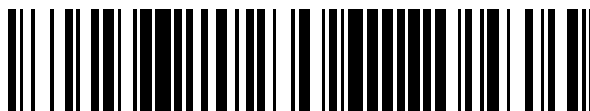


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 567**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/10** (2006.01)

**C12N 3/00** (2006.01)

**A61K 39/012** (2006.01)

**C12M 1/12** (2006.01)

**C12M 1/26** (2006.01)

**C12M 3/04** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2015** **PCT/EP2015/057298**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015** **WO15150513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2015** **E 15714489 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018** **EP 3126488**

54 Título: **Método para esporular oocistos de coccidio purificados de heces animales, los oocistos esporulados obtenidos por este método y una vacuna que contiene estos oocistos esporulados**

30 Prioridad:

**03.04.2014 EP 14163330**

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

**02.04.2018**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)**  
**Wim de Körverstraat 35**  
**5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**SCHETTERS, THEODORUS PETRUS MARIA y**  
**GEVERS, KOEN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 661 567 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

Método para esporular oocistos de coccidio purificados de heces animales, los oocistos esporulados obtenidos por este método y una vacuna que contiene estos oocistos esporulados

### Campo general de la invención

La invención se refiere a un método para esporular oocistos de coccidios purificados de heces animales. La memoria descriptiva también se refiere a oocistos esporulados obtenidos con este método y a una vacuna que contiene dichos oocistos esporulados.

### Antecedentes de la invención

La coccidiosis es una enfermedad de distintos animales en la que la mucosa intestinal es invadida y dañada por un protozoo de la subclase Coccidia. Los efectos económicos de la coccidiosis pueden ser especialmente graves en la industria avícola en la que el alojamiento intensivo de aves favorece la diseminación de la enfermedad. La infección por protozoos coccidios es, en su mayor parte, específica de la especie. Sin embargo, muchas especies pueden infectar un único huésped. Por ejemplo, hay siete especies de protozoos coccidios que infectan los pollos, seis de los cuales se consideran moderada a gravemente patógenos.

El ciclo vital del coccidio parásito es complejo. Por ejemplo, los protozoos del género Eimeria, Isospora, Cystoisospora, o Cryptosporidium normalmente solo necesitan un único huésped para completar su ciclo vital, aunque Cystoisospora puede utilizar un hospedador intermediario. En condiciones naturales, el ciclo vital comienza con la ingestión de oocistos esporulados del medio ambiente. Los oocistos son de forma ovoide a elipsoide, varían desde 10-48 µm de longitud por 10-30 µm de anchura, y pueden contener estructuras especializadas tales como protecciones polares, micrópilos, cuerpos residuales y cristalinos. Cuando los oocistos esporulados se ingieren por un animal susceptible, la pared del oocisto esporulado se rompe con el fin de liberar los esporocistos del interior. En las aves de granja, la liberación del esporocisto es el resultado de una destrucción mecánica del oocisto en el buche. En los esporocistos, están los esporozoítos que son el estado infectivo del organismo. En las aves de granja la rotura del revestimiento del esporocisto y la liberación de los esporozoítos se consigue bioquímicamente mediante la acción de la quimotripsina y las sales biliares en el intestino delgado. Una vez que se liberan, los esporozoítos invaden la mucosa intestinal o las células epiteliales en otras localizaciones. El sitio de infección es característico de la especie implicada. Por ejemplo, en el género Eimeria, la E. tenella se localiza en el ciego; E. necatrix se encuentra en la parte anterior y media del intestino delgado, E. acervulina y E. praecox se encuentra en la mitad superior del intestino delgado; E. brunetti se encuentra en el intestino delgado inferior, recto, ciego y cloaca; E. mitis se encuentra en el intestino delgado inferior, mientras que E. maxima se puede encontrar en cualquiera de estas localizaciones fisiológicas.

Una vez dentro de las células huésped de los animales, los esporozoítos se desarrollan en merontes multinucleados, también llamados esquizontes. Cada núcleo del meronte se desarrolla en un cuerpo infectivo llamado merozoíto que entra en nuevas células y repite el proceso. Después de un número variable de generaciones asexuales, los merozoítos se desarrollan en microgametocitos, o macrogametos. Los microgametocitos se desarrollan en muchos microgametos que, a su vez fertilizan los macrogametos. Entonces se forma un revestimiento resistente alrededor de los cigotos resultantes. Los cigotos enquistados se llaman oocistos y se diseminan sin esporular en las heces. Las aves infectadas pueden diseminar oocistos en las heces durante días o semanas. En condiciones adecuadas de temperatura y humedad, los oocistos se convierten en infectivos mediante el proceso de esporulación. Las aves susceptibles ingieren los oocistos esporulados mediante las actividades de picoteo normales o el forrajeo del suelo o las camas y el ciclo se vuelve a repetir. La ingestión de oocistos esporulados viables es el único medio natural de la infección. La infección con protozoos coccidios da como resultado inmunidad de manera que la incidencia de la enfermedad disminuye con el tiempo según los miembros de la bandada se vuelven inmunes. Esta naturaleza auto-limitante de las infecciones por coccidios es ampliamente conocida en pollos y otras aves de granja. La inmunidad que confiere, sin embargo, es específica del a especie de manera que la introducción de otras especies de protozoos coccidios dará como resultado otro brote de enfermedad.

La pared del oocisto del protozoo coccidio proporciona una barrera altamente eficaz para la supervivencia de los oocistos. Los oocistos pueden sobrevivir durante muchas semanas fuera del huésped. En el laboratorio, los oocistos intactos son resistentes a extremos de pH, detergentes, enzimas proteolíticas, glicolíticas, y lipolíticas, destrucción mecánica, y productos químicos tales como el hipoclorito sódico o el dicromato.

Se utilizan actualmente dos métodos para controlar la coccidiosis en las aves de granja. El primero implica el control por quimioterapia. Hay varios fármacos disponibles para el control de coccidiosis en las aves de granja. Debido al número de especies que producen la enfermedad, muy pocos fármacos son eficaces contra todas las especies, aunque un fármaco puede ser eficaz contra varias especies. En la producción moderna de pollos broiler, por ejemplo, la administración de fármacos para controlar la coccidiosis es rutinaria. El gasto de la medicación preventiva contra la coccidiosis supone un coste de producción considerable.

La vacunación de las aves contra la coccidiosis es una alternativa a la quimioterapia. Una ventaja de la vacunación es que puede reducir mucho o eliminar la necesidad de administrar fármacos anti-coccidios, reduciendo así los

costes para los productores de pollos, evitando el desarrollo de cepas resistentes a los fármacos, y disminuyendo los problemas de los consumidores por los restos de fármaco. Se han desarrollado numerosos métodos para inmunizar las aves de corral contra protozoos coccidios. Los métodos satisfactorios se han basado todos en la administración de protozoos vivos, sea como cepas completamente virulentas o cepas atenuadas. La vía más común de administración es la oral, aunque se han utilizado otras vías. Normalmente, los pollos se vacunan por administración oral sea directamente en la boca o mediante el pienso o el agua de oocistos esporulados viables.

