

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 875**

51 Int. Cl.:

A61K 39/42 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 3/00 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2008 E 08779554 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2111234**

54 Título: **Procedimientos de liberación de esporoquistes de ooquistes usando fuerzas de cisión controladas**

30 Prioridad:

08.02.2007 US 900233 P
28.01.2008 US 20955

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2014

73 Titular/es:

EMBREX INC. (100.0%)
1040 SWABIA COURT RESEARCH TRIANGLE
PARK
DURHAM, NC 27703, US

72 Inventor/es:

HUTCHINS, JAMES EARL;
WILSON, KERRIANNE;
HARTMAN, ANGELA y
HARRIS, KELLY MICHELLE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 459 875 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de liberación de esporoquistes de ooquistes usando fuerzas de cisión controladas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para liberar los esporoquistes de ooquistes.

5 **Antecedentes**

La coccidiosis aviar es una enfermedad provocada por protozoos parásitos del género *Eimeria*. Los ooquistes de la especie *Eimeria* están por todas partes en el entorno y persisten durante muchos meses en las heces de las aves. La ingestión de los ooquistes provoca una infección de las diversas regiones del tracto intestinal de forma específica de especie. El organismo prolifera en el intestino durante un periodo de varios días, provocando la excreción de la siguiente generación de ooquistes en las heces. Los múltiples ciclos de infección provocan inmunidad y cuando la infección se presenta en un corral de forma temprana y en una dosis uniforme entre los miembros del grupo, la inmunidad que se desarrolla con el transcurso de los diversos ciclos de exposición puede ser bastante potente.

Por el contrario, cuando las aves no están expuestas a la infección de manera uniforme, pueden surgir situaciones en las que las aves no expuestas se vean sometidas a una infección repentina y masiva, que provoque malos resultados en términos de conversión del alimento y de subida de peso, y un gran riesgo de infecciones secundarias. Actualmente, el procedimiento más habitual que se usa para el control de la coccidiosis en la industria aviar no es la vacunación, sino la administración de fármacos anticoccidiosis en el pienso. La baja tasa de uso de la vacunación se atribuye, a menudo, a la inseguridad sobre la uniformidad de la dosis a través del alimento o el agua en las instalaciones de engorde o en la vacunación en la cámara de pulverización en el criadero, que son las vías y tiempos de administración tradicionales. Existe un creciente interés en mejorar la uniformidad de la administración de las vacunas durante la administración en el criadero y proporcionar así una protección más uniforme al conjunto de las aves.

Recientemente, se ha encontrado que las técnicas de vacunación *in ovo* son aplicables a la administración de una vacuna contra la coccidiosis basada en ooquistes (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.500.438; la patente de Estados Unidos N° 6.495.146 y la patente de Estados Unidos N° 6.627.205; todas de Pfizer, Inc.). La vía de administración *in ovo* proporciona un procedimiento conveniente de administrar una dosis uniforme de vacuna a cada embrión mientras todavía está dentro del huevo. La administración de las vacunas aviares *in ovo* se practica actualmente en aproximadamente 85% de los 9 billones de aves para carne que se producen en los Estados Unidos al año y un porcentaje cada vez mayor de los 21 billones de aves para carne que se producen fuera de los Estados Unidos al año (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.458.630 del gobierno de los Estados Unidos). Por lo tanto, el mercado potencial para una vacuna viva contra la coccidiosis administrada *in ovo* es considerablemente mayor que el actual mercado para las vacunas contra la coccidiosis que se administran después de la eclosión.

Los ooquistes de *Eimeria* contienen cuatro esporoquistes dentro de la pared protectora del ooquiste. Los esporoquistes pueden usarse para diversos fines, que incluyen vacunas, pruebas de viabilidad, producción de esporozoítos, etc. Los procedimientos convencionales de lisar los ooquistes y liberar los esporoquistes utilizan esferas de vidrio. La agitación de los ooquistes con las esferas de vidrio provoca que la pared del ooquiste se abra y libere los esporoquistes que contienen. Por ejemplo, Dulski et al (Avian Diseases, American Association of Avian Pathologists, vol. 32, n°. 2, 1 de enero de 1988, páginas 235-239) divulgan un procedimiento e liberar y purificar esporoquistes y esporozoítos a partir e ooquistes de *Eimeria tenella* usando mouluración de las esferas de vidrio a 200 rpm para liberar esporoquistes y usando gradientes de densidad en percoll para purificar. Otro procedimiento se describe por Coudert et al (Biotechnology Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research, 1995, páginas 52 a 73), que comprende una etapa de incubar los ooquistes a 4°C en hipoclorito sódico al 20% de acuerdo con el método de Hosek y col. (descrito más adelante), seguido de la alteración con un homogeneizador de Potter (teniendo cuidado de no usar demasiados golpes para evitar daños a los esporoquistes). Sin embargo, generalmente se necesita una agitación considerable para partir un gran porcentaje de los ooquistes, y la acción de agitación continuada puede degradar los esporoquistes liberados previamente. Con otros procedimientos convencionales para liberar los esporoquistes existen problemas similares, como por ejemplo el uso de una trituradora tisular para liberar los esporoquistes. Los esporoquistes liberados al principio del proceso pueden ser destruidos al continuar el proceso de triturado.

Otros procedimientos convencionales para liberar los esporoquistes de los ooquistes se realizan liberando químicamente los esporoquistes de los ooquistes. Habitualmente, los ooquistes se suspenden en un tampón que contiene, por ejemplo, gas CO₂. También puede incluirse clorhidrato de cisteína. Este procedimiento reduce los enlaces disulfuro de la región micropilar del ooquiste. Finalmente, los esporoquistes pueden liberarse a través de la caperuza micropilar laxa. Hosek y col. (J. of Protozoology, Vol 35, N°. 4, 1988 páginas 583-589) describen dejar los ooquistes reposar durante 24 horas a 4°C en hipoclorito sódico, seguido de agitación e incubación del sedimento de ooquistes lavado en una solución de exquistación durante de 1 a 2 horas a 41°C. Desafortunadamente, la liberación química por sí sola no siempre es un procedimiento eficaz para la liberación de los esporoquistes.

Como tales, los procedimientos convencionales para la liberación de los esporoquistes de los ooquistes esporulados son ineficaces y proporcionan únicamente una fracción de los esporoquistes viables potenciales disponibles. De acuerdo con esto existe la necesidad de formas mejoradas de liberar los esporoquistes de los ooquistes y que solucionen los problemas asociados a los procedimientos convencionales.

5 **Sumario**

A la vista de la exposición anterior, en el presente documento se proporciona un procedimiento para liberar esporoquistes de los ooquistes, comprendiendo el procedimiento: preparar una solución que contiene los ooquistes suspendidos en la misma; dejar que una corriente de alta presión de dicha solución colisione a velocidad ultrarrápida en un microcanal o cámara definida con precisión, en el que dicha presión alta varía de 7 a 41 MPa y en el que dicho microcanal o cámara está diseñada con una geometría fija y está configurada para acelerar la corriente de un producto a velocidades altas suficientes para romper las paredes de los ooquistes y liberar los esporoquistes viables; y recuperar los esporoquistes viables liberados de la solución. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se hace pasar una solución acuosa de ooquistes a través de una o más unidades de las cámaras del procesador Microfluidizer® bajo condiciones definidas de diámetro de la cámara, geometría de la cámara y presión. Los ooquistes impactan contra la pared de la cámara y se someten a fuerzas de cisión altas y controladas, rasgando la pared del ooquiste y liberando los esporoquistes intactos. Este procedimiento es particularmente eficaz para liberar los esporoquistes debido a que puede romperse un elevado porcentaje de paredes de los ooquistes, lo que permite recuperar un elevado porcentaje de esporoquistes. Además, se provocan pocos daños a los esporoquistes liberados permitiendo que un gran porcentaje de los esporoquistes recuperados sigan siendo viables.

