

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 395**

51 Int. Cl.:
C07K 16/02 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04711870 .8**
96 Fecha de presentación: **17.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1594543**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

54 Título: **INHIBIDOR DE ADHERENCIA DE INMUNÓGENOS Y PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN Y USO DEL MISMO.**

30 Prioridad:
19.02.2003 US 447904
10.02.2004 US 775557

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.12.2011

73 Titular/es:
Camas Incorporated
260 West Derrynane Street
LeCenter, MN 56057, US

72 Inventor/es:
Nash, Peter y
Mittenness, Bradley M.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 371 395 T3

DESCRIPCIÓN

Inhibidor de adherencia de inmunógenos y procedimiento de preparación y uso del mismo

Descripción

La presente invención se refiere a un inhibidor de adherencia microbiana de acuerdo con la reivindicación 1, a un procedimiento para producir el inhibidor de adherencia microbiana de acuerdo con la reivindicación 2, al uso del inhibidor de adherencia microbiana de acuerdo con la reivindicación 3.

La presente invención se refiere a inhibidores de adherencia microbiana, en forma de anticuerpos de huevo de aves de corral, para evitar sustancialmente la unión o la adherencia de inmunógenos causantes de enfermedad formadores de colonias en el complejo de enfermedad respiratoria inhibiendo que el inmunógeno se adhiera a las membranas mucosas de animales, que incluyen animales productores de alimentos, animales no productores de alimentos de alto valor, animales zoológicos, animales de compañía, animales de laboratorio o seres humanos huésped, al procedimiento de producción de tales inhibidores de adherencia y a los procedimientos de uso de tales inhibidores.

Antecedentes de la invención

Un grupo de microorganismos forma una interacción muy compleja en las vías respiratorias de animales. Estos animales pueden ser ganado lechero, ganado de engorde intensivo, porcinos y aves tales como pollos y pavos por nombrar unos pocos. Aunque los organismos pueden variar de grupo animal a grupo animal, son básicamente bacterias tales como grupos de *Pasteurellae*, *Mannhiemae* y *Haemophilus*, *Mycoplasma* y virus de los grupos respiratorios tales como el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), diarrea vírica bovina (BVD), parainfluenza (PI₃), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), gripe porcina, (H₁N₁, H₃N₂), hongos y parásitos y combinaciones de los mismos. Estos organismos se consideran patógenos respiratorios oportunistas que pueden residir en las vías respiratorias altas de animales sanos. *Pasteurella* y en un menor alcance *Haemophilus* y especies de *Mycoplasma* pueden causar el complejo de enfermedad respiratoria bovina (BRDC) en ganado por el resultado de la invasión de las vías respiratorias bajas después de inyecciones endógenas de la nasofaringe. En ganado lechero o de engorde intensivo, una diversidad de situaciones estresantes tales como carga, destete, infecciones víricas, mal tiempo, cambio en el tiempo, movimiento en los corrales de engorde, mala nutrición y hacinamiento pueden alterar la competencia del sistema inmune y las defensas físicas e inmunológicas de los animales. Esto permite que un mayor número de microorganismos realicen el trayecto desde el área nasofaríngea a las vías respiratorias bajas al interior de los pulmones. Esto conduce al complejo de enfermedad respiratoria neumónica, que incluye el complejo de fiebre de embarque en ganado. La transmisión entre animales es habitualmente mediante gotas transmitidas por el aire o mediante contaminación de alimentos o del agua. Una vez que los microorganismos se han establecido en el área nasofaríngea, durante la inspiración los aerosoles pueden dar como resultado un transporte hacia abajo de las bacterias a las vías respiratorias bajas. Esto permite que los organismos se unan a los bronquios y células alveolares y se multipliquen causando neumonía. Las infecciones de pulmón pueden conducir a lesiones sin signos clínicos pero conducen a una menor ganancia diaria media. Los animales pueden rechazar el pienso, enfermar muy rápidamente y la muerte puede tener lugar en el intervalo de horas. La morbilidad puede ser muy alta y una vez que un animal enferma, es más fácil que el resto del rebaño se infecte. Esto se convierte en una preocupación importante para corrales de engorde. Tienen lugar brotes similares en rebaños porcinos y poblaciones de aves tales como pollos y pavos. Las vacunas vivas actuales tienen un éxito limitado en la protección de los animales contra este complejo. Esto puede deberse en parte a la ausencia de protección inmune en el área nasofaríngea. Aunque el grupo de virus respiratorios puede debilitar a los animales y disminuir la respuesta inmunológica del huésped, son las cepas bacterianas (habitualmente *Mannhiema hemolytica* o *Pasteurella multocida*) que invaden las vías respiratorias bajas conduciendo a bronconeumonía (BRD) las que conducen a la enfermedad y muerte del animal. Tanto en la neumonía por fiebre de embarque como en la neumonía enzoótica en ganado, el denominador común final en ambos tipos de enfermedad son los agentes bacterianos. La enfermedad respiratoria bovina (BRD) es actualmente la causa principal de pérdida relacionada con enfermedad en corrales de engorde. Las pérdidas financieras atribuidas a BRD incluyen mortalidad, medicación, veterinaria y costes de laboratorio para el tratamiento. Los costes medios para un tratamiento son de media de 8,80 \$ por cabeza. Las novillas tratadas para BRD tienen menores puntuaciones de morbilidad en un 37,9 %. Los animales que no se tratan nunca son superiores de media en 11,48 \$ por cabeza en el rendimiento neto. Las ganancias diarias medias difieren entre animales tratados y no tratados. El beneficio neto es de media 57,48 \$ menor por cabeza para los animales tratados. La BRD se ha catalogado como causante del 20,6 % de todas las muertes de novillos en corrales de engorde.

El complejo de enfermedad respiratoria porcina es un tipo importante y similar de enfermedad que afecta hasta al 90 % de todos los rebaños porcinos. *Mycoplasma hypopneumonia* es el patógeno principal asociado comúnmente a los patógenos secundarios del complejo tales como los tipos A y D de *Pasteurella multocida* y puede causar signos clínicos de fiebre alta o crecimiento alterado. Las combinaciones de estos organismos pueden conducir tanto al aumento de la gravedad como a la duración de la neumonía en porcinos. El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) puede ser otra causa principal de neumonía en porcino. Esto puede conducir a una enfermedad reproductiva grave con una dosis solamente mínima de cepas virulentas de PRRS. Los agentes causales comunes de la enfermedad respiratoria porcina pueden incluir virus PRRS, gripe porcina (H1N1, H3N2) y *Mycoplasma*

hypopneumonia junto con *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus suis*, *Haemophilus planopneumonia*, *Pasteurella (Mannhiema) haemolytica* y *Pasteurella multocida* (tipos A y D). La estimación del impacto económico total sobre la salud de estos animales es difícil. Las lesiones de pulmón neumónicas pueden causar una mala salud respiratoria en rebaños y pueden afectar hasta al 70 por ciento de los cerdos en un rebaño. Las combinaciones de vacunaciones para virus y medicación para bacterias se necesitan para ayudar a controlar estos problemas - el momento de la vacunación siempre es importante. Se tiene que aplicar medicación en el momento apropiado para minimizar costes y lesiones a los animales.

Los organismos tales como *Mycoplasma hypopneumoniae* pueden ser una causa de una importante enfermedad respiratoria crónica denominada "neumonía enzoótica porcina" (SEP). Este organismo en solitario puede producir neumonía grave en porcino y sigue siendo un reto significativo para la industria porcina.