Independientemente de la vía de administración, los procedimientos para la producción de vacunas de coccidiosis son bastante similares. En resumen, los protozoos coccidios se producen infectando animales huésped con una única especie de protozoos coccidios. Estas "reservas de semillas" a menudo son clónicas en la naturaleza, es decir, derivados de un único organismo con el fin de asegurar la presencia de solo la especie de interés. Las reservas de semillas pueden ser de tipo silvestre, es decir, aisladas del campo, o pueden ser cepas precoces o atenuadas. A los protozoos entonces se les permite someterse a replicación en el huésped, después de lo cual, los protozoos se recolectan de los animales, normalmente de la excreta. El uso de cepas atenuadas normalmente da como resultado pocos oocistos de diseminación del animal huésped. En una primera etapa del procedimiento de purificación, si fuera necesario, se separa una fracción gruesa que comprende materia particulada macroscópica de la excreta diluida. Los protozoos se separan entonces de la excreta diluida por técnicas bien conocidas tales como flotación en sal y centrifugación (para asegurar que no se purifique ninguna materia particulada tenga una densidad que sea más del 10 % diferente de la densidad de los oocistos con los oocistos). En el momento de la recolección, los protozoos están en el estadio del ciclo vital de oocisto no infectivo. Con el fin de que se vuelva infectivo, y por lo tanto útil para las vacunas, los oocistos se deben inducir para someterse a la esporulación. En los miembros del género *Eimeria*, la esporulación normalmente implica la incubación de oocistos en un 1 % a 4 % de solución acuosa de dicromato potásico a 19 °C a 37 °C, preferentemente alrededor de 28 °C (es decir, desde 27,5 a 28,5 °C) con aireación constante. La esporulación se completa normalmente en 12 a 48 horas dependiendo de la temperatura utilizada, y el rendimiento típico es que el 40-60 % de los oocistos viables presentes originalmente estén esporulados). El control del proceso de esporulación se consigue por examen microscópico de los protozoos. Las composiciones de almacenamiento que se encuentran en la técnica anterior incluyen normalmente una solución acuosa de dicromato potásico. Los oocistos esporulados se almacenan normalmente en una solución acuosa del 1 a 4 % de dicromato potásico para evitar el crecimiento bacteriano, sin embargo, se han utilizado otros medios de almacenamiento. El documento WO 02/37961 desvela métodos para la esporulación de oocistos de coccidios sin el uso de dicromato potásico. Para la esporulación, se proporcionar oxígeno a una mezcla con agitado de oocistos/hipoclorito sódico.

Las vacunas actuales disponibles para la prevención de la coccidiosis normalmente contienen un 2,5 % de peso respecto a volumen de solución y contienen aproximadamente 1.600 oocistos por dosis (4000 oocistos esporulados representan cuatro especies diferentes). Las vacunas actuales disponibles en el mercado contienen desde aproximadamente 0,016 mg de dicromato potásico por oocistos hasta aproximadamente 0,16 mg de dicromato potásico por oocisto. Aunque se ha utilizado ampliamente para la esporulación y el almacenaje, el dicromato potásico tiene varias propiedades que hace que su eliminación de los agentes biológicos sea altamente deseable. El dicromato potásico es un fuerte oxidante y se ha informado que afecta el sistema respiratorio, hígado, riñones, ojos, piel y sangre. Se sabe que es un carcinógeno y sus desechos se consideran como residuo peligroso. Debido a su alta toxicidad, los compuestos que contienen dicromato potásico son particularmente inadecuados para la administración parenteral. Por lo tanto, sería altamente ventajoso para eliminar el dicromato potásico para la producción es almacenaje de los materiales que se van a administrar a animales, especialmente el animales para alimentación.

## Objetivo de la invención

Es un objetivo de la invención concebir un método para esporular oocistos de coccidio, cuyo método mitigue al menos las desventajas de los métodos conocidos en la técnica anterior, para proporcionar un método que no dependa de la presencia de dicromato potásico mientras que sea capaz de conseguir un alto rendimiento de esporulación, preferentemente por encima del 60 %, más preferentemente incluso por encima del 80 %. También es un objetivo de la memoria descriptiva proporcionar una vacuna que contiene oocistos esporulados y no dicromato potásico.

## Sumario de la invención

En el fin de alcanzar el objetivo de la invención, se ha concebido un método de acuerdo con la sección **Campo general de la invención**, en el que el método comprende adicionalmente la provisión de oocistos purificados como una capa sobre una superficie de soporte, que mantiene la capa al menos de manera intermitente en un ambiente que contiene oxígeno gaseoso que tenga una humedad relativa de al menos un 15 % y mantener la temperatura de los oocistos entre 19 °C y 37 °C.

En los métodos de la técnica anterior, la esporulación implica la incubación de oocistos en una solución acuosa de dicromato potásico en constante aireación. Esto proporciona el agua necesaria, oxígeno y temperatura adecuados necesarios para que tenga efecto la esporulación. Sin embargo, el solicitante descubrió que es mejor mantener los oocistos, al menos de manera intermitente en un ambiente gaseoso más que en un ambiente acuoso como se

enseña en la técnica anterior. Se descubrió que de esta manera no es necesario el dicromato potásico, a condición de que los oocistos se mantengan lo suficientemente húmedos (por encima del 15 %, como se sabe por Waldenstedt et al, 2001 Poultry science 80:1412-1415) y la temperatura se mantenga en un nivel adecuado. También, el rendimiento de esporulación puede aumentar significativamente a niveles hasta del 80-100 %. La razón para esto no está completamente aclarada por puede estar parcialmente relacionada con el hecho de que en un ambiente acuoso en un matraz, incluso si se airea continuamente, sigue habiendo una cantidad significativa de espacio "muerto" en el que no hay aireación suficiente. También, la aireación continua da lugar a un volteo significativo de los oocistos en el matraz que da lugar a una carga mecánica continua sobre los oocistos. Esto puede explicar que parte de los oocistos viables se pierdan. También, puede ser que en una solución acuosa aireada, el nivel de oxígeno disponible sea demasiado bajo para favorecer la esporulación de una gran parte de los oocistos.