20 En algunas realizaciones, los ooquistes se tratan para debilitar sus paredes antes de someter la solución a fuerzas de cisión controladas. Por ejemplo, los ooquistes pueden tratarse térmicamente, tratarse químicamente, tratarse enzimáticamente, o pueden someterse a diversas combinaciones del tratamiento térmico, químico y enzimático.

En algunas realizaciones, los esporoquistes recuperados se crioconservan para su almacenamiento. En algunas realizaciones, los esporoquistes recuperados se usan para preparar vacunas y/o para un ensayo de diagnóstico.

25 En algunas realizaciones, los esporozoítos se obtienen de los esporoquistes recuperados. Estos esporozoítos pueden usarse para preparar una vacuna y/o un ensayo de diagnóstico.

Los ooquistes de ejemplo de los que pueden recuperarse los esporoquistes, de acuerdo con realizaciones de la presente invención, son ooquistes de *Eimeria*, como por ejemplo ooquistes *Eimeria* que se seleccionan a partir del grupo que consiste en ooquistes de *E. maxima*, ooquistes de *E. mitis*, ooquistes de *E. tenella*, ooquistes de *E. acervulina*, ooquistes de *E. brunetti*, ooquistes de *E. necatrix*, ooquistes de *E. praecox*, ooquistes de *E. mivati* y cualquier combinación de los mismos; los ooquistes de *Eimeria* se seleccionan a partir del grupo que consiste en ooquistes de *E. meleagridis*, ooquistes de *E. adenoides*, ooquistes de *E. gallopavonis*, ooquistes de *E. dispersa*, ooquistes de *E. innocua*, ooquistes de y ooquistes de *E. subrotunda* y cualquier combinación de los mismos; los ooquistes de *Eimeria* se seleccionan a partir del grupo que consiste en ooquistes de *E. zuernii*, ooquistes de *E. bovis* y cualquier combinación de los mismos; los ooquistes de *Eimeria* se seleccionan a partir del grupo que consiste en ooquistes de *E. ahsata*, ooquistes de *E. bakuensis*, ooquistes de *E. crandallis*, ooquistes de *E. faurei*, ooquistes de *E. granulosa*, ooquistes de *E. intricata*, ooquistes de *E. marsica*, ooquistes de *E. ovinoidalis*, ooquistes de *E. pallida*, ooquistes de *E. parva*, ooquistes de *E. weybridgensis* y cualquier combinación de los mismos; y los ooquistes de *Eimeria* se seleccionan a partir del grupo que consiste en ooquistes de *E. intestinalis*, ooquistes de *E. vejvodskyi*, ooquistes de *E. piriformis*, ooquistes de *E. coecicola*, ooquistes de *E. irrisidua*, ooquistes de *E. flavescens*, ooquistes de *E. exigua*, ooquistes de *E. magna*, ooquistes de *E. perforans*, ooquistes de *E. media*, ooquistes de *E. stiedai* y cualquier combinación de los mismos.

Se proporcionan procedimientos para liberar esporozoítos de los ooquistes en los que una solución de ooquistes se somete a fuerzas de cisión controladas suficiente para romper las paredes de los ooquistes y liberar los esporozoítos de ellos. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se hace pasar una solución acuosa de ooquistes a través de una o más unidades de las cámaras del procesador Microfluidizer® bajo condiciones definidas de diámetro de la cámara, geometría de la cámara, y presión. Los ooquistes impactan contra la pared de la cámara y se someten a fuerzas de cisión altas y controladas, rasgando la pared del ooquiste y liberando los esporozoítos intactos.

50 Las realizaciones de la presente invención son ventajosas comparadas con los procedimientos convencionales. Por ejemplo, las realizaciones de la presente invención producen rendimientos repetibles, uniformes de esporoquistes. Por el contrario, los procedimientos convencionales con esferas de vidrio y molturación tisular no están adaptados para la producción a gran escala.

Breve descripción de los dibujos

55 Las Figuras. 1-2 son diagramas de flujo de las operaciones para liberar los esporoquistes de los ooquistes, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

La **Figura 3** es un diagrama de bloques de un procesador Microfluidizer®, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

La **Figura 4** es un diagrama de flujo de las operaciones para procesar los esporoquistes liberados, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

5 La **Figura 5** es un diagrama de flujo de las operaciones para procesar los esporoquistes liberados y escindir los esporozoítos de los esporoquistes liberados, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

Descripción detallada

10 A continuación, la presente invención se describe con más detalle haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran realizaciones preferidas la invención. La presente invención invención, sin embargo, puede realizarse de muchas formas diferentes y no debería interpretarse como que se limita a las realizaciones que se describen en la presente memoria descriptiva; sino que estas realizaciones se proporcionan de forma que esta descripción sea exhaustiva y completa, y que describa totalmente el ámbito de la invención para los expertos en la técnica.

15 Números iguales se refieren a elementos iguales en toda la descripción. En las figuras, el grosor de ciertas líneas capas, componentes, elementos o características puede exagerarse para mayor claridad. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias que se mencionan en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente memoria descriptiva por referencia en su totalidad.

20 La terminología que se usa en la presente memoria descriptiva únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares y no se pretende que limite la invención. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, las formas singulares "un", "una" y "el, la" se pretende que incluyan las formas plurales también, a no ser que el contexto claramente indique lo contrario. Se entenderá también que los términos "comprende" y/o "que comprende," cuando se usan en esta memoria descriptiva, especifican la presencia de características, etapas, operaciones, elementos, y/o componentes que se indican, pero no excluyen la presencia ni la adición de otra u otras características, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "y/o" incluye cualesquiera y todas las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, las frases como por ejemplo "entre X e Y" y "entre aproximadamente X e Y" deberían interpretarse como que incluyen X e Y. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, las frases como por ejemplo "entre aproximadamente X e Y" quieren decir "entre aproximadamente X y aproximadamente Y." Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, las frases como por ejemplo "de aproximadamente X a Y" quieren decir "de aproximadamente X a aproximadamente Y."

35 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos (incluidos los términos técnicos y científicos) que se usan en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que entiende habitualmente una persona de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Se entenderá además que los términos, como por ejemplo los que se definen en los diccionarios que se usan habitualmente, deberían interpretarse como que tienen un significado que es uniforme con su significado en el contexto de la memoria descriptiva y la técnica relevante y no debería interpretarse con un sentido idealizado ni excesivamente formal a no ser que se defina expresamente así en la presente memoria descriptiva. Las funciones o construcciones notorias pueden no describirse en detalle para mayor brevedad y/o claridad. La secuencia de operaciones (o etapas) no se limita al orden que se presenta en las reivindicaciones o figuras A no ser que se indique específicamente lo contrario.

40 Las realizaciones de la presente invención son adecuadas para liberar los esporoquistes de los ooquistes para usos médicos y veterinarios, así como para fines de diagnóstico y/o investigación. Los ooquistes pueden ser de un protozoo que infecte cualquier animal, que incluye sujetos mamíferos y aves. Los términos "animal" y "sujetos animales" incluyen, pero sin limitación, sujetos mamíferos y/o aves. Los sujetos mamíferos incluyen, pero sin limitación, sujetos primates (por ejemplo, sujetos humanos y sujetos primates no humanos como por ejemplo de simio), porcinos, bovinos (por ejemplo, vacuno), caprinos, equinos, felinos, ovinos, caninos, murinos (por ejemplo, ratón, rata) y sujetos lagomorfos.