Actinobacillus pleuropneumoniae causa "pleuroneumonía porcina", dando como resultado graves pérdidas económicas y muerte. Aunque se han desarrollado vacunas, la protección homóloga no se ha demostrado. Durante los últimos años se han identificado a nivel mundial 14 serotipos y 2 biotipos. Se tienen que vacunar cerdos tanto en crecimiento como en finalización para proteger los rebaños.

El efecto principal de la enfermedad respiratoria en rebaños porcinos se observa en la ingesta reducida de pienso que conduce a crecimiento alterado. Esto conduce a menor uniformidad en cerdos, más mortalidad, menos ganancia diaria media y menos cerdos por camada. Los productores informan de que prácticamente el 14,4 % de todos los emplazamientos de rebaño desarrollan enfermedad respiratoria. Los costes aumentan por inyectar vacunas y medicación y un menor rendimiento global. Se han realizado estimaciones que redujeron la ganancia de peso diaria y los antibióticos usados para tratar la enfermedad cuestan a la industria porcina anualmente 467 millones de dólares. Más del 39 % de todas las muertes en cerdos de crecimiento-finalización se han atribuido a enfermedades respiratorias en porcino.

Técnica anterior

Se ha conocido la producción de un anticuerpo de huevo aviar para el diagnóstico o tratamiento de afecciones específicas. No está propuesta la producción de un anticuerpo de huevo aviar para la inhibición de organismos, específicamente la colonización de organismos y la adherencia y colonización de inmunógenos causantes de enfermedad en las vías respiratorias de animales.

Las patentes representativas de la técnica anterior incluyen las siguientes:

Polson, Patente de Estados Unidos Nº 4.555.019

Stolle y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.748.019

Tokoro, Patente de Estados Unidos Nº 5.080.895

Carroll, Patente de Estados Unidos Nº 5.196.193

Lee, Patente de Estados Unidos Nº 5.367.054

Coleman, Patente de Estados Unidos Nº 5.585.098

Stolle y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.753.268

Raun, Patente de Estados Unidos Nº 3.749.732, analiza los usos de antibióticos de poliéster en raciones para rumiantes para mejorar el uso del pienso en animales rumiantes. Esto aborda específicamente el uso de antibióticos en animales rumiantes como promotores del crecimiento.

Raun, Patente de Estados Unidos Nº 3.947.836, analiza el uso de compuestos antibióticos específicos para la mejora del uso de pienso para rumiantes cuando se da por vía oral al animal. Específicamente, el animal desarrolla una función del rumen en la que se producen más propionatos en relación a acetatos, mejorando de este modo el uso del pienso.

Ivy y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.933.364, analiza un procedimiento alternativo para promover el crecimiento y la eficacia alimenticia de mamíferos productores de alimentos. Proponen el uso de antibióticos de cinc que se pueden añadir en forma insoluble para crear un complejo de antibiótico de cinc que mejora la eficacia alimenticia de mamíferos productores de alimentos. Hacen referencia a dos Patentes de Estados Unidos, Nº 3.501.568 y 3.794.732, que abarcan la monensina con gran detalle.

Otras referencias sobre el uso de aditivos tales como monensina han mencionado la necesidad de la aplicación acertada de estos materiales debido a que pueden ser tóxicos para algunos animales, tales como caballos. Estos antibióticos, que no están aprobados para su uso en vacas lecheras, se tienen que administrar cuidadosamente. Además, la ingesta de pienso está reducida inicialmente ya que la monensina no se puede añadir a complementos basados en melazas que son aditivos clásicos para piensos para ganado. (Pate, F., "Ionophores Do Not Appear To

Work In Molasses Supplements", ONA Reports, noviembre de 1966, 2 páginas, Florida Cattleman and Livestock Journal; Lona, R. P. y col, J. Anim. Sci. 75(1): 2571-2579, 1979).

Polson, Patente de Estados Unidos Nº 4.550.019, se refiere a la fabricación y el uso de anticuerpos de yema de huevo de aves de corral para preparar preparaciones inmunológicas para las inmunizaciones pasivas de animales, incluyendo seres humanos, como inmunorreactivos para procedimientos inmunosorbitivos y en particular para ensayos analíticos cuantitativos, especialmente microensayos para investigaciones de diagnóstico, patológicas, forenses y farmacocinéticas.

Stolle y col, Patente de Estados Unidos Nº 4.748.018, se refiere a un procedimiento de inmunización pasiva de mamíferos que usa un anticuerpo de yema de huevo aviar frente a cualquiera de una diversidad de antígenos usando diversos procedimientos de administración en diversas condiciones y usando diversas composiciones que incorporan el anticuerpo, después de desarrollar en primer lugar en el mamífero una tolerancia al anticuerpo.

Tokoro, Patente de Estados Unidos Nº 5.080.895, se refiere a una sustancia que contiene anticuerpo específico de huevos y al procedimiento de producción y uso de la misma para el tratamiento de enfermedades infecciosas u otras y como aditivos en el alimento para ganado y aves de corral, cosméticos y medicinas y en el campo del serodiagnóstico. Aunque no se indica explícitamente, es evidente que el uso del anticuerpo de huevo en los piensos es para proporcionar un medio sencillo de administración oral del anticuerpo para el tratamiento de infecciones intestinales en ganado o aves de corral.

Carroll, Patente de Estados Unidos Nº 5.196.193 y la Patente de Estados Unidos divisional Nº 5.443.976, se refieren a composiciones anti-veneno que contienen anticuerpo de caballo o anticuerpo de yema de huevo aviar para neutralizar veneno de serpiente, araña, escorpión o medusa.

Lee, Patente de Estados Unidos Nº 5.367.054, se refiere a procedimientos para la purificación a gran escala de inmunoglobulinas de huevo para disminuir el recuento de células somáticas en la leche de rumiantes en lactación.

Stolle y col, Patente de Estados Unidos Nº 5.753.268, se refiere a una vacuna de huevo anti-colesterolémica y a un procedimiento para su producción y uso como un complemento alimenticio para el tratamiento de trastornos vasculares en seres humanos y otros animales.

LU Yue-Shoung, LAI Wayne C., PAKES Steven P., NIE L.C., Infection and Immunity, vol. 59, Nº, 1, enero de 1991, páginas 172-180, se refiere a un "anticuerpo monoclonal frente a una proteína de membrana externa de Pasteurella multocida que protege a conejos y ratones frente a pasteurellosis".

El inhibidor de adherencia microbiana de la presente invención se define en la reivindicación 1, el procedimiento para producir el inhibidor de adherencia microbiana se define en la reivindicación 2, el uso del inhibidor de adherencia microbiana de la presente invención se define en la reivindicación 3.