En cualquier caso, el solicitante descubrió que sometiendo los oocistos a un ambiente gaseoso cuando estaba presente en forma de una capa sobre una superficie de soporte, se podía conseguir una muy buena esporulación, sin necesidad de dicromato potásico, a condición de que los oocistos estén suficientemente húmedos y la temperatura de los oocistos se mantengan entre 19 y 37 °C, es decir, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 °C o cualquier valor entre estas temperaturas. Con respecto a la humedad, aunque puede ser suficiente una humedad relativa del 15 % para mantener la esporulación, se prefiere un nivel más alto ya que de esta manera, se disminuye el riesgo de que los oocistos de la capa estén demasiado secos. Por lo tanto, el nivel de humedad relativa del ambiente gaseoso puede tener cualquiera de los siguientes valores ( % de humedad relativa) hasta e incluyendo el 100 %: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99. A una humedad relativa del 100 % se formará una fina película de agua sobre la capa de oocistos. El solicitante descubrió que dicha capa fina no tiene un efecto perjudicial sobre el proceso de esporulación a condición de que se mantenga el transporte de gas (por ejemplo del oxígeno consumido por los oocistos y los gases resultantes producidos por los oocistos) por difusión con el uso y/o producción de gas por los oocistos. Dicha capa delgada de agua sigue significando que eficazmente la capa de oocistos se puede considerar que está presente en un ambiente gaseoso en el sentido de la presente invención.

De acuerdo con la invención, los oocistos esporulados se pueden obtener con un rendimiento adecuado, en el que los oocistos esporulados no contienen restos de dicromato potásico y por lo tanto, una vacuna basada en dichos oocistos tampoco contienen esta sal. También se describe una composición que contiene oocistos de coccidio esporulados obtenibles por un método de doble filtrado como se ha descrito anteriormente en el presente documento, los oocistos de coccidio tienen dimensiones entre una Dmin y Dmáx, en el que la composición contiene partículas que tienen dimensiones entre Dmin y Dmáx cuyas partículas que tienen una densidad diferente de la densidad de los oocistos.

### Definiciones

Una preparación de oocistos purificada de las heces significa que al menos un 90 %, en particular 91, 92, 93, 94, 95 % o más de material no oocistos se retira de las heces en las que se excretan los oocistos.

Un objeto macroscópico es un objeto que se puede ver a simple vista sin ayuda. Normalmente, significa que el objeto tiene una dimensión de al menos aproximadamente 0,1 mm.

Una partícula es un objeto localizado microscópico o macroscópico al que se adscriben propiedades físicas tales como volumen y peso. Las partículas típicas presentes en las heces de animales son granos de arena, partículas de barro, partículas de arcilla, restos de plantas (digeridas y sin digerir), gotas de aceite, bacterias, virus, arenilla, piedrecillas, etc.

La abertura de malla de una plataforma de filtro es igual al diámetro de un círculo imaginario que se ajusta a la abertura actual en la plataforma. Una abertura de malla está inherente "alrededor" de un tamaño predeterminado ya que una superficie con múltiples aberturas de malla no se puede hacer con exactamente la misma dimensión de todas las aberturas, y también se somete a variaciones bajo la carga mecánica, (peso sobre la plataforma del filtro, vibración, etc.). Una abertura de malla normalmente es una media eficaz alrededor de un tamaño determinado "X". En la práctica, el tamaño actual de una abertura puede variar entre 0,9 y 1,1 veces la X, en particular entre 0,95 y 1,05 veces X, y preferentemente entre 0,98 y 1,02 veces X.

Para un objeto que se extiende en una dirección significa que el objeto al menos se extiende parcialmente en esa dirección, preferentemente que se extiende sustancialmente en esa dirección, es decir, el objeto se extiende en esa dirección más que en cualquier otra dirección.

### Realizaciones

En una primera realización del método de acuerdo con la invención el espesor de la capa es menor de 10 mm. El solicitante descubrió que cuando el espesor de la capa es como mucho igual a la dimensión transversal máxima

regular de una deposición de pollo, que es aproximadamente de 10 mm, una parte sustancial de los oocistos, si no casi todos, pueden esporular. Los solicitantes reconocen que la dimensión de una deposición de pollo regular es de manera que incluso los oocistos en el fondo de la deposición pueden esporular en el ambiente gaseoso donde residen (es decir, un alojamiento regular de pollos). En otras palabras, una capa de alrededor de 10 mm de espesor puede permitir la difusión de oxígeno de manera que una parte sustancial de oocistos pueden esporular. El espesor puede estar incluso por debajo de 9 mm, 8 mm, 7 mm, 6 mm, 5 mm, 4 mm, 3 mm, 2 mm o 1 mm. Normalmente el espesor de la capa está entre 0,5 y 5 mm.

En una realización próxima la superficie de soporte es una plataforma perforada que es capaz de dejar pasar el agua. En esta realización la capa de oocistos se puede mantener húmeda proporcionando agua a la capa (por ejemplo, en forma de una niebla, ducha, pulverizado, corriente, etc.) pero sigue, como el agua puede atravesar la capa mediante la plataforma perforada, la capa puede permanecer en esencia en un ambiente gaseoso de acuerdo con la invención. En una realización adicional la superficie de soporte tiene aberturas de malla alrededor de la dimensión mínima ( $D_{min}$ ) de los oocistos. Se descubrió que si las aberturas de malla están alrededor de la  $D_{min}$ , cualquier oocisto que tuviera la menor dimensión de  $D_{min}$  se obstruye al pasar la plataforma perforada mientras que las bacterias, virus, agrupaciones proteicas y otras partículas que tengan una dimensión típica menor de la  $D_{min}$  puede pasar la plataforma junto con el agua. Esto proporciona una etapa de limpieza extra de los oocistos mientras esporulan. En los métodos de la técnica anterior, las bacterias y virus permanecen en el matraz con los oocistos. En principio, sin embargo, puede sobrevenir una situación crítica si la fracción acuosa que se va a filtrar tuviera demasiadas partículas no oocísticas que tengan una dimensión justo debajo de la  $D_{min}$ , ya que dichas partículas normalmente también de alguna manera se obstruiría y de esta manera permanecerían como una contaminación en la capa de oocistos. Sin embargo, dichas partículas críticas parece que no están presentes (no perceptibles razonablemente) en las heces animales, y por lo tanto, el uso de un tamaño de malla alrededor de la  $D_{min}$  parece perfectamente adecuado para mantener los oocistos en la superficie de soporte mientras que las partículas más pequeñas pasarán por esta superficie perforada. En otra realización más la superficie de soporte tiene aberturas de malla de alrededor de 10  $\mu m$ . Las aberturas de malla de este tamaño parecen ser idealmente adecuadas para mantener una capa de oocistos de cualquier tamaño, incluso si por ejemplo, los oocistos que se van a purificar varían de tamaño entre 20-35  $\mu m$  de longitud y 20-30  $\mu m$  de anchura. El tamaño de las aberturas, es decir, de 10  $\mu m$ , parece ser adecuado para mantener los oocistos de distintos tamaños de la superficie de soporte y aun así, puede lavarse cualquier partícula "fina" (normalmente, bacterias, virus u otros microorganismos) menores de 10  $\mu m$  utilizando agua para aclarar la capa.