50 Los términos "aviar" y "sujetos aviares" (es decir, "aves" y "sujetos aviares"), tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se pretende que incluyan machos y hembras de cualquier especie aviar, pero se pretende principalmente que incluyan aves que se crían comercialmente para huevos, carne o como animales de compañía. Por consiguiente, los términos "aviar" y "sujeto aviar" se pretende que incluyan particularmente, pero sin limitación, pollos, pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, periquitos, loros, cacatúas, ninfas, avestruces, emúes y similares. En realizaciones particulares, el sujeto aviar es un sujeto pollo o pavo. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un "ave" o "sujeto aviar" puede referirse a un embrión de ave *in ovo* o a un ave después de la eclosión.

55 Los términos "crioconservar" y "crioconservación" son bien entendidos por los expertos en la técnica de la presente invención y se refieren a conservar células y otros materiales por congelación y almacenando a temperaturas muy bajas.

La presente invención se refiere de forma general a procedimientos para liberar esporoquistes de ooquistes de

protozoos. Dichos procedimientos encuentran utilidad, por ejemplo, en procedimientos de fabricación de vacunas. Muchos protozoos forman una etapa vital denominada "ooquiste." La invención puede practicarse para liberar los esporoquistes de los ooquistes de cualquier especie de protozoos que contengan esporoquistes, que incluyen pero sin limitación *Eimeria*, *Cyclospora*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Isospora*.

- 5 La presente invención también puede referirse a procedimientos para liberar esporozoítos de ooquistes de protozoo. Algunos protozoos forman una etapa vital denominada "ooquiste" pero pueden contener esporozoítos en el ooquiste y no producir esporoquistes. Dichos procedimientos encuentran utilidad, por ejemplo, en procedimientos para liberar esporozoítos de ooquistes que incluyen pero sin limitación infección de líneas celulares, ensayos de infectividad, fabricación de vacunas, o ensayos de diagnóstico. La invención puede practicarse para liberar esporozoítos de
10 ooquistes de cualquier especie de parásito que contenga esporozoítos en el ooquiste, que incluyen pero sin limitación *Cryptosporidium* y *Plasmodium*.

- Los términos "protozoos," "ooquiste," "esporoquiste," "esporozoíto" y "merozoíto" tienen los significados aceptados en la técnica. A no ser que se indique lo contrario, estos términos se pretende que se refieran a protozoos, ooquistes, esporoquistes, esporozoítos y merozoítos vivos (es decir, viables), que incluyen formas atenuadas, aunque los expertos en la técnica apreciarán que las vacunas pueden formularse usando protozoos, ooquistes, esporoquistes, esporozoítos y merozoítos inactivados. Los expertos en la técnica entenderán que las vacunas con formas inactivadas se preparan habitualmente purificando primero el organismo vivo. También la presente memoria descriptiva engloba los protozoos, ooquistes, esporoquistes, esporozoítos y merozoítos genéticamente modificados.

- El término "*Eimeria*" indica una o más especies del género *Eimeria*. El término "*Eimeria*" incluye pero sin limitación cepas o especies de *Eimeria* que infectan aves (por ejemplo, pollo, pavo) o especies de mamíferos (por ejemplo, vacas, ovejas o conejos). Dichas especies de *Eimeria* incluyen las que se encuentran en los pollos, que incluyen, pero sin limitación, *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. mivati* y *E. brunetti*; y también las que se encuentran en pavos, que incluyen, pero sin limitación, *E. meleagrimitis*, *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. dispersa*, *E. innocua*, y *E. subrotunda*, y las que infectan el ganado vacuno como por ejemplo, pero sin limitación, *E. bovis* y *E. zuernii*; especies de *Eimeria* que infectan a las ovejas como por ejemplo, pero sin limitación, *E. ahsata*, *E. bakuensis*, *E. crandallis*, *E. faurei*, *E. granulosa*, *E. intricata*, *E. marsica*, *E. ovinoidalis*, *E. pallida*, *E. parva*, *E. weybridgeensis*; y las especies de *Eimeria* que infectan a los conejos que incluyen, pero sin limitación, *E. intestinalis*, *E. vejdvovskiyi*, *E. piriformis*, *E. coecicola*, *E. irrsidua*, *E. flavescens*, *E. exigua*, *E. magna*, *E. perforans*, *E. media*, y *E. stiedai*. Además, el término "*Eimeria*" incluye todas las cepas de las especies anteriores de *Eimeria* que incluyen, pero sin limitación, cepas de tipo silvestre, cepas precoces o cepas seleccionadas de otro modo, cepas atenuadas y ooquistes que han sido atenuados, por ejemplo, por radiación, tratamiento químico y similares. Además, el término "*Eimeria*" también incluye cualquier cepa o especie de *Eimeria* recién descubierta. Finalmente, el término "*Eimeria*" engloba *Eimeria*, vivos e inactivados aunque se pretende que sea *Eimeria* vivos a no ser que indique lo contrario.

- 35 Las composiciones que comprenden ooquistes de *Eimeria* encuentran utilidad en procedimientos de inmunizar aves contra la coccidiosis. Los procedimientos de vacunación de aves contra la coccidiosis son conocidos en la técnica e incluyen procedimientos de vacunación *in ovo* (por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.500.438; la patente de Estados Unidos N° 6.495.146 y la patente de Estados Unidos N° 6.627.205; Pfizer Inc.) y después de la eclosión (por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 3.147.186 de Auburn Research Foundation, la patente de Estados Unidos N° 5.055.292 y la patente de Estados Unidos N° 4.438.097, ambos de la National Research Development Corporation.

- El término "protozoo" incluye cepas de tipo silvestre, cepas precoces o cepas seleccionadas de otro modo, cepas atenuadas y ooquistes que han sido atenuados, por ejemplo, por radiación, tratamiento químico y similares. Además, el término "protozoos" también incluye cualquier cepa o especie de protozoo recién descubierta. Finalmente, el término "protozoos" engloba protozoos vivos e inactivados aunque se pretende que sean protozoos vivos a no ser que indique lo contrario. Los términos "producir," "produciendo" o "producción" de ooquistes, y similares generalmente se refieren al procedimiento de recolectar ooquistes de un animal y purificar los ooquistes del material fecal.

- Los procedimientos de producir ooquistes, como por ejemplo ooquistes de *Eimeria*, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 3.147.186 de Auburn Research Foundation, la patente de Estados Unidos n.º 4.544.548 de Internationale Octrooi Maatschappij "Octropa" B.V.; la patente de Estados Unidos n.º 4.863.731 de Unilever Patent Holdings; las publicaciones de patentes internacionales WO 00/50072 de Pfizer, Inc.; WO 03/020917 de Embrex, Inc.; y WO 02/37961 de Novus International, Inc.; Hammond et al., (1944) *Amer. J. Vet. Res.* 5:70; Hill et al., (1961) *J. Parasit.* 47:357; Jackson, (1964) *Parasitology* 54:87; Lotze et al., (1961) *J. Parasit.* 47:588; Schmatz et al., (1984) *J. Protozool.* 31:181; Whitlock, (1959) *Aust. Vet. J.* 35:310; Kowalik et al., (1999) *Parasitol. Res.* 85:496-499.

- En referencia a las **Figs. 1-2**, a continuación se describirán procedimientos para liberar los esporoquistes de los ooquistes esporulados, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. Inicialmente, los ooquistes esporulados pueden pretratarse térmicamente y/o químicamente y/o enzimáticamente para debilitar las paredes de los ooquistes (Bloque 100). El debilitamiento provocado por el tratamiento térmico, químico y/o enzimático provoca

que las paredes de los ooquistes sean más susceptibles a la alteración por las fuerzas de cisión que posteriormente se les aplican. Los tratamientos térmicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, calentar los ooquistes a entre 37°C y 41°C durante 0,5 hora a 2 horas. Los tratamientos químicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, solución de hipoclorito o soluciones acuosas que contienen dióxido de carbono disuelto y clorhidrato de cisteína, así como ácido taurodesoxicólico. Los tratamientos enzimáticos ejemplares incluyen, pero sin limitación, pepsina y diversas fosfolipasas, por ejemplo. El tratamiento térmico, químico y/o enzimático de los ooquistes esporulados es opcional y no es necesario en realizaciones de la presente invención. Además, tipos particulares de ooquistes esporulados pueden no requerir el pretratamiento para debilitar sus paredes. Pueden usarse diversas combinaciones de tratamiento térmico, químico y/o enzimático.