Expresado en líneas generales, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un inhibidor de adherencia microbiana para la administración a animales, tales como animales productores de alimentos, animales no productores de alimentos de alto valor, animales zoológicos, animales de compañía o seres humanos huéspedes para inhibir o evitar sustancialmente la adherencia de inmunógenos formadores de colonias en las vías respiratorias inoculando en primer lugar a aves hembra, en o a punto de alcanzar su edad de puesta de huevos, el inmunógeno diana particular. Después, tras un periodo de tiempo suficiente para permitir la producción en el ave de anticuerpo frente al inmunógeno fijado como diana, se recogen los huevos puestos por las aves. Los contenidos que contienen anticuerpos de yema y albumen de los huevos se separan de las cáscaras. Los contenidos que contienen anticuerpos de los huevos se pueden usar directamente, ponerse sobre un extensor o mezclarse con material de soporte. El anticuerpo se puede incorporar en un líquido, mezclar en un balde para lamer, pulverizar o lanzar a chorro al entorno que contiene los animales. El material inhibidor de adherencia de anticuerpos de huevo se puede almacenar o transportar para su uso cuando sea necesario.

Los contenidos de huevo que incorporan el anticuerpo específico para los inmunógenos fijados como diana se administran a los animales o seres humanos distribuyendo el material de anticuerpos directamente o introduciendo el material de anticuerpos arrastrado por el aire. El material se puede introducir en el área nasofaríngea del animal mediante inyección directa con una jeringa o pulverizarse. El material se puede administrar con una pistola de chorro directamente o mediante inoculación intranasal. Se pueden preparar y administrar mezclas de aerosol como una neblina sobre las cabezas y fosas nasales de los animales. Otra alternativa es mezclar el material con un vehículo y administrar como "cobertura" sobre el pienso. Se pueden cumplir las necesidades especiales añadiendo el material al agua y dejando que los animales o seres humanos beban la solución. El material activo se puede añadir a bloques a granel o canastas de pienso para su suministro. Se pueden preparar mezclas de tipo gel usando mezclas comunes de pienso para animales y vertiendo las mismas en "baldes para lamer" (baldes a granel de aditivo de pienso). Otros sistemas de suministro se pueden adaptar para el suministro del material activo a las vías respiratorias.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención está basada en un procedimiento de inhibición de la capacidad de microorganismos

formadores de colonias, tales como *Pasteurella (Mannhiema) haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*, gripe porcina, *Mycoplasma bovis* o *M. hypopneumoniae* de adherirse a las membranas mucosas y bronquios y células alveolares de las vías respiratorias de animales evitando de este modo la colonización de los microorganismos. El fracaso de los microorganismos en la colonización mantiene las defensas inmunológicas de los animales cuando se someten a entornos inductores de estrés. El resultado es que los animales tienen menos enfermedades respiratorias neumónicas incluyendo fiebre de embarque que causan una alta mortalidad de los animales infectados.

Todos los mamíferos y aves proporcionan tipos similares de protección que tienen en cuenta una respuesta inmune inmediata en su descendencia muy joven hasta que la misma adquiere también la capacidad de preparar por sí misma los anticuerpos. Más específicamente denominada protección por anticuerpos pasiva, este mecanismo de defensa se pasa a las crías de mamíferos a través de la placenta, la leche materna o a través de ambas. Sin embargo, las crías de aves reciben su protección por anticuerpos pasiva a través del almacén de anticuerpos colocados en los huevos en los que se desarrollan desde el estadio embrionario. Las aves en particular tienen la capacidad de "cargar" sus huevos cuando se forman con un suministro muy grande de anticuerpos concentrados superior al que está presente en el suero de la madre. Además, los anticuerpos aviares son mucho más estables y resistentes a la inactivación mediante digestión que los anticuerpos de mamífero, especialmente en condiciones adversas. Una vez inmunizada, la gallina pone las inmunoglobulinas de tipos IgY únicas en la yema mientras que deposita las inmunoglobulinas IgM e IgA de pollo comunes en el albumen. La albúmina ayuda a añadir resistencia a las preparaciones de huevo completo y ayuda a proteger a los anticuerpos aviares. Las inmunoglobulinas IgY aviares en la yema se unen estrechamente a, revisten, cubren y obliteran las adherinas que se unen a sus huéspedes. Las inmunoglobulinas IgM e IgA de la albúmina aumentan la unión en el tejido mucoso de las vías respiratorias del material que contiene anticuerpos que proporciona un efecto de apoyo más prolongado del material que contiene anticuerpos. Las inmunoglobulinas IgM e IgA tienen enlaces disulfuro que retienen las moléculas juntas y proporcionan mayores moléculas que contienen anticuerpos. Las moléculas más grandes que contienen anticuerpos son más eficaces en la prevención de la adherencia del inmunógeno fijado como diana en las vías respiratorias del animal o ser humano. La albúmina es una proteína que protege la actividad de las inmunoglobulinas IgY aumentando de este modo su vida activa en las vías respiratorias. Además, las grandes cantidades de anticuerpos que se ponen en los huevos son en mayor medida exclusivamente los específicos para los antígenos a los que la madre se ha expuesto y por los que ha sido provocada más recientemente. Todo esto da como resultado que los huevos de aves son la fuente más ideal para grandes cantidades de anticuerpos altamente específicos y estables producidos de forma económica. Aunque la invención se ilustra mediante el uso de pollos para producir anticuerpo aviar, se pueden usar otras aves de corral incluyendo pavos, patos, gansos, avestruz, emú, faisán, paloma, codorniz, etc. o combinaciones de los mismos.

Específicamente, los grupos se obtienen de pollos de gallinas jóvenes, típicamente Rhode Island Red, White Leghorn, cruces híbridos ligados al sexo u otras razas adecuadas para gran tamaño de huevo, alto volumen de producción de huevos y facilidad de manejo que están a punto de alcanzar la edad de puesta, aproximadamente 16-19 semanas para pollos, en un programa predeterminado por la cantidad y el momento de producto final deseado dando como resultado una corriente de producción continua constante. Después de un periodo adecuado de aislamiento y aclimatación de aproximadamente dos a cuatro semanas, cada grupo entrará en un programa de inoculación usando preparaciones patentadas rehidratadas de antígenos (inmunógenos) específicos para los que se desea un anticuerpo. Los cultivos de microorganismos se pueden obtener de fuentes comerciales tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Los cultivos se pueden usar para aislar antígenos. Los antígenos se pueden preparar como inmunógenos preparados y se pueden inyectar por vía intramuscular, pero preferentemente se inyectan por vía subcutánea. En aproximadamente cuatro a cinco semanas, el huevo promedio recogido contendrá cantidades copiosas del anticuerpo específico deseado en una forma fácil de usar y estable. Los pollos se pueden reinocular con el inmunógeno fijado como diana a lo largo del periodo de puesta de huevos para mantener el alto nivel de anticuerpos.

Se cascan lotes de huevos de grupos predeterminados de pollos, los contenidos se separan de las cáscaras y se mezclan y preferentemente se pasteurizan para eliminar microorganismos potencialmente patógenos del pollo y, de este modo, reducir la potencial contaminación. Se usan procedimientos de ensayo convencionales, tales como ELISA, aglutinación o similares para controlar la actividad de anticuerpos. Después, el lote típico se combina con lotes de grupos de pollos en otros niveles de producción promedio dando como resultado abundantes principios activos normalizados. El material de inhibidor microbiano de anticuerpo de huevo se puede almacenar y transportar materiales de soporte tales como aceite de semilla de soja, bolos y/o comprimidos. Dependiendo de las necesidades y especificaciones del formulador y el consumidor final, los productos de anticuerpos finales pueden incluir algún tipo de aditivo inocuo, tal como suero desecado o vainas de soja, heces de destilería, melazas, cáscaras de soja o arroz o similares para la formulación con la ración de pienso. Un huevo producido y procesado mediante los anteriores procedimientos producirá un producto lo suficientemente activo y estable para proporcionar al menos hasta 140 a 160 dosis de protección gestionada frente a colonización microbiana específica. Este procedimiento ha proporcionado por primera vez un medio económico, seguro y eficaz para controlar organismos causantes de enfermedad respiratoria en ganado de carne y rebaños lecheros, porcino, pollos, pavos, animales de compañía, animales no productores de alimentos de alto valor, animales zoológicos y seres humanos.