En una realización, la superficie de soporte está en forma de una plataforma perforada sin fin. En esta realización la capa podría proporcionarse en el interior o exterior de la plataforma. Esto permite que esté disponible una superficie relativamente grande para soportar la capa mientras que la huella es relativamente baja. En una realización adicional la plataforma tiene forma de tambor. De esta manera se puede proporcionar fácilmente una distribución uniforme de los oocistos en la capa con el fin de asegurar unas circunstancias comparables a lo largo de la capa. En una realización adicional más, la plataforma sin fin se coloca parcialmente en un volumen de agua y parcialmente en un ambiente gaseoso, montado con su eje longitudinal entendiéndose en paralelo con una superficie es este volumen de agua y en el que la plataforma rota para mantener la capa al menos intermitentemente en el oxígeno que contiene el ambiente gaseoso. De esta manera, los oocistos de la capa se pueden mantener en un alto nivel de humedad, hasta el 100 %, incluso aunque el ambiente gaseoso esté relativamente seco, simplemente porque los oocistos viajan intermitentemente a través del volumen de agua. Esto parece ser una forma simple, pero muy adecuada para proporcionar dos necesidades principales para la presente invención: mantener los oocistos al menos intermitentemente en un ambiente gaseoso y evitar que se sequen. Rotando el tambor los oocistos de la capa rotan parcialmente en la parte superior del tambor que está en un ambiente gaseoso, y parcialmente en la parte inferior del tambor que está en un ambiente acuoso. El posicionamiento de la plataforma sin fin en el volumen de agua es normalmente de manera que al menos del espacio interno de la plataforma sin fin está sumergido en el agua, o incluso solamente el 5-30 % o 5-20 %. Preferentemente, el tambor rota a unas rpm de manera que la capa viaja a una velocidad de 10 metros/min (m/min) a 40 m/min, siendo la velocidad circunferencial del tambor. Por debajo de esta velocidad puede que los oocistos de la capa, a baja humedad relativa del ambiente gaseoso, se sequen demasiado, mientras que por encima de 40 m/min los oocistos pueden afrontar demasiadas fuerzas mecánicas y se dañen. Para un tambor que tenga un diámetro de 80 cm, el nivel correspondiente de rpm es de 50-20 rpm. La velocidad circunferencial correspondiente parece ser idealmente adecuada, en particular cuando se combina con un nivel de inmersión del 5-30 % (como se ha indicado anteriormente en el presente documento) para proporcionar una duración adecuada de la capa en el ambiente gaseoso mientras que se previene al mismo tiempo que la capa se seque demasiado a través del intervalo de humedad relativa permitida para el ambiente gaseoso.

En una realización, la capa de oocistos se proporciona en la superficie interna de la plataforma sin fin. Esta realización hace fácil mantener los oocistos sobre la superficie de soporte. Aunque debido a la rotación de la capa a través del volumen de agua, al menos una parte de los oocistos de la capa pueden dejar la capa y durante un tiempo permanecer en el volumen de agua, en último término se recogen de nuevo por la plataforma rotatoria.

En otra realización el volumen de agua se mantiene a una temperatura entre 19 °C y 37 °C. En esta realización, el agua se utiliza para mantener la temperatura de los oocistos en un nivel adecuado que ayude a la esporulación. Preferentemente, el volumen de agua se mantiene a una temperatura de aproximadamente 28 °C que es la

temperatura ideal para mantener la esporulación.

En otra realización más, después de la esporulación de los oocistos, se proporciona un medio acuoso adicional con un anti-infeccioso a la capa, después de lo cual la capa se lava para retirar el anti-infeccioso. En esta realización, se pueden retirar los contaminantes restantes mientras la capa se mantiene intacta. En la técnica anterior el lavado de los oocistos esporulados con un anti-infeccioso también se había descrito, pero para estos los oocistos se tienen que sacar del matraz de esporulación y tratarse en un procedimiento de lavado por separado.

En otra realización más en la que la superficie de soporte es una plataforma de filtro que tiene una abertura de malla alrededor de la dimensión mínima de los oocistos ( $D_{min}$ ), la capa fina se proporciona recolectando heces de animales que contienen los oocistos de coccidio, diluyendo las heces en un medio acuoso, y separando una fracción gruesa que comprende el material particulado macroscópico de las heces diluidas, y recolectando la fracción acuosa que contiene los oocistos filtrando la fracción acuosa sobre una primera plataforma de filtro distinto de la dicha superficie de soporte. La primera plataforma de filtro tiene aberturas de malla que dejen pasar los oocistos con el fin de obtener un filtrado acuoso que comprende los oocistos y un residuo en la primera plataforma de filtro que comprende partículas mayores que los oocistos, y después filtrar el filtrado acuoso sobre dicha superficie de soporte. El solicitante descubrió que aplicando un procedimiento de filtrado en dos etapas, los oocistos se podían purificar a un nivel adecuado a partir de la fracción acuosa de las heces. En la primera etapa de filtrado las partículas más gruesas que los oocistos (normalmente, granos de arena, barro y restos de plantas) se pueden retirar, mientras que en la segunda etapa de filtrado las partículas más pequeñas que los oocistos (normalmente, bacterias, virus, restos digeridos de plantas, aglomerados proteicos, gotas de aceite, et.) se pueden retirar. El filtrado se puede aplicar (semi-) continuamente y la cantidad de agua presente en la fracción acuosa en relación con la cantidad de oocistos no se une con un máximo económico: el agua en último término pasa la segunda plataforma de filtro mientras que los oocistos purificados se mantienen como una capa fina restante en esta plataforma. De esta manera, se puede utilizar eficazmente el agua para obtener una buena acción filtrante y de limpieza.