Se prepara una solución acuosa que contiene ooquistes esporulados en suspensión (Bloque 110). Las soluciones acuosas ejemplares incluyen, pero sin limitación, solución salina equilibrada de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato (PBS), medio RPMI, medio DMEM, o las soluciones anteriores combinadas con una proteína como por ejemplo caseína o un hidrolizado de proteínas como por ejemplo hidrolizado de caseína o hidrolizado de proteína de soja. La solución acuosa se somete después a fuerzas de cisión suficientes para romper las paredes de los ooquistes y liberar los esporoquistes de ellos (Bloque 120). Los esporoquistes liberados se recuperan de la solución acuosa (Bloque 130). Los esporoquistes recuperados pueden pasar a un procesamiento posterior (Bloque 140) y/o pueden crioconservarse (Bloque 150).

En referencia a la Fig. 2, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se somete una solución acuosa de ooquistes a fuerzas de cisión suficientes para romper las paredes de los ooquistes y liberar los esporoquistes de ellos (Bloque 120) haciendo pasar la solución acuosa a presión (por ejemplo, entre aproximadamente 13.790 kPa (2.000 psi) y aproximadamente 41.370 kPa (6.000 psi)) a través de una cámara del procesador Microfluidizer® (Bloque 122). Los procesadores Microfluidizer® están disponibles en Microfluidics Corporation, 30 Ossipee Road, Newton, MA. Los procesadores Microfluidizer® permiten que chorros de soluciones a presión elevada colisionen a velocidades ultrarrápidas en microcanales o cámaras definidos de forma precisa. (Pueden usarse otros equipos de alteración que incluyen, pero sin limitación, el Constant Cell Disruption System producido por Constant Systems Ltd., Daventry, Northants, NN11 4SD, Inglaterra, Reino Unido). Las realizaciones de la presente invención no se limitan al uso de las cámaras del procesador Microfluidizer®.

Una cámara del procesador Microfluidizer® somete una solución que fluye a través de la misma a fuerzas combinadas de cisión e impacto. Cada cámara está diseñada con una geometría fija, y se configura para que acelere el chorro de producto a velocidades altas. La configuración de geometría fija permite que las fuerzas de cisión aplicadas sean controladas y monitorizadas de forma precisa.

El control de las fuerzas de cisión se logra usando combinaciones definidas de geometría de la cámara, diámetro de la cámara, y presión aplicada. Otros aspectos del procedimiento controlado pueden incluir las características y la formulación de la solución que se usa, que incluye parámetros como por ejemplo viscosidad, gravedad específica, composición química, osmolalidad, pH y temperatura. Las condiciones optimizadas pueden ser determinadas por los expertos en la técnica usando procedimientos rutinarios. La uniformidad del procedimiento puede asegurarse realizando pruebas bajo condiciones definidas usando sólo tampón y determinando el caudal. El control del caudal mediante dicha prueba en función del tiempo da una indicación del desgaste del equipo u otros fallos del sistema, y pueden practicarse acciones correctoras para devolver el sistema a las condiciones de operación estándar.

Las cámaras del procesador Microfluidizer® de ejemplo que pueden usarse de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención incluyen cámaras con configuraciones con "forma de Y" y con "forma de Z". Las cámaras con forma de Y incluyen dos vías de flujo de admisión que convergen en un punto y salen en forma de una única vía de flujo. Las cámaras con forma de Z tienen una única vía de flujo con una vía con forma de Z. Las configuraciones de las cámaras para una recuperación óptima de esporoquistes pueden variar dependiendo de la especie. Por consiguiente, pueden seleccionarse diferentes configuraciones de las cámaras para los diferentes tipos de ooquistes. Además, las cámaras del procesador Microfluidizer® pueden estar dispuestas en serie.

Además, las cámaras del procesador Microfluidizer® pueden tener diámetros diferentes. Por ejemplo, pueden utilizarse diámetros de entre aproximadamente 75 micrómetros (μm) y aproximadamente 500 μm . Las cámaras del procesador Microfluidizer® de diferentes diámetros pueden estar también dispuestas en serie.

Los solicitantes han encontrado que las cámaras que tienen un diámetro que es sustancialmente igual o mayor que el diámetro de los ooquistes en solución son particularmente eficaces. Por ejemplo, para los ooquistes de *E. maxima*, que habitualmente tienen de aproximadamente 20 μm a 40 μm de diámetro, se prefiere una cámara de reacción con un diámetro de aproximadamente 300 μm . Sin embargo, también pueden usarse diámetros que varían en el intervalo de aproximadamente 75 μm a aproximadamente 400 μm . Habitualmente, la vía de flujo que se usa es la de configuración en Z, aunque también puede usarse una configuración en Y u otra configuración. Los caudales normalmente varían en el intervalo de aproximadamente 500 ml por minuto a aproximadamente 2000 ml por minuto a presiones que varían en el intervalo de 6895 kPa a 34.475 kPa. La cantidad de fuerza de cisión que habitualmente se requiere para liberar los esporoquistes de los ooquistes de *E. maxima* varía en el intervalo de aproximadamente $3,00 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ por minuto a aproximadamente $1,50 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ por minuto.

Para los ooquistes de *E. tenella*, que habitualmente tienen de aproximadamente 15 µm a 25 µm de diámetro, y *E. acervulina*, que habitualmente tienen de aproximadamente 10 µm a 15 µm de diámetro, se prefiere una cámara de reacción con procesador Microfluidizer® con un diámetro de aproximadamente 100 µm. Sin embargo, también pueden usarse diámetros que varían en el intervalo de aproximadamente 75 µm a aproximadamente 400 µm.

Habitualmente, la vía de flujo que se usa es la de configuración en Z, aunque también puede usarse una configuración en Y u otra configuración. Los caudales normalmente varían en el intervalo de aproximadamente 100 ml por minuto a aproximadamente 250 ml por minuto a presiones que varían en el intervalo de 6.895 kPa a 27.580 kPa. La cantidad de fuerza de cisión que habitualmente se requiere para liberar los esporoquistes de los ooquistes de *E. tenella* y *E. acervulina* varía en el intervalo de aproximadamente $1,00 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ por minuto a aproximadamente $3,00 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ por minuto

Para cualquier especie de ooquistes de *Eimeria*, pueden usarse condiciones que provocan fuerzas de cisión menores para liberar los esporoquistes de los ooquistes, especialmente cuando los ooquistes han sido pretratados térmica, química o enzimáticamente. Aunque pueden usarse pases múltiples a través de la cámara, se prefiere un único pase. Las realizaciones de la presente invención no están limitadas a un diámetro particular de la cámara para un ooquiste particular. Las realizaciones de la presente invención pueden utilizar cámaras que tienen todos los tipos de configuraciones y diámetros.

En referencia a la **Fig. 3**, se ilustra un procesador Microfluidizer® **200**. El procesador Microfluidizer® **200** que se ilustra incluye un depósito de admisión **202** que contiene una solución acuosa de ooquistes esporulados. La solución acuosa se presuriza y se bombea mediante una bomba **204** (por ejemplo, una bomba intensificadora de presión constante, etc.) a través de una cámara **206** (por ejemplo, una cámara con forma de Y, con forma de Z, etc.). Los ooquistes de la solución acuosa presurizada se someten a fuerzas de cisión e impacto en la cámara **206** que hacen que los esporoquistes sean liberados de las paredes de los ooquistes. La solución acuosa que contiene los esporoquistes liberados se recoge en el depósito de salida **208**.