El inhibidor de adherencia de inmunógenos y procedimiento de preparación y uso del mismo produce inmunógenos

específicos para las especies microbianas enumeradas. Los inmunógenos se usan para inmunizar animales aviares ponedores de huevos. La gallina inmunizada pondrá huevos que contienen los anticuerpos específicos de tipo IgM e IgA en el albumen y de tipo IgY en la yema. Los huevos se recogerán y el material del huevo cascado completo se mezclará en la concentración apropiada con una mezcla de soporte tal como melazas, aceite de soja, DMSO, tampón PBS y solución de Vitamina E. Esta solución está optimizada de tal forma que se puede pulverizar, lanzar a chorro, inyectar por vía intranasal, aplicar como gel, o usar en una cobertura alimenticia y en baldes para lamer. El material protector se puede pulverizar sobre los animales en los rediles o corrales de engorde durante el periodo de alimentación habitualmente una vez por la mañana y una vez por la tarde. El número de pulverizaciones se determina mediante ensayos. Ya que el material es no tóxico, se da cuando se necesite y tanto como se necesite para un redil dado. El procedimiento preferido es mediante inyección intranasal directa con un pulverizador que usa ½ dosis por fosa nasal o una combinación de pulverizador nasal directo más cobertura alimenticia, balde para lamer, aplicadores por chorro.

El producto es una preparación completamente natural que contiene anticuerpos aviares específicos para los inmunógenos fijados como diana. Estos anticuerpos cuando se unen a la superficie externa, pared celular, receptores de adherina, pilos o estructuras de tipo pilo y cápsula o cápsida vírica no permitirán que el organismo se una a las membranas mucosas. Los microorganismos no serán capaces de multiplicarse o colonizar. Evitará que los microorganismos bajen por las vías respiratorias y elimina la capacidad de causar enfermedad en las vías respiratorias bajas. Pulverizando el material, la neblina revestirá la nasofaringe y evitará que las bacterias, virus u otros microorganismos se diseminen en gotas de agua. La neblina también revestirá el pienso y agua en el área, bloqueando de nuevo la capacidad de los organismos de diseminarse de animal a animal. El procedimiento de la invención proporciona una disminución sustancial en la enfermedad animal y muerte en corrales de engorde y rediles sin el uso de antibióticos.

Reduciendo el organismo respiratorio se disminuirán las lesiones de pulmón, se reducirá la infección secundaria, se mejorará la ganancia diaria, se mejorará el rendimiento, se mejorará la eficacia alimenticia y se reducirán los costes. El control de la neumonía en los animales mejorará el rendimiento de crecimiento y la calidad de vida así como un disminuirá la potencial diseminación de organismos respiratorios. Se puede obtener un ejemplo similar en animales de compañía o seres humanos.

Las realizaciones específicas descritas se proporcionan únicamente a modo de ejemplo y la invención está limitada únicamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

Los microorganismos, bacterias, virus y parásitos, etc. colonizantes de mayor éxito han desarrollado sobre sus superficies varios tipos diferentes de moléculas, denominadas "adherinas" o "intiminas", que pueden adherirse muy estrechamente a uno o más tipos de moléculas específicas que son parte de las diversas superficies del huésped. El inhibidor de adhesión es un anticuerpo aviar de actividad extraordinaria altamente específica que puede unirse muy estrechamente a, revestir, cubrir y obliterar estas adherinas que se unen a sus huéspedes con un tipo de cierre de candado y llave a estructuras químicas muy exclusivas. Las inmunoglobulinas IgY aviares en la yema se unen estrechamente a, revisten, cubren y obliteran adherinas que se unen a sus huéspedes. Las inmunoglobulinas IgM e IgA de albúmina aumentan la unión en el tejido mucoso de las vías respiratorias del material que contiene anticuerpos que proporciona un efecto de apoyo más prolongado del material que contiene anticuerpos. Las inmunoglobulinas IgM e IgA tienen enlaces disulfuro que retienen entre sí las moléculas y proporcionan mayores moléculas que contienen anticuerpos. Las moléculas de mayor tamaño que contienen anticuerpos son más eficaces en la prevención de la adherencia del inmunógeno fijado como diana en las vías respiratorias del animal o ser humano. La albúmina es una proteína que protege la actividad de las inmunoglobulinas IgY aumentando de este modo su vida activa en las vías respiratorias. Además de este ataque directo, los componentes del sistema de complemento incluidos en la mayoría de los fluidos biológicos, tales como sangre, linfa, saliva, lágrimas y en cierto alcance secreciones intestinales, reconocen la unión de un anticuerpo como desencadenantes para sus muchos tipos de actividades defensivas. Por lo tanto, la unión y el revestimiento de anticuerpos específicos combinado con la movilización muy probable de muchos otros sistemas de defensa celular culmina rápidamente en la inactivación química y finalmente la destrucción del microorganismo fijado como diana.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: Selección de Gallinas Aviares Ponedoras de Huevos

La raza de gallina ponedora de huevos puede variar con las necesidades y usos. Cualquier gallina de corral ponedora de huevos se puede inmunizar incluyendo pollos, pavos, patos, ganso, paloma, codorniz, avestruz, emú o cualquiera otra ave de corral. Las razas comunes de gallinas ponedoras de huevos son las preferidas y habitualmente se seleccionan por el número de huevos puestos por año, tamaño de huevo y facilidad de alojamiento. Rhode Island Red, White Leghorn e híbridos Ligados al Sexo Rojos son los animales de elección basándose en el tamaño de huevo (de grande a extra grande 50-65 g) y se usaron para los programas de inmunización. Se observaron la facilidad de manejo de los animales y el tamaño y uniformidad de los huevos junto con el número de huevos puestos por gallina por año. Aunque se podría usar cualquier gallina ponedora de huevos aviar, por coste y facilidad de uso, estas gallinas demostraron ser las que mejor funcionaron. El híbrido White Leghorn, W98 dio la mayor uniformidad y el mayor número de huevos por animal. Estos animales producen una

calidad de huevo de grande a extra grande (50-65 g) y hasta 300 huevos por año por gallina.

