque dicho mamífero es una vaca.
5. La vacuna de la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque
25 es una vacuna subcutánea.
6. La vacuna de la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque comprende proteoliposomas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis*.
7. Procedimiento para preparar la vacuna subunitaria
30 polivalente altamente inmunogénica contra mastitis de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, CARACTERIZADO porque comprende:
 - a) Purificar sin desnaturar, membranas y fragmentos de pared celular de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y
35 *Streptococcus uberis*, descongelando a una temperatura dentro del rango de 40-50°C (sedimento congelado obtenido de una cosecha centrifugada de dichas bacterias patogénicas, las que previamente se hicieron crecer, en forma separada), y luego

re-suspender el sedimento descongelado en solución tampón de lisis, a razón de 1 g de sedimento en 10 mL de tampón de lisis, agregando perlas de Zirconia-Silica a razón de 1 g de perlas en 10 mL de tampón de lisis, subsecuentemente congelar a aproximadamente -80°C , y luego, descongelar por sonicación, repitiendo este ciclo de congelación - descongelación al menos 6 veces, y luego sembrar, para luego de verificar la ausencia de microorganismos viables, centrifugar a 4°C , reservando el sobrenadante y descartando el sedimento, donde el sobrenadante se centrifuga nuevamente a 4°C , reservándose nuevamente el sedimento, y descartándose el sobrenadante, y

b) Preparar los liposomas de membranas y fragmentos de pared y membrana celular a partir de sedimento obtenido en la etapa a), suspendiéndolo en solución tampón para solubilización de membrana a razón de 1 g de sedimento en 20 mL de tampón de solubilización de membranas, para luego incubar a aproximadamente 17°C con agitación, y luego centrifugar, agregar Bio-beads® previamente resuspendidos en solución y esterilizadas mediante autoclavado, a razón de 50 mg de perlas en 1 mL de solución, e incubar a aproximadamente 20°C con agitación, agregar nuevamente perlas e incubar nuevamente manteniendo las mismas condiciones de la última incubación, dejar decantar las perlas y retirar el sobrenadante para agregar en el mismo al que luego se le agrega alcohol bencílico y EDTA.

8. Método para inmunogenizar un mamífero CARACTERIZADO porque comprende administrar una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO porque comprenden administrar dicha vacuna subcutáneamente.

10. método de la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque dicha administración subcutánea se realiza en la nuca del animal.

11. El método de la reivindicación 10, CARACTERIZADO porque comprende administrar la vacuna en un mamífero de crianza para la producción de carne o sus derivados, leche o productos utilizados en alimentación humana.

12. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque comprende administrar la vacuna en mamífero seleccionado del grupo consistente de bovino, porcino, oveja, caprino, camélidos o equino.

- 5 13. El método de la reivindicación 12, CARACTERIZADO porque dicho mamífero es una vaca.