En referencia de nuevo a la **Fig. 1**, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, puede determinarse el porcentaje de esporoquistes liberados y recuperados de los ooquistes (es decir, rendimiento de esporoquistes) (Bloque **160**). El rendimiento de esporoquistes puede evaluarse, por ejemplo, al microscopio. Los esporoquistes que se considera que se han recuperado calculados al microscopio pueden ser viables o no viables, o una mezcla de ambos. Sin embargo, puede no ser posible determinar el estado de viabilidad solo al microscopio. Por consiguiente, también puede realizarse una determinación del porcentaje de esporoquistes liberados que son viables (es decir, rendimiento de viabilidad). Determinar el rendimiento de viabilidad puede requerir que se realice un procedimiento *in vivo*. Los procedimientos *in vivo* apropiados pueden incluir administrar preparaciones de esporoquistes a sujetos aviares mediante cebado oral y comparar la producción de ooquistes resultantes con la obtenida con la administración de ooquistes intactos de número equivalente.

En referencia a la **Fig. 4**, los esporoquistes recuperados pueden procesarse de diversas formas y para diversos fines. Por ejemplo, pueden prepararse vacunas de los esporoquistes recuperados (Bloque **141**) y crioconservarse para su almacenamiento (Bloque **142**). En referencia a la **Fig. 5**, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, los esporoquistes recuperados pueden procesarse para liberar (es decir, obtener) los esporozoítos de ellos (Bloque **143**). Los esporozoítos liberados pueden usarse para preparar vacunas (Bloque **144**) o pueden usarse para algún otro fin. Las vacunas que se preparan a partir de los esporozoítos obtenidos pueden crioconservarse para su almacenamiento (Bloque **145**).

Cualquier tipo de ooquiste puede procesarse de acuerdo con realizaciones de la presente invención. Los ooquistes particularmente adecuados son los ooquistes de *Eimeria* que incluyen, pero sin limitación, ooquistes de *E. maxima*, ooquistes de *E. mitis*, ooquistes de *E. tenella*, ooquistes de *E. acervulina*, ooquistes de *E. brunetti*, ooquistes de *E. necatrix*, ooquistes de *E. praecox*, ooquistes de *E. mivati*, y cualquier combinación de los mismos, *E. meleagridis*, ooquistes de *E. adenoides*, ooquistes de *E. gallopavonis*, ooquistes de *E. dispersa*, ooquistes de *E. innocua*, ooquistes de y ooquistes de *E. subrotunda* y cualquier combinación de los mismos, *E. zuernii*, ooquistes de *E. bovis* y cualquier combinación de los mismos, *E. ahsata*, ooquistes de *E. bakuensis*, ooquistes de *E. crandallis*, ooquistes de *E. faurei*, ooquistes de *E. granulosa*, ooquistes de *E. intricata*, ooquistes de *E. marsica*, ooquistes de *E. ovinoidalis*, ooquistes de *E. pallida*, ooquistes de *E. parva*, ooquistes de *E. weybridgensis* y cualquier combinación de los mismos, *E. intestinalis*, ooquistes de *E. vej dovskyi*, ooquistes de *E. piriformis*, ooquistes de *E. coecicola*, ooquistes de *E. irresidua*, ooquistes de *E. flavescens*, ooquistes de *E. exigua*, ooquistes de *E. magna*, ooquistes de *E. perforans*, ooquistes de *E. media*, ooquistes de *E. stiedai* y cualquier combinación de los mismos.

Habiendo descrito la presente invención, se explicará la misma en mayor detalle en los siguientes ejemplos que se incluyen en la presente memoria descriptiva únicamente con fines ilustrativos y que no se pretende que limiten la invención.

Ejemplo 1

Se realizó una serie de experimentos para calcular la recuperación de esporoquistes y la ruptura de ooquistes con un amplio abanico de valores de los parámetros. Cada experimento usó un total de aproximadamente 2×10^8 ooquistes esporulados en 500 ml de HBSS (4×10^5 de ooquistes esporulados por ml); se tomó una submuestra para

5 su enumeración antes del tratamiento en el procesador Microfluidizer®. El diámetro de las cámaras a analizar variaba de acuerdo con la especie: 1) *E. maxima*: cámaras de 200, 300, 400 micrómetros de diámetro; 2) *E. tenella*: cámaras de 200, 300 micrómetros de diámetro; 3) *E. acervulina*: cámara de 125 micrómetros de diámetro. Se usó el modo de pase único. Se usaron presiones que variaban en el intervalo de 13.790 kPa (2.000 psi) a 41.370 kPa (6.000 psi), dependiendo del estudio. Después de pasar a través del procesador Microfluidizer®, el volumen total se ajustó a 1l con HBSS, la muestra se mezcló y se tomó una submuestra para su enumeración. Habitualmente, se realizaron tres réplicas de cada pase usando cada conjunto de condiciones.

10 Se determinó el porcentaje de esporoquistes recuperado y el porcentaje de ooquistes abiertos para cada experimento usando recuentos en un hematocitómetro. De forma ideal, tanto el porcentaje de esporoquistes recuperados como el porcentaje de ooquistes abiertos sería del 100%.

Liberación de esporoquistes de *E. acervulina* usando el procesador Microfluidizer®

Diámetro de la cámara (µm)	Presión			
	34 MPa		41 MPa	
	% de recuperación de esporoquistes	% de ooquistes abiertos	% de recuperación de esporoquistes	% de ooquistes abiertos
125 Y	54,26	48,18	49,46	75,61

Conclusiones de los experimentos en Microfluidizer® de *E. acervulina* 1:

- 15 1) Se observó que el porcentaje de los ooquistes de *E. acervulina* abiertos aumentaba al aumentar la presión usando la cámara de 125 micrómetros.
- 2) Los mejores resultados para la recuperación de los esporoquistes se obtuvieron usando la cámara de 125 micrómetros a 34 MPa (54% de recuperación).

Liberación de esporoquistes de *E. maxima* 1 usando el procesador Microfluidizer®

Diámetro de la cámara (µm)	Presión					
	14 MPa		20 MPa		27 MPa	
	% de recuperación de esporoquistes	% de ooquistes abiertos	% de recuperación de esporoquistes	% de ooquistes abiertos	% de recuperación de esporoquistes	% de ooquistes abiertos
200 Z	96,83	47,55	131,06	64,34	119,50	83,45
300 Z	109,55	79,07	106,03	89,91	95,33	93,98
400 Z	96,69	55,73	116,93	80,90	129,85	87,74

20 Los valores son la media de pruebas con al menos tres réplicas en un único pase.

Conclusiones de los experimentos en Microfluidizer® de *E. maxima* 1:

- 1) El procedimiento de liberación de los esporoquistes funcionó razonablemente bien para casi todas las combinaciones de diámetro de la cámara y presión que se analizaron.
- 25 2) La combinación de la cámara de 300 micrómetros y la presión de 20 MPa proporcionó unas condiciones estándar iniciales para la producción de esporoquistes de *E. maxima* 1 usando un procesador Microfluidizer®.

Liberación de esporoquistes de *E. maxima* 2 usando el procesador Microfluidizer®

Diámetro de la cámara	Presión		
	13 MPa	20 MPa	27 MPa

ES 2 459 875 T3

(μm)	% de recuperación de esporoquistes	% de ooquistes abiertos	% de recuperación de esporoquistes	% de ooquistes abiertos	% de recuperación de esporoquistes	% de ooquistes abiertos
200 Z	114,18	93,99	104,58	87,07	73,71	95,23
300 Z	93,47	85,95	115,43	91,01	110,31	92,80
400 Z	98,12	86,63	110,04	94,24	111,32	97,84

Los valores son la media de pruebas con al menos tres réplicas en un único pase.