Ejemplo 2: Preparación de antígeno de PM para Inmunógeno

Se usó *Pasteurella multocida* (ATCC 15743) como una bacteria modelo. El organismo se aisló de ganado. Se siguió el procedimiento de la ATCC para la rehidratación de la solución madre. Las bacterias se rehidratan en 1,0 ml de TSB. Se usa Infusión de Cerebro Corazón (BHI, Acumedia) para estimular los antígenos de PM en las bacterias. Se inocula solución madre de TSB en Caldo BHI y se incuba a 37 °C durante 18-24 horas. Esto estimula el desarrollo de antígenos somáticos y de unión en las bacterias. Se inoculan los matraces que contienen Caldo BHI con el cultivo de Caldo BHI. Mientras que se agita lentamente, los matraces se incuban a 37 °C. Las placas de agar sangre se siembran en estrías para el aislamiento de las colonias para confirmar la morfología. Se observa un buen crecimiento después de 22 horas. Los matraces se combinan y el material se recoge usando centrifugación y solución salina estéril (al 0,9 %) a aproximadamente 3000 rpm durante 30 minutos. El material recogido se recoge en tubos. Se comprueba la densidad usando enumeración de espectrofotómetro y patrones de nefelómetro McFarland. El material se diluye hasta aproximadamente 1×10^9 por ml. Se añade solución de desoxicolato sódico (Difco) al cuatro por ciento (4 %) como una proporción 1:1 con el cultivo en solución salina estéril al 0,9 % (Herzberg, 1972) y se agita durante aproximadamente 18 horas a temperatura ambiente (de 22 ° a 24 °C). El material se centrifuga para eliminar células completas. El sobrenadante se usa como solución madre para el antígeno de PM. Se determina el peso seco en aproximadamente 14,9 mg/ml. El producto se diluye en PBS estéril, pH 7,4 hasta 1 mg/ml para el Inmunógeno de PM.

Ejemplo 3: Preparación de antígeno de PH para Inmunógeno

Usar solución madre de *P. haemolytica* (ATCC 14000) como solución madre para el antígeno de PH. El organismo se aisló de ganado. Se siguió el procedimiento de la ATCC para la rehidratación de la solución madre. Las bacterias se rehidratan en 1,0 ml de TSB. Se usa Infusión de Cerebro Corazón (BHI, Acumedia) para estimular los antígenos de PM en la bacteria. Se inocula solución madre de TSB en Caldo BHI y se incuba a 37 °C durante 18-24 horas. Esto estimula el desarrollo de antígenos somáticos y de unión en las bacterias. Se inoculan los matraces que contienen Caldo BHI con el cultivo de Caldo BHI. Mientras que se agita lentamente, los matraces se incuban a 37 °C. Se observa un buen crecimiento después de 22 horas. Las placas de agar sangre se siembran en estrías para el aislamiento de las colonias para confirmar la morfología. Los matraces se combinan y el material se recoge usando centrifugación y solución salina estéril (al 0,9 %) a aproximadamente 3000 rpm durante 30 minutos. El material recogido se recoge en tubos. Se comprueba la densidad usando enumeración de espectrofotómetro y patrones de nefelómetro McFarland. El material se diluye hasta aproximadamente 1×10^9 por ml. Se añade solución de desoxicolato sódico (Difco) al cuatro por ciento (4 %) como una proporción 1:1 con cultivo en solución salina estéril al 0,9 % (Herzberg, 1972) y se agita durante aproximadamente 18 horas a temperatura ambiente (de 22 ° a 24 °C). El material se centrifuga para eliminar células completas. El sobrenadante se usa como solución madre para el antígeno de PH. Se determina el peso seco. El producto se diluye en PBS estéril, pH 7,4 hasta 1 mg/ml para Inmunógeno de PH.

Ejemplo 4: Preparación de antígeno de HS para Inmunógeno

Se puede usar solución madre de *Haemophilus somnus* (ATCC 43626) como cultivo bacteriano de solución madre para el antígeno de HS. El organismo se aisló de ganado. Se siguió el procedimiento de la ATCC para la rehidratación de la solución madre. Las bacterias se rehidratan en 1,0 ml de TSB. Medio ATCC: se usa Medio 814 GC para estimular los antígenos de HS en la bacteria. Se inocula solución madre de TSB en Medio 814 GC y se incuba a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 18-24 horas. Esto estimula el desarrollo de antígenos somáticos y de unión en las bacterias. Se observa un buen crecimiento después de 22-48 horas. Las placas de agar sangre se siembran en estrías para el aislamiento de las colonias para confirmar la morfología. Los matraces se combinan y el material se recoge usando centrifugación y solución salina estéril (al 0,9 %) a aproximadamente 3000 rpm durante 30 minutos. El material recogido se recoge en tubos. La densidad se comprueba usando enumeración de espectrofotómetro y patrones de nefelómetro McFarland. El material se diluye hasta aproximadamente 1×10^9 por ml. Se añade solución de desoxicolato sódico (Difco) al cuatro por ciento (4 %) como una proporción 1:1 con cultivo en solución salina estéril al 0,9 % (Herzberg, 1972) y se agita durante aproximadamente 18 horas a temperatura ambiente (de 22 ° a 24 °C). El material se centrifuga para eliminar células completas. El sobrenadante se usa como solución madre para el antígeno de HS. Se determina el peso seco. El producto se diluye en PBS estéril, pH 7,4 hasta 1 mg/ml para Inmunógeno de HS.

Ejemplo 5: Preparación de antígeno de HSa para Inmunógeno

Usar solución madre de *Haemophilus suis* (ATCC 19417, H. parasuis) como solución madre para el antígeno de HSa. El organismo se aisló de porcino. Se siguió el procedimiento de la ATCC para la rehidratación de la solución madre. Las bacterias se rehidratan en 1,0 ml de TSB. Medio de la ATCC 5129: se usa Medio de Ensayo de *Haemophilus* para estimular los antígenos de HSa en la bacteria. Se inocula solución de TSB en Caldo N° 5129 y se incuba a 37 °C durante 24-48 horas. Esto estimula el desarrollo de antígenos somáticos y de unión en las bacterias. Los matraces que contienen Caldo N° 5129 o placas que contienen Medio N° 814 se inoculan con cultivo de Caldo de Solución Madre. Los matraces se incuban a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se observa un buen crecimiento después de 48

horas. Las placas de agar sangre se siembran en estrías para el aislamiento de las colonias para confirmar la morfología. Los matraces se combinan y el material se recoge usando centrifugación y solución salina estéril (al 0,9 %) a aproximadamente 3000 rpm durante 30 minutos. El material recogido se recoge en tubos. La densidad se comprueba usando enumeración de espectrofotómetro y patrones de nefelómetro McFarland. El material se diluye hasta aproximadamente 1×10^9 por ml. Se añade solución de desoxicolato sódico (Difco) al cuatro por ciento (4 %) como una proporción 1:1 con cultivo en solución salina estéril al 0,9 % (Herzberg, 1972) y se agita durante aproximadamente 18 horas a temperatura ambiente (de 22 ° a 24 °C). El material se centrifuga para eliminar células completas. Se usa el sobrenadante como solución madre para el antígeno de HSA. Se determina el peso seco. El producto se diluye en PBS estéril, pH 7,4 hasta 1 mg/ml para Inmunógeno de HSA.

10 Ejemplo 6: Preparación de Placas de ELISA usando Antígenos de PH, PM, HS y HSA para Controlar Anticuerpos en Huevos, Pollos y Pienso

ELISA de PH, PM, HS y HSA: se revistieron placas de ensayo de noventa y seis pocillos (fondo plano Costar) usando 100 µl/ml con diversas concentraciones de antígenos (10 µg-200 µg/ml) en tampón carbonato, pH 9,6. Las placas se incubaron entre 22° y 37 °C hasta durante 18 horas. Los pocillos se aspiraron para evitar contaminación cruzada. Las placas se bloquearon con 390 µl/pocillo de BSA al 0,5 % y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las placas se revistieron usando filas alternas de positivo o negativo para controles. Las placas se enjugaron una vez con tampón de lavado que contenía Tween™ 20. Se añaden cien microlitros por pocillo de muestra diluida a pocillos en pocillos por duplicado y se incuban a 37 °C durante una hora. Se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de pollo conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (Kirkegard and Perry Laboratories; 1:1000 a 1:3000). Después de una hora de incubación se añadió el sustrato (TMB, KPL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la reacción se detiene después de 10 minutos con ácido fosfórico 0,1 M. Se determinaron las densidades ópticas de los pocillos en un Lector de ELISA Dynatech a 450 nm y la información se registró para análisis posterior de datos.