En la técnica, el filtrado nunca se había utilizado, ni siquiera sugerido como método para purificar los oocistos de coccidio de las heces. Aunque se ha utilizado el filtrado para retirar una fracción gruesa de las heces, nunca se ha utilizado para obtener oocistos purificados. Sin desear quedar ligado por teoría alguna, parece que hay varias razones para esto. En primer lugar, los métodos comunes utilizados para purificar oocistos se basan en la utilización de la densidad particular de los oocistos, ya que se entiende que en las heces no están presentes otras fracciones principales que tengan la misma densidad (es decir, que tengan una densidad con un intervalo de densidad que sea como mucho del 10 % o incluso como mucho el 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o tan pequeño como un 1 % de diferencia con la densidad de los oocistos) que los oocistos. Por lo tanto, dichos métodos pueden dar lugar a una composición de oocistos adecuadamente pura. Con el filtrado, no se puede discriminar entre partículas que tienen diferentes densidades, sino solo entre partículas que tienen diferentes tamaños. Esto da lugar inherentemente al hecho de que con el filtrado, otras partículas con el mismo intervalo de tamaño que los oocistos, pero que tienen otra densidad se incorporen como contaminación adicional a la fracción de oocistos. Por lo tanto, se espera comúnmente que con el filtrado los oocistos no se puedan purificar hasta un nivel adecuado. También, los oocistos no son perfectamente esféricos sino generalmente de forma ovoide o elipsoide. El filtrado de partículas no esféricas tiene el problema inherente de que la acción de filtrado depende de la orientación que toman las partículas con respecto a la plataforma de filtrado. Como esta orientación no se puede controlar, el filtrado no se considera una opción viable para fraccionar con precisión partículas no esféricas. Finalmente, el filtrado a menudo da lugar a una carga mecánica alta sobre las partículas que se van a filtrar, en particular cuando el tamaño de la malla está en el mismo intervalo que el tamaño de las partículas. En cuanto a la materia biológica, dicha carga mecánica a menudo es perjudicial para su viabilidad (cf. el método de prensa de French utilizada comúnmente para destruir bacterias). Para sorpresa del solicitante, ninguno de estos evita que el filtrado sea un buen método para purificar oocistos de coccidio de las heces y obtiene una pureza que es adecuada para la utilización de los oocistos en una vacuna eficaz.

La invención se explicará ahora adicionalmente, basándose en las siguientes figuras y ejemplos.

## Ejemplos

La Figura 1 presenta en forma de diagrama un sistema para recolectar oocistos para la esporulación.

La Figura 2 presenta esquemáticamente una realización de un sistema de acuerdo con la invención.

La Figura 3 presenta esquemáticamente una realización de una plataforma de filtro para su uso en un método o sistema de acuerdo con la invención.

La Figura 4 presenta esquemáticamente otra realización de un sistema de acuerdo con la invención.

La Figura 5 presenta esquemáticamente una plataforma de filtro para su uso como un soporte que permite que esporulen los oocistos purificados.

El Ejemplo 1 describe el procesamiento de datos con respecto al método de acuerdo con la invención.

## Figura 1

La Figura 1 representa en forma de diagrama un sistema para recolectar heces animales que contienen oocistos de coccidio de animales huésped, y separa una fracción gruesa que comprende un material particulado macroscópico de las heces y la recolección de una fracción que contiene los oocistos para su purificación adicional. En general, se

conocen en la técnica varios métodos diferentes para preparar oocistos para su purificación posterior. Cualquiera o una combinación de dichos métodos se puede utilizar antes de la purificación posterior. Un método preferido se expone posteriormente.

- 5 Para comenzar, una vez que los animales huésped (normalmente pollos) comienzan a diseminar el organismo, se pueden recolectar los oocistos. Más comúnmente, los pollos se mantienen en jaulas (1), y se alimentan con alimento sólido (2) y agua (3). Las heces (5) se recolectan de las jaulas, y se desecha el derrame de desperdicios que contiene otros materiales (plumas, paja, etc.). Una vez recolectadas, las heces se llevan a un depósito de estiércol líquido (6) y se mezcla añadiendo agua (7). El material fecal diluido resultante se proporciona en un filtro (9) para  
10 retirar el material grueso de las heces tales como piedras, restos de virutas, rejilla, restos de heces animales, etc. Para esto el filtro comprende dos placas de filtro consecutivas, el filtro corriente arriba tiene aberturas de malla de 2 mm, y el filtro corriente abajo tiene aberturas de maya de 125  $\mu\text{m}$ . Los restos resultantes (11) se desechan, y el filtrado se recolecta como una fracción acuosa (10) que contiene los oocistos.

## 15 **Figura 2**

- La Figura 2 representa esquemáticamente una realización de un sistema 20 de acuerdo con la invención. En esta realización el sistema comprende un alojamiento tipo tubo longitudinal 23 que tiene dos plataformas de filtro internas, con una plataforma de filtro 21 corriente arriba y una plataforma de filtro 22 corriente abajo. En esta realización las  
20 plataformas de filtro se hacen de hilos trenzados de acero inoxidable, de acuerdo con un patrón de trenzado plano. La fracción acuosa 10 (véase la Figura 1) se proporcionar en la parte superior de la plataforma de filtro 21 con el fin de filtrar esta fracción. Esta plataforma tiene aberturas de malla de manera que los oocistos pasen para obtener el filtrado acuoso 32 que comprende los oocistos, y un primer residuo 31 que comprende partículas más grandes que los oocistos. El filtrado acuoso 32 se proporciona en la parte superior de la segunda plataforma de filtro 22, cuya  
25 plataforma de filtro tiene aberturas de malla para obstruir el paso de los oocistos a través de esta plataforma de filtro. De esta manera se obtienen un segundo residuo 40 que comprende los oocistos purificados y un filtrado residual 42 que comprende partículas menores que los oocistos.

- El tamaño de las aberturas de la malla se debería escoger para que recolecten eficazmente los oocistos de la forma deseada. Por ejemplo, para recolectar oocistos de un tamaño que varíe entre 15 y 25  $\mu\text{m}$ , la primera plataforma de  
30 filtro puede tener aberturas de malla de 25  $\mu\text{m}$  y la segunda plataforma de filtro puede tener aberturas de malla de aproximadamente 14  $\mu\text{m}$ . En este caso, como las aberturas de malla se corresponden casi exactamente con el tamaño de los oocistos, sería necesaria mucha agua adicional (proporcionada como aporte separado en la parte superior de la plataforma de filtro (21) para que pasen actualmente los oocistos la primera plataforma de filtro. En  
35 otra configuración, por ejemplo, para recolectar oocistos de un tamaño que varía entre 20 y 30  $\mu\text{m}$ , la primera plataforma de filtro puede tener aberturas de malla de 40  $\mu\text{m}$ , y la segunda plataforma de filtro puede tener aberturas de malla de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ . En otra configuración más, por ejemplo para recolectar oocistos de un tamaño que varía entre 10 y 40  $\mu\text{m}$ , la primera plataforma de filtro puede tener aberturas de malla de 42  $\mu\text{m}$ , y la segunda  
40 plataforma de filtro puede tener aberturas de malla de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . En otra realización más, por ejemplo para recolectar oocistos de un tamaño que varía ente 12 y 48  $\mu\text{m}$ , la primera plataforma de filtro puede tener aberturas de malla de 50  $\mu\text{m}$ , y la segunda plataforma de filtro puede tener aberturas de malla de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ .

## 45 **Figura 3**

- La Figura 3 representa esquemáticamente una realización de una plataforma de filtro 21 (aberturas de malla de 50  $\mu\text{m}$ ) para su uso en un método o sistema de acuerdo con la invención. En esta realización, la plataforma del filtro es una plataforma sin fin en forma de tambor. El tambor está sujeto de manera que rota en el eje 25 y está provisto internamente con un depósito fijo 26. En su uso, la fracción acuosa se carga en el interior de este tambor, por debajo  
50 del depósito 26, y el tambor rota mientras filtra la fracción acuosa. También durante esta acción de filtrado se añade un medio acuoso adicional que tiene una temperatura de aproximadamente 28 °C en el interior del tambor 21. El filtrado acuoso se recolecta en el depósito 27. En cima del tambor se coloca una fila de cabezas pulverizadoras 28. Estas cabezas se pueden utilizar para añadir agua al tambor, para que sirva como lubricante durante el filtrado, o después de terminar el filtrado, para liberal los residuos del tambor y recolectarlos en el depósito 25. Este depósito  
55 se puede retirar deslizándolo sobre el eje 25.

## **Figura 4**

- La Figura 4 representa esquemáticamente otra realización de un sistema 20 de acuerdo con la invención, en el que  
60 se puede ejecutar una realización de un procedimiento semi-continuo para la aplicación del método de acuerdo con la invención. Este sistema comprende un filtro rotatorio 91 (que tiene aberturas de malla de 150  $\mu\text{m}$ ), que está rodeado de un receptáculo 9. Este filtro y el receptáculo corresponden al artículo 9 de la Figura 1. Hacia Este filtro 91 se aporta una fracción acuosa 8, que comprende las heces de pollo diluidas (véase, la Figura 1, aunque esta fracción ha sido opcionalmente pre-filtrada en un filtro de 2 mm), para separar la fracción gruesa que comprende  
65 material particulado macroscópico de las heces disueltas. La fracción acuosa 10 que contiene los oocistos se recolecta y se aporta un filtro rotatorio 21' con forma de tambor (véase también la Figura 3) que se presenta en el

receptáculo 23'. Como se describe en conjunción con la Figura 3, esta plataforma de filtro tiene aberturas de malla de 50 µm y separa la fracción acuosa en un filtrado acuoso 11 que comprende los oocistos y un primer residuo (no mostrado), que comprende partículas mayores que los oocistos. Este residuo se puede retirar como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

El filtrado acuoso 11 se aporta al filtro rotatorio 22', cuyo filtro se alberga en el receptáculo 23''. Este filtro 22' tiene aberturas de malla de 10 µm para obstruir el paso de los oocistos a través de esta plataforma de filtro, de manera que se produce un resto que comprende los oocistos purificados en el lado interno de esta plataforma de filtro 22' con forma de tambor. El filtrado de desechos 12 comprende partículas más pequeñas que los oocistos, tales como cualquier bacteria.

### **Figura 5**

La Figura 5 representa esquemáticamente una plataforma de filtro para su uso como un soporte que permite que los oocistos purificados esporulen. En esta realización, el resto 40 se crea como una capa de 2,5-3,5 mm en la parte interior de la plataforma de filtro 22 (que tiene aberturas de malla de 10 µm). La plataforma de filtro 22 con forma de tambor se coloca parcialmente en un volumen de agua (50; que se mantiene a una temperatura de 28 °C) y parcialmente en el ambiente gaseoso 60, de manera que aproximadamente un 20 % de la circunferencia total del tambor está por debajo del nivel de agua. El tambor se monta con su eje longitudinal 24 extendiéndose en paralelo con la superficie de este volumen de agua. Durante la esporulación el tambor rota para mantener la capa 40 intermitentemente en el oxígeno que contiene el ambiente gaseoso 60. El tambor gira a 10-12 rpm a través del agua 50'. La humedad relativa del ambiente gaseoso en el tambor es del 100 %. Se descubrió que de esta manera los oocistos podían esporular (casi todos) a las 48 horas.

### **Ejemplo 1**

El Ejemplo 1 describe el procesamiento de datos con respecto a un método de acuerdo con la invención que utiliza el sistema de la Figura 4. En este sistema se utilizan plataformas con forma de pequeño tambor que tiene una longitud de 40 cm y un diámetro del tambor de 80 cm (Se pueden utilizar ventajosamente tambores que tengan una longitud de hasta 2,80 m y un diámetro de hasta 2,0 metros en la configuración de la Figura 4). Las plataformas tienen mallas de hilo trenzado de acero inoxidable de acuerdo con un trenzado plano, con aberturas de malla como las que se describen en conjunción con la Figura 4. Los tambores rotan a 10-12 revoluciones por minuto.

Las heces de 60 pollos blancos leghorn (infectados con Eimeria) con una edad de 26-31 días se recolectaron (aproximadamente 24 gramos de heces por pollo por día), se mezclaron con 200 litros de agua, y la fracción gruesa se separó utilizando un filtro de 2 mm. Aproximadamente 50 litros de esta mezcla (que contenía aproximadamente 2,25 kg de heces) se cargó en el sistema en el que se añadieron durante el filtrado aproximadamente 5-10 litros de agua por minuto a las plataformas de filtrado 21 y 22. Esto daba como resultado aproximadamente 120 gramos de oocistos purificados (una composición que contenía una cantidad estimada de aproximadamente 85 gramos de partículas fecales no oocistos, normalmente granos de arena finos, partículas de barro y arcilla, y aproximadamente 34 gramos de oocistos) sobre la plataforma de filtro 22 después de 35 minutos de filtrado, con un rendimiento calculado de aproximadamente el 81 % para Eimeria acervulina y aproximadamente el 100 % para Eimeria maxima. Utilizando el método tradicional de flotación y centrifugación esto lleva aproximadamente 6 horas, con rendimientos típicos de aproximadamente un 50-60 % para ambas especies.

Opcionalmente, dependiendo de la cantidad de contaminación que siga estando presente se puede llevar a cabo una etapa de lavado adicional mezclando el residuo con una solución de hipoclorito al 6 % (anti-infeccioso) y se carga en el tambor 22. El agua se añade continuamente a aproximadamente 5-10 litros por minuto para retirar el hipoclorito, y después de 15 minutos el residuo está listo para su procesamiento posterior.

Después de la esporulación como se ha descrito en conjunción con la Figura 5, las tasas de esporulación típicas son del 85 % para Eimeria acervulina y el 90 % para Eimeria maxima (cf. valores típicos del 40 % hasta un máximo del 80 % para el procedimiento tradicional utilizando dicromato potásico). Estos oocistos esporulados pueden servir como antígeno para una vacuna de coccidiosis como se conoce en la técnica anterior.