Conclusiones de los experimentos en el procesador Microfluidizer® de *E. maxima* 2:

- 1) El procedimiento de liberación de los esporoquiste funcionó razonablemente bien para casi todas las combinaciones de diámetro de la cámara y presión que se analizaron.
- 5 2) La combinación de la cámara de 300 micrómetros y la presión de 20 MPa se consideró óptima.

Liberación de esporoquistes de *E. tenella* 1 usando el procesador Microfluidizer®

Diámetro de la cámara (μm)	Presión					
	13 MPa		20 MPa		27 MPa	
	% de recuperación de esporoquistes	% de Ooquistes abiertos	% de recuperación de esporoquistes	% de ooquistes abiertos	% de recuperación de esporoquistes	% de ooquistes abiertos
125 Y	50,33	54,16	68,46	71,88	98,18	84,04
200 Z	19,86	13,95	43,80	39,74	56,30	62,03

Los valores son la media de pruebas con al menos tres réplicas en un único pase.

Conclusiones de los experimentos en el procesador Microfluidizer® de *E. tenella* 1:

- 1) Se observó que la recuperación de esporoquistes y el porcentaje de ooquistes abiertos de *E. tenella* aumentó a aumentar la presión para ambas cámaras analizadas, tal como era de esperar.
- 10 2) Los mejores resultados se obtuvieron usando la cámara de 125 micrómetros a 27 MPa.

Las realizaciones de la presente invención proporcionan una alternativa repetible y escalable para la recuperación de esporoquistes a los procedimientos de liberación con trituradoras tisulares, esferas de vidrio y con sustancias químicas . Se proporciona una recuperación esencialmente cuantitativa de esporoquistes de *E. maxima* 1 y *E. maxima* 2 . Se observa una recuperación casi cuantitativa de los esporoquistes de *E. tenella*. La recuperación de los ooquistes de *E. acervulina* es de aproximadamente 40-50%.

Ejemplo 2

El uso de un equipo de lisis celular para liberar los esporoquistes requiere la optimización de las condiciones de liberación para asegurar la viabilidad de los esporoquistes liberados. La viabilidad puede evaluarse proporcionando una dosis de esporoquistes a las aves y enumerando la producción de ooquistes asociados resultantes de la infección. En condiciones variables de geometría de la cámara y presión del equipo de lisis celular, es posible liberar de forma eficaz los esporoquistes de los ooquistes en condiciones no viables. Es decir, la infección producida en las aves tras la administración de los esporoquistes puede disminuirse comparando con la lograda usando esporoquistes liberados mediante procedimientos tradicionales como por ejemplo esferas de vidrio. Las condiciones de geometría de la cámara y presión deben evaluarse cuidadosamente para asegurar que se producen esporoquistes viables.

Los esporoquistes se liberaron de los ooquistes de *E. acervulina* usando o esferas de vidrio o el procesador Microfluidizer® configurado con una cámara 100Z a 13 MPa o 34 MPa. Los esporoquistes liberados mediante cada procedimiento se administraron después a los pollos en un modelo de respuesta en función de la dosis usando 1000, 3000, y 5000 esporoquistes por dosis. Se usaron tres gallineros replicados para cada tratamiento, con nueve

aves por réplica. También se incluyó en la prueba un control de ooquistes a 1250 ooquistes esporulados por dosis que representaba 5000 esporoquistes. Los ooquistes se recogieron los días 4 a 7 después del cebado en una solución de 10% de ácido cítrico, 0,75% de peróxido de hidrógeno y 0,25% de ácido propiónico en agua. Las heces que contenían los ooquistes se llevaron a volumen uniforme usando agua, se mezclaron y se obtuvieron muestras. Los ooquistes se enumeraron usando el procedimiento de McMaster. Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

Efecto de la presión sobre la viabilidad de los esporoquistes de *E. acervulina*

Dosis	Tratamiento	Producción de ooquistes media por ave
1250	Control de ooquistes esporulados	5,18 x 10 ⁷
1000	Microfluidizer® a 13 MPa	1,22 x 10 ⁷ cd
	Microfluidizer® 34 MPa	2,85 x 10 ⁶ e
	Esferas de vidrio	1,58 x 10 ⁷ c
3000	Microfluidizer® a 13 MPa	3,93 x 10 ⁷ b
	Microfluidizer® 34 MPa	6,07 x 10 ⁶ de
	Esferas de vidrio	5,30 x 10 ⁷ ab
5000	Microfluidizer® a 13 MPa	1,00 x 10 ⁸ ab
	Microfluidizer® 34 MPa	7,61 x 10 ⁶ cd
	Esferas de vidrio	1,11 x 10 ⁸ a

Se realizaron comparaciones estadísticas entre los esporoquistes que recibieron los tratamientos. Las letras diferentes en común representan diferencias significativas a p= 0,05.

5 Los resultados indican que los esporoquistes producidos usando el procesador Microfluidizer® a 13 MPa eran tan viables como los esporoquistes producidos usando el procedimiento tradicional con esferas de vidrio a cada dosis, mientras que los esporoquistes producidos a 34 MPa usando el procesador Microfluidizer® eran significativamente menos viables que los producidos usando el procedimiento con esferas de vidrio a cada dosis. Por lo tanto, el abanico de presión que proporciona esporoquistes viables debe determinarse de forma experimental.

Ejemplo 3

10 Se observa que las especies más pequeñas de *Eimeria*, que incluyen *E. acervulina* (~12 micrómetros de longitud) y *E. tenella* (~20 micrómetros de longitud) son menos susceptibles a la cisión que las especies más grandes como *E. maxima* (~40 micrómetros de longitud). Generar niveles mayores de cisión al aumentar la presión en el sistema Microfluidizer® puede aumentar el rendimiento microscópico de los esporoquistes de los ooquistes para cualquier especie, pero es especialmente necesario para la liberación eficaz de las especies más pequeñas; sin embargo, el aumento de la presión también puede disminuir la viabilidad. Reducir la presión para mejorar la viabilidad de forma inherente sacrifica el rendimiento. Se han desarrollado pretratamientos para acondicionar la pared de los ooquistes para proporcionar tanto un mejor rendimiento microscópico como una mejor viabilidad.

20 Se realizó un estudio para examinar el efecto del pretratamiento de los ooquistes usando una combinación de una sal biliar (ácido taurodesoxicólico (TDCA), un entorno anaeróbico (dióxido de carbono en burbujas), y una temperatura caliente (37°C durante 1 hora). Los objetivos del estudio eran determinar la recuperación *in vitro* (mediante microscopio) y la viabilidad *in vivo* (mediante la producción de ooquistes) de los esporoquistes liberados.

25 Se establecieron los siguientes grupos de tratamiento: (1) ooquistes esporulados de *E. acervulina* de control; 1000 ooquistes esporulados por dosis; (2) esporoquistes producidos con esferas de vidrio de control; 4000 esporoquistes por dosis; (3) esporoquistes producidos con Microfluidizer® sin pretratamiento; cámara de 100 µm; 13.790 kPa ; 4000 esporoquistes por dosis; (4) esporoquistes producidos con Microfluidizer® con pre-tratamiento que incluye 0,75% de ácido taurodesoxicólico (TDCA) y dióxido de carbono burbujado a 37°C durante 1 h; cámara de 100 µm; 13.790 kPa ; 4000 esporoquistes por dosis; (5) esporoquistes producidos con Microfluidizer® con pre-tratamiento que incluye 0,75% de TDCA y dióxido de carbono burbujado a 37°C durante 1h;cámara de 100 µm; 20.685 kPa ; 4000 esporoquistes por dosis; (6) esporoquistes producidos con Microfluidizer® con pre-tratamiento que incluyen 0,75% de TDCA y dióxido de carbono burbujado a 37°C durante 1 h; cámara de 100 µm; 27.850 kPa ; 4000 esporoquistes por dosis. Los ooquistes intactos residuales y las cubiertas de los ooquistes se eliminaron de las preparaciones de esporoquiste usando Percoll. Las dosis de esporoquistes se administraron a las aves a 4.000 esporoquistes por dosis para proporcionar dosis equivalentes al control de 1.000 ooquistes por dosis, ya que cada ooquiste contiene cuatro esporoquistes.