Ejemplo 7: Análisis de Huevos Individuales y Suero A Lo Largo Del Tiempo

Se seleccionaron huevos en diversos periodos en el periodo de inmunización para controlar las respuestas de anticuerpos a los antígenos específicos. Se controlaron pollos seleccionados el día 0 y se siguieron con una base mensual después del cuarto mes. Se recogió el huevo completo de la cáscara y después se tomó una muestra de 1 ml. Esta muestra después se extrajo con tampón para analizar el contenido de anticuerpos. Se usaron los ELISA convencionales para los inmunógenos de PH, PM, HS y HSA para el análisis. Las lecturas negativas se restaron de las lecturas de DO.

30 Ejemplo 8: Inmunización de Pollos con el Inmunógeno de PH

Se inyectó a gallinas ponedoras de huevos seleccionadas, White Leghorn, de aproximadamente 19 semanas de edad el inmunógeno de PM de solución madre. Se administraron cuatro inyecciones (500 µg, 100 µg, 200 µg y 250 µg) separadas por una semana. Se recogió una muestra de suero dos semanas después de la última inyección inicial. Si se necesitaban refuerzos se administraron 100 µg en cada refuerzo (cada seis meses). En el intervalo de cuatro semanas, todas las gallinas produjeron excelentes anticuerpos en los huevos. Las lecturas de PH de ELISA eran de media 1,00 de DO para la dilución 1:10.000 y 0,265 de DO para 1:50.000.

Ejemplo 9: Inmunización de Pollos con Inmunógeno de PM

Se inyectó a gallinas ponedoras de huevos seleccionadas, White Leghorn, de aproximadamente 19 semanas de edad el inmunógeno de PM de solución madre. Se administraron cuatro inyecciones (500 µg, 100 µg, 200 µg y 250 µg) separadas por una semana. Se recogió una muestra de suero dos semanas después de la última inyección inicial. Si se necesitaban refuerzos se administraron 100 µg en cada refuerzo (cada seis meses). En el intervalo de cuatro semanas, todas las gallinas produjeron excelentes anticuerpos en los huevos. Las lecturas de PM de ELISA eran de media 1,42 de DO para la dilución 1:10.000 y 0,68 de DO para 1:50.000.

Ejemplo 10: Inmunización de Pollos con Inmunógeno de HS

Se inyectó a gallinas ponedoras de huevos seleccionadas, White Leghorn, de aproximadamente 19 semanas de edad el inmunógeno de HS de solución madre. Se administraron cuatro inyecciones (500 µg, 100 µg, 200 µg y 250 µg) separadas por una semana. Se recogió una muestra de suero dos semanas después de la última inyección inicial. Si se necesitaban refuerzos se administraron 100 µg en cada refuerzo (cada seis meses). En el intervalo de cuatro semanas, todas las gallinas produjeron excelentes anticuerpos en los huevos. Las lecturas de HS de ELISA eran de media 0,95 de DO para la dilución 1:10.000 y 0,250 de DO para 1:50.000.

Ejemplo 11: Inmunización de Pollos con Inmunógeno de HSA

Se inyectó a gallinas ponedoras de huevos seleccionadas, White Leghorn, de aproximadamente 19 semanas de edad el inmunógeno de HSA de solución madre. Se administraron cuatro inyecciones (500 µg, 100 µg, 200 µg y 250 µg) separadas por una semana. Se recogió una muestra de suero dos semanas después de la última inyección inicial. Si se necesitaban refuerzos se administraron 100 µg en cada refuerzo (cada seis meses). En el intervalo de

cuatro semanas, todas las gallinas produjeron excelentes anticuerpos en los huevos. Las lecturas de HSa de ELISA eran de media 1,40 de DO para la dilución 1:10.000 y 0,576 de DO para 1:50.000.

Ejemplo 12: Preparación de Reactivos de Huevo Completo de Producción de Solución Madre

- 5 Se combinaron gallinas seleccionadas de los cuatro grupos de inmunógeno a usarse para producir lotes de producción de reactivos de huevo completo. Sterling (Patente de Estados Unidos N° 5.753.228) presenta una excelente revisión de los usos para la selección de huevos y almacenamiento de los mismos. Los huevos se dividieron aleatoriamente y se retiró la cáscara. El huevo completo se mezcla bien y se pasteuriza usando condiciones convencionales (60 °C (140 °F) durante 3,5 minutos) Charley, H. y C. Weaver, 3ª Edición, Foods: a scientific approach, Merril-Prentice Hall, pág. 350, 1998). Una vez pasteurizadas, las muestras se ensayaron para actividad y se almacenaron a 4 °C hasta que se secaron o pulverizaron sobre vehículos. Se analizaron muestras de 250 µl.

Se dan los ejemplos de los resultados para los ELISA:

Huevo Completo Pasteurizado: mezclas de PM, PH, HS, HSa

Inmunógeno	Dilución	D.O.
PM	500	0,532
PM	2500-	0,113
PH	500	0,466
PH	2500	0,115
HS	500	0,338
HS	2500	0,128
HSa	500	0,588
HSa	2500	0,155

15 Ejemplo 13: Análisis de Aditivos de Pienso para Actividad de Anticuerpos

Se recogieron muestras del material de tres lotes. Las muestras se analizaron usando los sistemas de ELISA para los inmunógenos de PH, PM, HS y HSa para controlar la actividad después de la pasteurización y almacenamiento. Se registró una buena respuesta de anticuerpos después del procesamiento de los lotes de huevo completo. Los datos de tres lotes del procedimiento de producción del ejemplo 20 se dan en la siguiente tabla:

Lote: Líquido	Inmunógeno de <u>Pasteurella</u>	Señal/Ruido	Inmunógeno de <u>Haemophilus</u>	Señal/Ruido
Lote N° 1	0,347	5,32	0,111	2,68
Lote N° 2	0,188	2,92	0,175	2,93
Lote N° 3	0,272	2,98	0,138	1,91

20

Ejemplo 14: Ensayo sobre Ganado de Engorde Intensivo

- 25 Se trasladó a Idaho un grupo de 222 terneros de 2 fuentes diferentes. 109 terneros se procesaron el día 0 y 113 se procesaron el día 2. Todos los terneros recibieron una vacunación normal y procesamiento que incluye antibióticos diseñados para reducir el estrés por enfermedad y aumentar la ganancia diaria media y la eficiencia alimenticia. La mitad del grupo recibió el material mediante administración intranasal. Las dosis se inyectaron directamente en la fosa nasal (1,5 cc/fosa nasal: total 3 ml). Los animales se etiquetaron y controlaron durante 35 días. Todos los terneros se alojaron en el mismo redil. El grupo de Ensayo tenía N=111 y el grupo de Control tenía N=111. Se observó lo siguiente:

	Controles (n=111)		Ensayo (n= 111)	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Trasladados a Hospital	20	18	7	6
Tratados para Enfermedad Respiratoria	19	17	7	6
Muertes	3	3	0	0
Muertos por Enfermedad Respiratoria	2	2	0	0
Tratados de nuevo	5		3	

Ejemplo 15: Ensayo de Ganado de Engorde Intensivo

A mediados de verano se trasladó un grupo de 165 terneros de establo de venta. Los terneros se procesaron el día 0 y el día 2. Todos los terneros recibieron vacunación normal y procesamiento que incluye antibióticos diseñados para reducir el estrés por enfermedad y para aumentar la ganancia diaria media y la eficiencia alimenticia. La mitad del grupo recibió el material mediante administración intranasal. Las dosis se inyectaron directamente en la fosa nasal (1,5 cc/fosa nasal: total 3 ml). Los animales se etiquetaron y controlaron durante 35 días. El grupo de Ensayo tenía N=82 y el grupo de Control tenía N=83. Se observó lo siguiente:

	Controles (n=83)		Ensayo (n= 82)	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Trasladados a Hospital	36	47	24	28
Tratados para Enfermedad Respiratoria	36	43	22	25
Muertes	9		5	
Muertos por Enfermedad Respiratoria	8		4	
Tratados de nuevo 1X	14		12	
Tratados 2X	10		4	
Tratados 3X	4		3	
Tratados 4X	3		2	
Tratados 5X	6		1	
Coste del Tratamiento	1.291,44 \$		796,51 \$	
Coste Medio por Animal Tratado	35,87 \$		30,64 \$	

Ejemplo 16: Ensayo de Ganado de Engorde Intensivo

Se trasladaron a Idaho dos grupos de terneros. 77 terneros se procesaron el día 0 del primer grupo. La mitad de los grupos se procesó como Ensayo (n=39) y la otra mitad como Control (n=38). El segundo grupo de 78 se procesó del mismo modo el día 2. Todos los terneros recibieron vacunación normal, antihelmíntico, implantes y procesamiento que incluye antibióticos diseñados para reducir el estrés por enfermedad y para aumentar la ganancia diaria media y la eficiencia alimenticia. El grupo de Ensayo recibió el material mediante administración intranasal. Las dosis se inyectaron directamente en la fosa nasal (1,5 cc/fosa nasal: total 3 ml). Los animales se etiquetaron y controlaron durante 35 días. El grupo de animales de Ensayo que se trasladaron al hospital recibió material de refuerzo junto con tratamiento normal cada vez que pasaron por la manga de encierro. El ganado de control recibió solamente el tratamiento normal. El grupo de Ensayo tenía N=77 y el grupo de Control tenía N=78. Se observó lo siguiente:

	Controles (n=78)		Ensayo (n= 77)	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Trasladados al Hospital	18	23	13	17
Tratados para Enfermedad Respiratoria	18	23	13	17
Muertes	1		1	
Muertos por Enfermedad Respiratoria	1		1	
Tratados de nuevo 1X	6		5	
Tratados 2X	7		5	
Tratados 3X	3		3	
Tratados 4X	2		0	
Respuestas de RES	1		2	
Muertes de RES	1		1	
Tasa de Muertes		1,28		1,30
Coste del Tratamiento	691,49 \$		478,59 \$	
Coste Medio por Cabeza Traslada	38,42 \$		36,81 \$	
Coste del Tratamiento/Cabeza en el Redil	8,87 \$		6,22 \$	

Ejemplo 17: Ensayo de Terneros Destetados

- 5 Cuatro grupos de terneros se destetaron a aproximadamente 1000 a 2000 terneros por semana. Los terneros se procesaron como grupos pequeños. Todos los terneros recibieron vacunación normal, antihelmíntico, implantes y procesamiento que incluye antibióticos diseñados para reducir el estrés por enfermedad y para aumentar la ganancia diaria media y la eficiencia alimenticia. Todos los grupos recibieron el material mediante administración intranasal. Las dosis se inyectaron directamente en la fosa nasal (1,5 cc/fosa nasal: total 3 ml). Los animales se etiquetaron y controlaron durante 22 días. Los animales del grupo que se trasladaron al hospital recibieron material de refuerzo junto con tratamiento normal cada vez que pasaron por la manga de encierro. El grupo de ensayo tenía N=5000. Después de 22 días solamente 50 animales se había traslado por problemas respiratorios.

Ejemplo 18: Baldes para Lamer de Ensayo

- 15 El procedimiento de fabricación para los baldes para lamer es muy simple y sencillo. La fabricación de este ejemplo se realiza añadiendo material húmedo preparado y jarabe condensado de destilería a baldes convencionales para ajustar el contenido de humedad al alza. Los inventores sustituyeron material de secado y su material líquido para conseguir el mismo contenido de humedad que los baldes convencionales que actualmente se están preparando para conseguir un balde acabado con propiedades similares.

El ejemplo de Balde para Lamer fabricado por lotes total incluye los siguientes ingredientes:

Heces de destilería secadas con solubles (DDGS)	(1170 libras)	530 kg
Harina de gluten de maíz	(1365 libras)	619 kg
Heces de destilería húmedas (torta húmeda)	(465 libras)	210 kg
Premezcla de vitaminas y minerales	740 libras	340 kg
Óxido de magnesio	600 libras	272 kg
Anticuerpo mixto	540 litros	

Melazas de calidad alimentaria	(10 galones) (37,85 litros)	45 filtros
Inhibidor de mohos	(6 libras)	2,7 kg

El DDGS, harina de gluten de maíz, torta húmeda, inhibidor de mohos, premezcla y óxido de magnesio se disponen en un camión mezclador de 5 toneladas y se mezclan durante 5 minutos. Después se añade el material y las melazas. Esto se mezcla durante 30 minutos. El material resultante pesa aproximadamente 2553 kg 9-3-90 kg (veintiocho) (5.630 libras). Esta mezcla se descarga a través de una rampa de descarga lateral en baldes de plástico de 200 libras (90,72 kg) y después se comprime en un material sólido. Después los baldes se curan durante 48 horas hasta un producto marrón de tipo corteza muy duro con un olor dulce ligeramente a levadura.

En un experimento, un balde se puso cerca del ganado en un redil de novillos de 86-3-272 kg (ciento noventa y siete de 600 libras (272,16 kg)). El ganado en el corral de engorde de ensayo estaba muy interesado en este material. Visitan los baldes varias veces por día. El consumo fue aproximadamente 7,7 gramos/cabeza/día. Se prevé que el consumo por cabeza sería ligeramente superior si se pusieran más baldes en el redil.

Ejemplo 19: Desarrollo de la Cobertura

Una de las preparaciones clave se puede usar para la Cobertura. Se recoge huevo completo específico de gallinas inmunizadas con antígenos de PH, PM, HS y HAS en cantidades iguales para un total de 7-9 l. El material de huevo completo se añade a 2 l de PBS, pH 7,4, 4,5 l de melazas y 4 l de agua destilada. Esto se mezcla bien y se añaden conservantes tales como vitamina E de calidad alimentaria, vainilla, benzoato sódico, sorbato potásico y citrato sódico para evitar el crecimiento microbiano y para prolongar el periodo de validez. La cantidad total es de 18 l. La mezcla se agita para obtener una solución homogénea. Después la mezcla se pasteuriza en un Pasteurizador de Alimentos de The Schlueter Company. El material se enfría y almacena a 4 °C hasta que se usa.