## REIVINDICACIONES

1. Un método para esporular oocistos de coccidio purificados de heces animales (5), comprendiendo el método proporcionar los oocistos purificados como una capa (40) sobre una superficie de soporte (22), manteniendo la capa, al menos intermitentemente, en un ambiente gaseoso (60) que contiene oxígeno, que tiene una humedad relativa de al menos un 15 % y manteniendo la temperatura de los oocistos a entre 19 °C y 37 °C.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el grosor de la capa es menor de 10 mm.
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la superficie de soporte es una plataforma perforada que es capaz de dejar pasar el agua.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** la superficie de soporte tiene aberturas de malla alrededor de una dimensión mínima de los oocistos.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, **caracterizado porque** la superficie de soporte tiene aberturas de malla de entre 9 y 11 µm, preferentemente de entre 9,5 y 10,5 µm, más preferentemente de entre 9,8 y 10,2 µm.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la superficie de soporte tiene forma de una plataforma sin fin perforada.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque la plataforma perforada tiene forma de tambor.
8. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizado porque** la plataforma sin fin está situada parcialmente en un volumen de agua (50) y parcialmente en el ambiente gaseoso, montada con su eje longitudinal (25) que se extiende en paralelo con una superficie de este volumen de agua y en el que la plataforma rota para mantener la capa al menos intermitentemente en el ambiente gaseoso que contiene oxígeno.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** el tambor rota con una velocidad circunferencial de 10-40 m/min.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado porque** la capa de oocistos se proporciona en la superficie interna de la plataforma sin fin.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado porque** el volumen de agua se mantiene a una temperatura de entre 19 °C y 37 °C.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, **caracterizado porque** el volumen de agua se mantiene a una temperatura de 28 °C.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** después de la esporulación de los oocistos, se proporciona a la capa un medio acuoso adicional que contiene un medio anti-infeccioso, con el que se lava la capa para retirar el medio anti-infeccioso.
14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la superficie de soporte es una plataforma de filtro (22) que tiene una abertura de malla eficaz alrededor de la dimensión mínima de los oocistos, **caracterizado porque** la capa fina se proporciona recolectando heces de animales que contienen los oocistos de coccidio, diluyendo las heces en un medio acuoso (7), opcionalmente separando una fracción gruesa (11) que comprende un material particulado macroscópico de las heces diluidas, y recolectando una fracción acuosa (10) que contiene los oocistos, filtrando la fracción acuosa por una primera plataforma de filtro (21) distinta de la mencionada superficie de soporte, teniendo la primera plataforma de filtro aberturas de malla que dejan pasar los oocistos con el fin de obtener un filtrado acuoso (11, 32) que comprende los oocistos y un residuo (31) en la primera plataforma de filtro que comprende partículas mayores que los oocistos, y después filtrando el filtrado acuoso sobre la mencionada superficie de soporte.