35 La recuperación de los esporoquistes de los ooquistes se evaluó al microscopio. Los resultados para los materiales producidos con Microfluidizer® se resumen en la tabla siguiente:

Recuperación de esporoquistes de *E. acervulina* usando pretratamiento al microscopio

Tratamiento	Pre-tratamiento	Presión del Microfluidizer® (MPa)	Esporoquistes recuperados (%)
3	No	13	5,42
4	Si	13	33,70
5	Si	20	54,90
6	Si	27	65,48

El pretratamiento mejoró la recuperación de esporoquistes en aproximadamente seis veces a 13 MPa, y con presiones mayores se observó una mayor mejora de la recuperación por microscopio.

- 5 Para la evaluación *in vivo*, cada tratamiento usó 5 gallineros replicados con nueve aves por gallinero. Los tratamientos se administraron mediante cebado oral a las aves. Las heces se recogieron en una solución de 10% de ácido cítrico, 0,75% de peróxido de hidrógeno, y 0,25% de ácido propiónico en agua los días 4 a 7 después del cebado. Las heces que contenían los ooquistes se llevaron a volumen uniforme, se mezclaron y se obtuvieron muestras. Los ooquistes se enumeraron usando el procedimiento de McMaster.
- 10 La viabilidad de los esporoquistes producidos usando los procedimientos de liberación que se indica se evaluó comparando la producción de ooquistes por ave comparando con los esporoquistes producidos con esferas de vidrio de control. Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Viabilidad de los esporoquistes de *E. acervulina* liberados de ooquistes pretratados

Tratamiento	Ciclo vital de Eimeria	Pre-tratamiento	Procedimiento de liberación	Presión en el Microfluidizer® (MPa)	Producción de ooquistes media por ave	Viabilidad en porcentaje con esferas de vidrio Control
1	Ooquistes esporulados	NA	NA	NA	$3,00 \times 10^7$	NA
2	Esporoquistes	NA	Esferas de vidrio	NA	$2,97 \times 10^7$	100,0
3	Esporoquistes	No	Microfluidizer®	13	$2,58 \times 10^7$	86,9
4	Esporoquistes	Si	Microfluidizer®	13	$4,05 \times 10^7$	136,4
5	Esporoquistes	Si	Microfluidizer®	20	$2,41 \times 10^7$	81,1
6	Esporoquistes	Si	Microfluidizer®	27	$4,03 \times 10^7$	136,0

- 15 No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en términos de producción de ooquiste media por ave ($p > 0,05$). El pretratamiento proporcionó una viabilidad mejorada de los esporoquistes liberados en un amplio abanico de presiones. En algunos casos, la viabilidad de los esporoquistes liberados de los ooquistes pretratados mediante el procedimiento del Microfluidizer® era numéricamente superior que el de los esporoquistes liberados con esferas de vidrio. El efecto global del pretratamiento fue del doble, mejorando tanto la recuperación de los ooquistes durante la etapa de liberación como la viabilidad.
- 20

Lo anterior ilustra la presente invención y no debe interpretarse como limitante de la misma. Aunque se han descrito algunas realizaciones de ejemplo de la presente invención, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que son posibles muchas modificaciones. La invención se define mediante las siguientes reivindicaciones. .

REIVINDICACIONES

- 1.Un procedimiento para liberar los esporoquistes de los ooquistes, comprendiendo el procedimiento:
preparar una solución que contiene ooquistes en suspensión; dejar que una corriente de alta presión de dicha solución colisione a velocidad ultraalta en un microcanal o cámara definido con precisión, en el que dicha presión
5 alta varía de 7 a 41 MPa y en el que dicho microcanal o cámara está diseñado con geometría fija y está configurado para acelerar la corriente de un producto a velocidades altas suficientes para romper las paredes de los ooquistes y liberar los esporoquistes viables de ellos; y recuperar los esporoquistes liberados viables de la solución.
- 2.El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el dicha geometría fija está en una configuración en “forma de Y” o una configuración en “forma de Z”.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha solución se pasa bajo presión a través de la cámara una o más veces.
- 4.El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución comprende una solución acuosa.
- 5.El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la presión usada para liberar los esporoquistes de los ooquistes de *Eimeria maxima* varía de 7 a 34 MPa.
- 15 6. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la presión usada para liberar los esporoquistes de los ooquistes de *E. tenella* o *E. acervulina* varía de 7 a 27 MPa.
7. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que
 - (a) la cámara tiene una configuración en forma de Z o
 - (b) la cámara tiene una configuración en forma de Y.
- 20 8. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que:
 - (a) se proporciona una pluralidad de cámaras y además comprende seleccionar una cámara que tenga un diámetro que es sustancialmente igual o mayor que un diámetro de los ooquistes, y pasar la solución bajo presión a través de la cámara seleccionada, o
 - (b) se proporciona una pluralidad de cámaras en serie, teniendo cada cámara un diámetro respectivo diferente y que además comprende seleccionar una cámara que tenga un diámetro que es sustancialmente igual o más grande que un diámetro de los ooquistes y pasar la solución a presión a través de la cámara seleccionada.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende:
 - (a) tratar térmicamente los ooquistes para debilitar las paredes de los mismos antes de someter la solución al procedimiento de la reivindicación 1, o
 - (b) tratar químicamente los ooquistes para debilitar las paredes de los mismos antes de someter la solución al procedimiento de la reivindicación 1, o
 - (c) tratar enzimáticamente los ooquistes para debilitar las paredes de los mismos antes de someter la solución al procedimiento de la reivindicación 1, o
 - (d) usar una combinación de tratamiento térmico, químico o enzimático de los ooquistes para debilitar las paredes de los mismos antes de someter la solución al procedimiento de la reivindicación 1
- 35 10.El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende la crioconservación de los esporoquistes recuperados.
- 11.El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende preparar una vacuna y/o un ensayo de diagnóstico usando los esporoquistes recuperados.
- 40 12.El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende obtener esporozoítos de los esporoquistes recuperados.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende:
 - (a) determinar un porcentaje de los esporoquistes liberados de los ooquistes, o
 - (b) determinar un porcentaje de esporoquistes liberados que son viables.
- 45 14.El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los ooquistes son ooquistes de *Eimeria*.

- 5 15. Un procedimiento para liberar esporozoítos de ooquistes, comprendiendo el procedimiento: preparar una solución que contiene ooquistes en suspensión; dejar que una corriente de presión alta de dicha solución colisione a velocidad ultrarrápida en un microcanal o cámara definida con precisión, en el que dicha presión alta varía de 7 a 41 MPa y en el que dicho microcanal o cámara está diseñada con una geometría fija y está configurada para acelerar la corriente de un producto a velocidades altas suficientes para romper las paredes de los ooquistes y liberar los esporoquistes viables; y recuperar los esporoquistes viables liberados de la solución.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que dicha geometría fija es una configuración con "forma de Y" o una configuración con "forma de Z".
- 10 17. El procedimiento de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que dicha solución se pasa bajo presión a través de la cámara una o más veces.
18. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la solución comprende una solución acuosa.
19. El procedimiento de la reivindicación 15, que comprende tratar los ooquistes para debilitar sus paredes antes de someter la solución al procedimiento de la reivindicación 15.
- 15 20. El procedimiento de la reivindicación 15, que además comprende la crioconservación de los esporozoítos recuperados.
21. El procedimiento de la reivindicación 15, que además comprende preparar una vacuna y/o un ensayo de diagnóstico usando los esporozoítos recuperados.