Este material se vierte sobre la parte superior del pienso cuando es necesario. Habitualmente se distribuye una vez cada 7 días durante un total de tres aplicaciones.

Ejemplo 20: Desarrollo de Material para Aerosol o Pulverizador

Una de las preparaciones clave se puede usar para Aerosol o pulverizador. Se recoge huevo completo específico de gallinas inmunizadas con antígenos de PH, PM, HS y HAS en cantidades iguales para un total de 10 l. El material de huevo completo se añade a 6 l de PBS, pH 7,4 y 2 l de melazas. Esto se mezcla bien y se añaden conservantes tales como vitamina E de calidad alimentaria, vainilla, benzoato sódico, sorbato potásico y citrato sódico para evitar el crecimiento microbiano y prolongar el periodo de validez. La cantidad total es 1 SL. La mezcla se agita para obtener una solución homogénea. Después la mezcla se pasteuriza. El material se enfría y almacena a 4 °C hasta que se usa.

Este material se pulveriza directamente sobre las cabezas de los animales para formar un aerosol. El material también se puede verter en pistolas de presión tales como pistolas de chorro. Los vaqueros pueden llevar estas pistolas cargadas a la pradera o a los rediles de engorde intensivo y suministrar directamente al ganado cuando se necesite. El material se puede pulverizar directamente en la nariz de los animales individuales cuando se necesite. Esto lo convierte en un medio de aplicación muy versátil en la pradera. Habitualmente se distribuye una vez cada 7 días durante un total de tres aplicaciones o cuando se necesite.

Ejemplo 21: Ensayo Animal de Porcino

Un grupo de 77 cerdos de engorde de aproximadamente 27 kg (60 libras) se ensaya cada uno con material preparado en el Ejemplo 20 para Cobertura. A los animales se les administró el material como una cobertura los días 0, 7, 14 y 21. Las pérdidas medias en esta granja a lo largo de los últimos 5 años, debido al complejo respiratorio, fueron del 7,5 % y más del 30 % se medicaron durante los primeros 21 días de emplazamiento en los rediles. Durante el periodo de ensayo de 62 días, todos los animales estaban en un estado excelente y antes de lo previsto con 0 % de pérdidas y 0 % medicados.

Ejemplo 22: Ensayo Animal de Porcino

Un grupo de 80 cerdos de engorde de aproximadamente 22 kg (50 libras) y considerados los retrasados de los grupos se ensayaron con material preparado en el Ejemplo 20 para la Cobertura. A los animales se les administró el material como una cobertura los días 0, 7, 14 y 21. Las pérdidas medias en esta granja debido al complejo respiratorio fueron del 5 % durante los primeros 21 días y más del 30 % se medicaron. Estos eran los animales que no habían funcionado bien en el pasado. Esto era la media para la granja a lo largo de los últimos 5 años. Durante el periodo de ensayo de 55 días, todos los animales estaban en un estado muy bueno y antes de lo previsto y mejor que en el pasado con el 1,25 % de pérdidas y el 0 % medicados.

Cualquier microorganismo que coloniza la región nasofaríngea de las vías respiratorias de su huésped tiene que poseer la capacidad de pegarse o adherirse a la superficie de las membranas mucosas para multiplicarse. Los

organismos del complejo de neumonía respiratoria tales como *Pasteurella multocida*, *M. haemolytica*, *Haemophilus somnus*, virus de la gripe porcina y bacterias *Mycoplasma* no son ninguna excepción a la regla.

5 Otros microorganismos del grupo de los hongos y parásitos están incluidos en los organismos que pueden causar problemas respiratorios en animales o seres humanos. El inhibidor de adherencia de la presente invención interfiere fuertemente con la adherencia y con una base acumulativa evita de este modo que el microorganismo fijado como diana específico colonice y se multiplique y descienda por las vías respiratorias e infecte las vías respiratorias inferiores incluyendo los pulmones. Mediante el vehículo de una simple inyección nasal, pulverizador, por cobertura alimenticia o balde para lamer, el producto suministra esencialmente al huésped una preparación de anticuerpos específica diseñada no para curar ninguna enfermedad en el animal sino meramente para desalojar cualquier microorganismo residente y para evitar la unión de cualquier microorganismo recién introducido en las vías respiratorias altas. El inhibidor de adherencia no tiene ningún efecto directo sobre el propio huésped, es completamente natural, no deja en absoluto ningún residuo indeseable en los animales y, por tanto, no tiene ningún efecto en absoluto sobre los productos alimenticios finales. Además, ya que se evita que el microorganismo se multiplique, a lo largo del tiempo (por ejemplo, 21-30 días) desaparecerá por degradación natural del moco del animal, eliminando la potencial fuente significativa de contaminación en el corral de engorde. Gestionado de forma apropiada, el riesgo de contaminación cruzada de otros animales en el corral de engorde disminuye y se elimina esencialmente. Se podrían desarrollar aplicaciones similares para animales de compañía, animales zoológicos o animales no productores de alimentos o seres humanos. Ellos también tienen problemas respiratorios.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de adherencia microbiana que evita la adherencia de *Pasteurella multocida*, *Mannhiema haemolytica*, *Haemophilus somnus* y *Haemophilus suis* en las vías respiratorias de animales, en el que el inhibidor comprende la yema y el albumen de huevos de aves de gallinas inmunizadas con *Pasteurella multocida*, *Mannhiema haemolytica*, *Haemophilus somnus* o *Haemophilus suis*, en el que los huevos de diferentes gallinas se han mezclado de tal forma que el inhibidor comprende anticuerpos específicos para *Pasteurella multocida*, *Mannhiema haemolytica*, *Haemophilus somnus* y *Haemophilus suis*.
5
2. Un procedimiento para producir el inhibidor de adherencia microbiana de la reivindicación 1 que comprende:
 - A. Inocular a aves hembra, en o a punto de alcanzar su edad de puesta de huevos, *Pasteurella multocida*, *Mannhiema haemolytica*, *Haemophilus somnus* y *Haemophilus suis*;
10
 - B. Dejar un periodo de tiempo suficiente para permitir la producción en el ave de huevos de ave que contienen anticuerpos para *Pasteurella multocida*, *Mannhiema haemolytica*, *Haemophilus somnus* y *Haemophilus suis*;
 - C. Recoger los huevos puestos por las aves;
 - 15 D. Separar la yema y el albumen de dichos huevos de las cáscaras.
3. Uso del inhibidor de adherencia microbiana de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para prevenir infecciones respiratorias.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que: la yema y el albumen se obtienen de un huevo de pollo, pavo, pato, ganso, faisán, emú, paloma, avestruz o codorniz o cualquier combinación de los mismos.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 2, que incluye:

mezclar la yema y el albumen separados de dichos huevos con un material de soporte.
6. El procedimiento de la reivindicación 2, que incluye:
 - A. Mezclar la yema y el albumen separados de dichos huevos; y
 - B. Pasteurizar la yema y el albumen separados mezclados de dichos huevos para eliminar potenciales microorganismos patógenos.
25
7. El procedimiento de la reivindicación 6 que incluye:

Almacenar la mezcla pasteurizada de la yema y el albumen separados de dichos huevos en un material de soporte.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que: el material de soporte se selecciona entre un grupo de materiales que incluyen aceite de semilla de soja, melazas, heces secas destiladas y pulpa de remolacha.