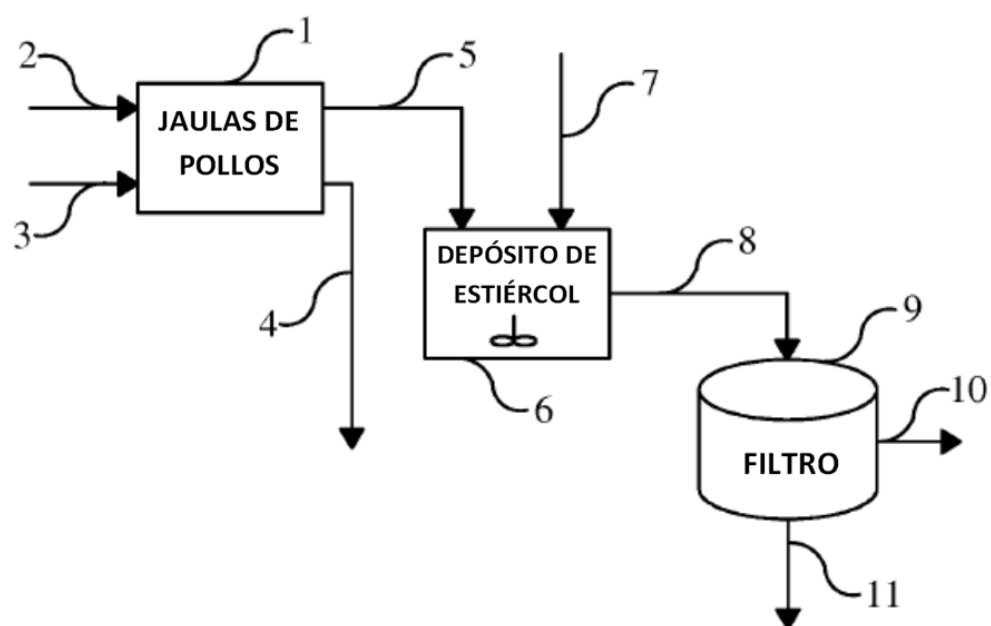


FIG. 1

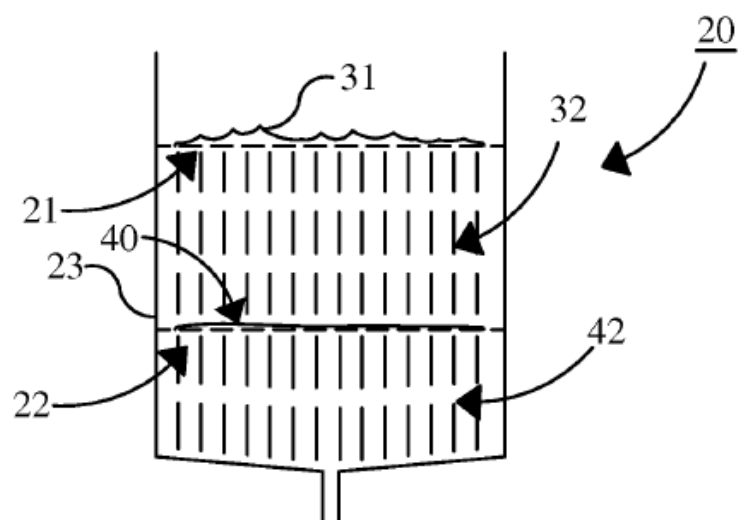


FIG. 2

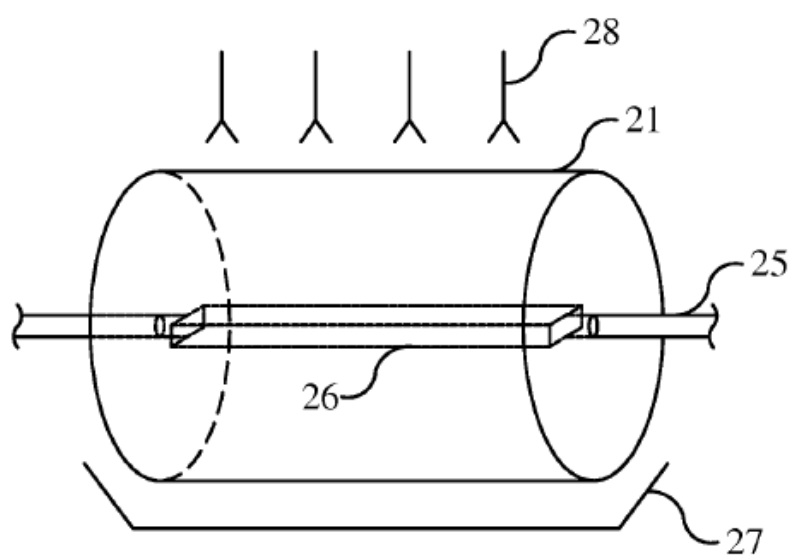


FIG. 3

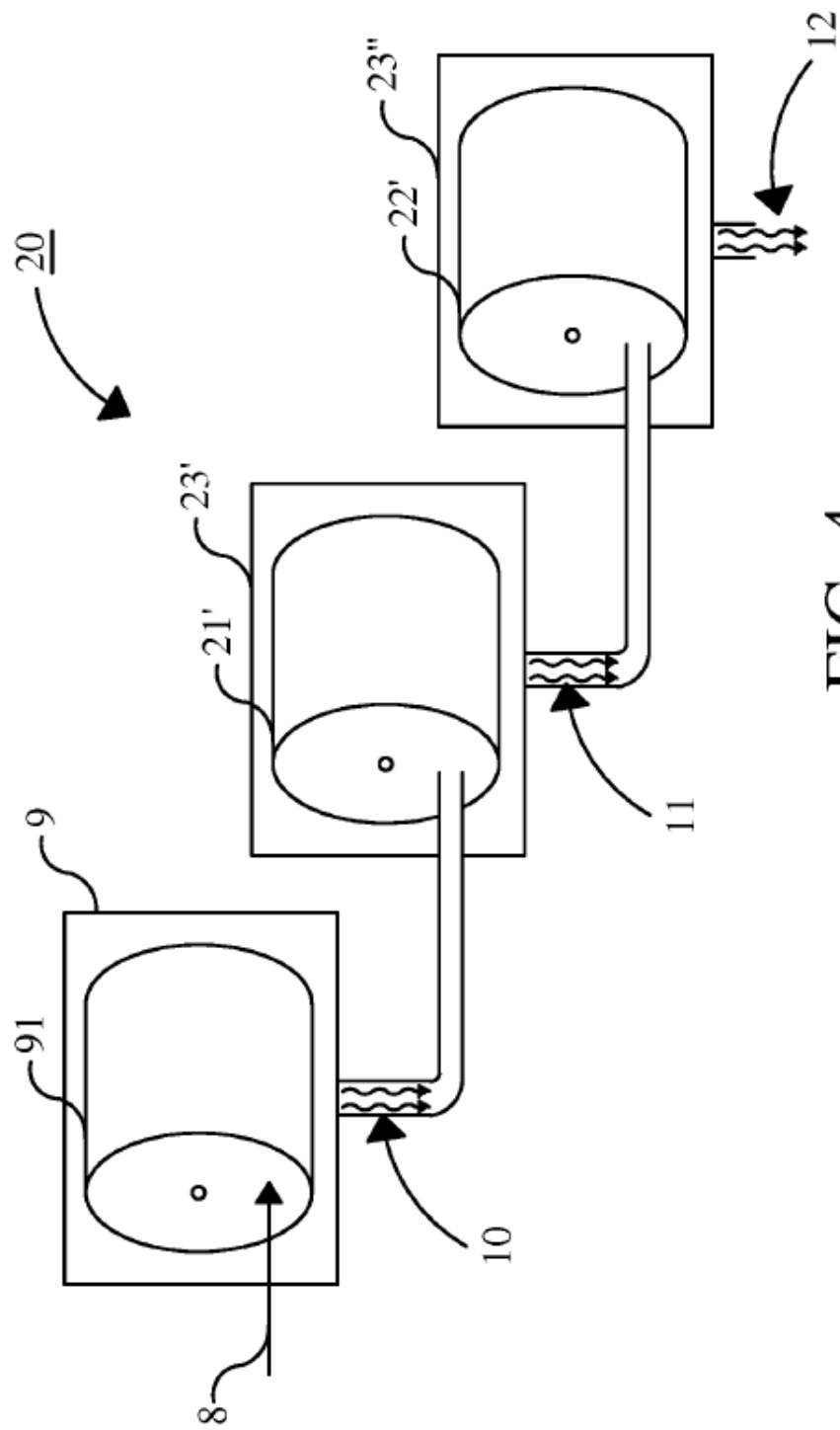


FIG. 4

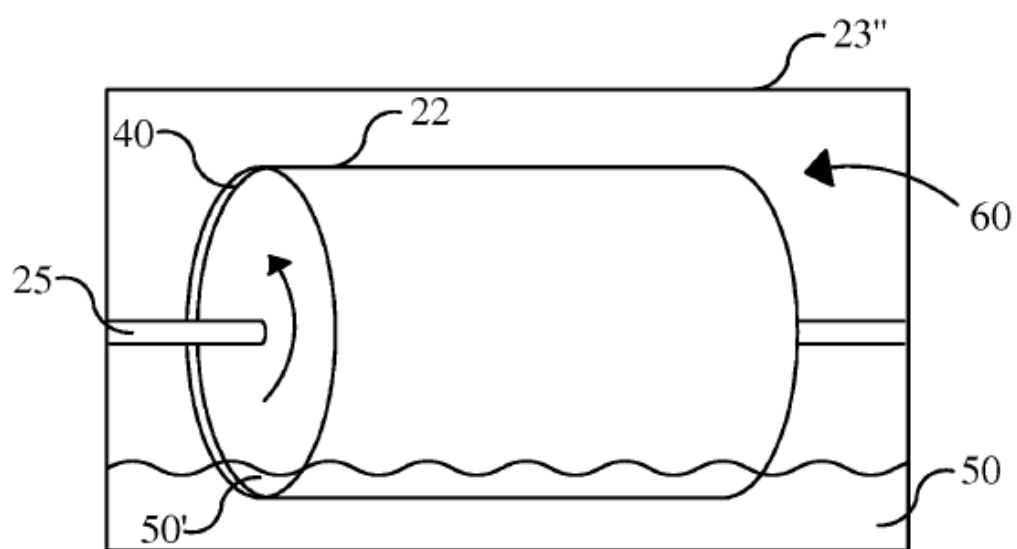


FIG. 5