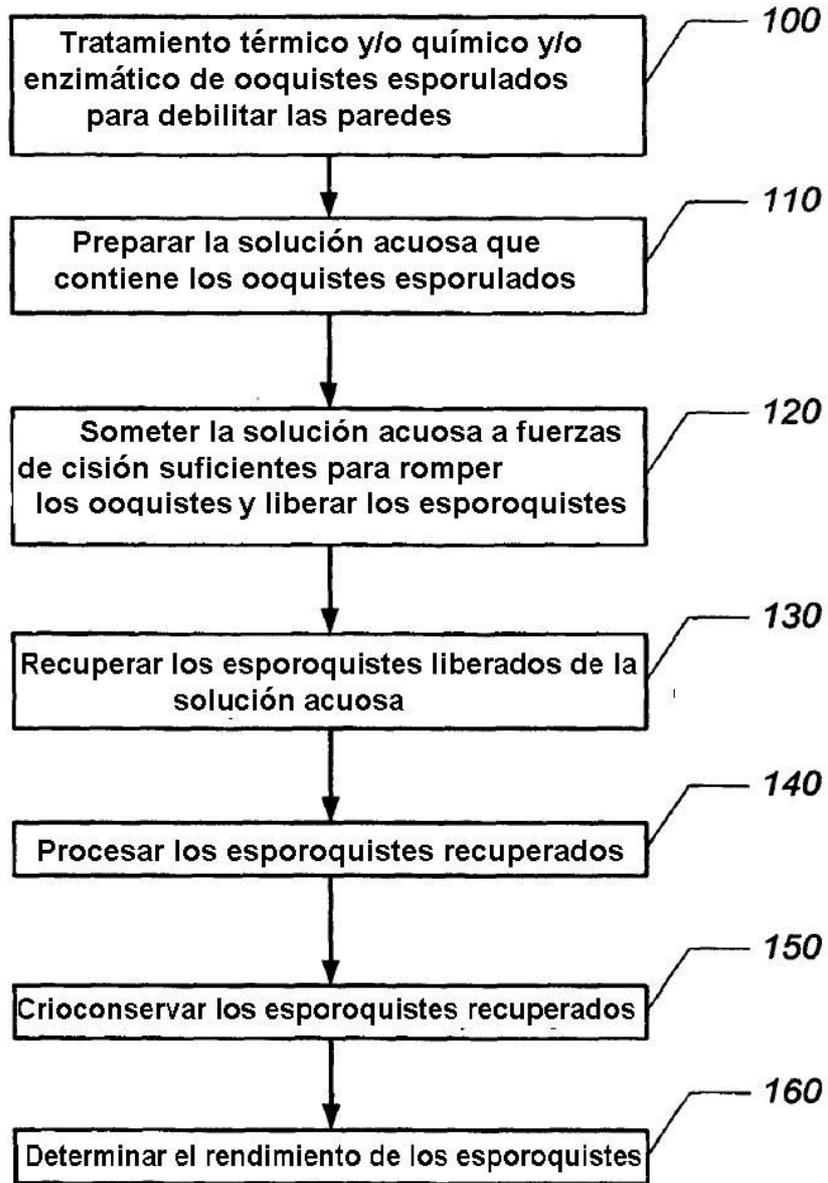


Fig. 1

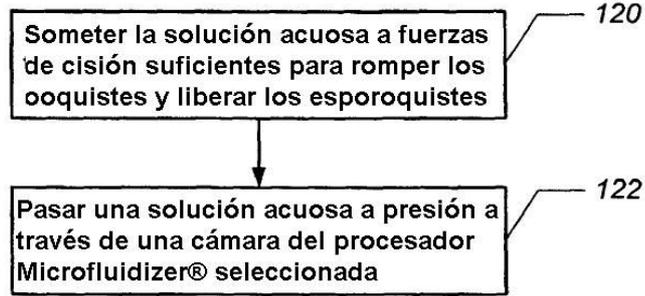


Fig. 2

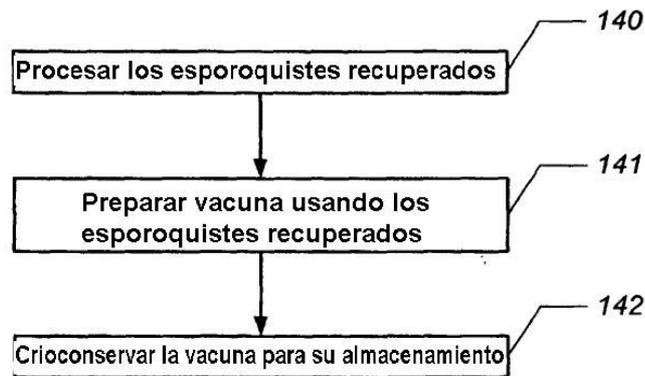


Fig. 4

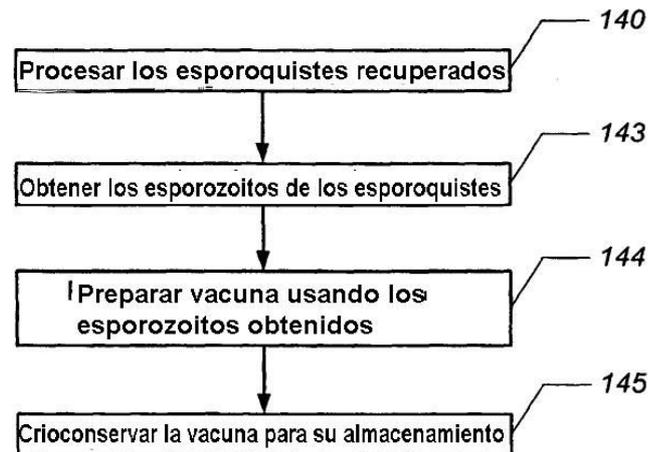


Fig. 5

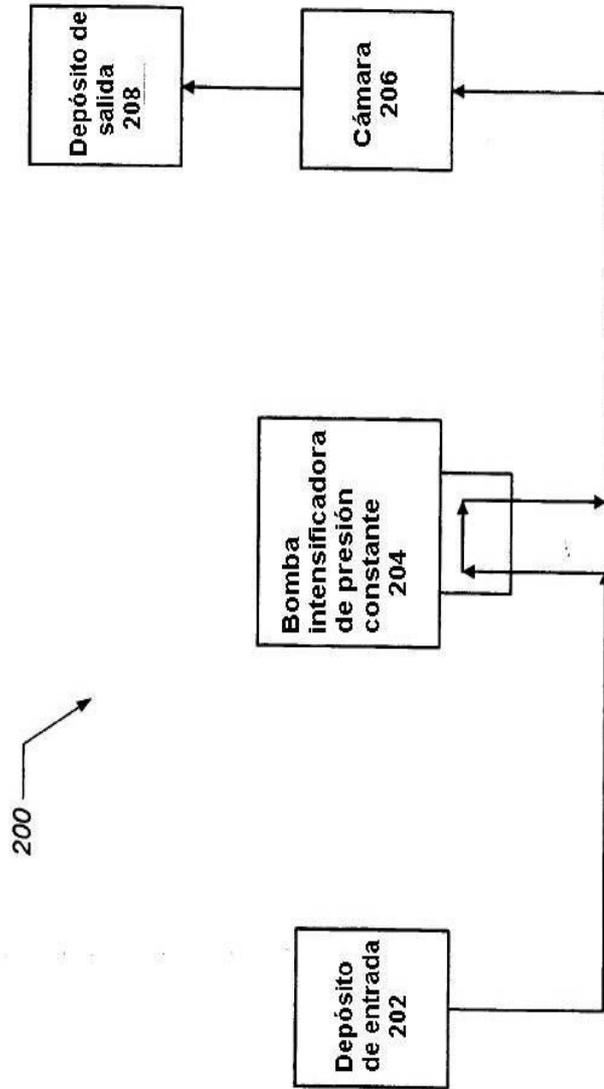


Fig. 3