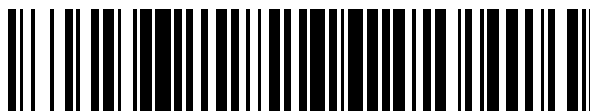


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 905**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/02** (2006.01)

**C12N 1/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2015 PCT/EP2015/057294**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15150512**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2015 E 15713764 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3126487**

54 Título: **Un método para purificar ooquistes de coccidio purificados de heces animales, un sistema adecuado para aplicar este método y ooquistes obtenidos con el mismo**

30 Prioridad:

**03.04.2014 EP 14163340**

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

**17.06.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 716 905 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

Un método para purificar ooquistes de coccidio purificados de heces animales, un sistema adecuado para aplicar este método y ooquistes obtenidos con el mismo

5

**Campo general de la invención**

La invención se refiere a un método para purificar ooquistes de coccidios que tienen dimensiones entre  $D_{min}$  y  $d_{max}$  de las heces, que comprende las etapas de recoger las heces que contienen los ooquistes de coccidios de los animales huésped, diluir las heces en un medio acuoso, opcionalmente separar una fracción gruesa que comprende materia particulada macroscópica de las heces diluidas y recoger una fracción acuosa (que podrían ser las heces diluidas en el medio acuoso) que contiene los ooquistes para recuperar los ooquistes de la misma. La invención también se refiere al uso de un sistema para aplicar este método y describe los ooquistes obtenidos con el mismo.

10

**15 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.

20

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 ooquistes esporulados del medio ambiente. Los ooquistes son de forma ovoide a elipsoide, varían desde 10-48  $\mu m$  de longitud por 10-30  $\mu m$  de anchura, y pueden contener estructuras especializadas tales como protecciones polares, micrópilos, cuerpos residuales y cristalinos. Cuando los ooquistes esporulados se ingieren por un animal susceptible, la pared del ooquiste 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 ooquiste 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.

25

30

35

40

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 ooquistes y se diseminan sin esporular en las heces. Las aves infectadas pueden diseminar ooquistes en las heces durante días o semanas. En condiciones adecuadas de temperatura y humedad, los ooquistes se convierten en infectivos mediante el proceso de esporulación. Las aves susceptibles ingieren los ooquistes 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 ooquistes 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 de la especie de manera que la introducción de otras especies de protozoos coccidios dará como resultado otro brote de enfermedad.

45

50

55

La pared del ooquiste del protozoo coccidio proporciona una barrera altamente eficaz para la supervivencia de los ooquistes. Los ooquistes pueden sobrevivir durante muchas semanas fuera del huésped. En el laboratorio, los ooquistes 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.

60

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

65

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 ooquistes 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 ooquistes 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 ooquistes con los ooquistes). En el momento de la recolección, los protozoos están en el estadio del ciclo vital de ooquiste no infectivo. Con el fin de que se vuelva infectivo, y por lo tanto útil para las vacunas, los ooquistes se deben inducir para someterse a la esporulación. En los miembros del género Eimeria, la esporulación normalmente implica la incubación de ooquistes en un 1 % a 4 % de solución acuosa de dicromato potásico a 19 °C a 37 °C, preferentemente alrededor de 28 °C con aireación constante. La esporulación se completa normalmente en 12 a 48 horas dependiendo de la temperatura utilizada. 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 ooquistes 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.

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 ooquistes por dosis (4000 ooquistes esporulados representan cuatro especies diferentes). Una desventaja importante de los métodos actuales para obtener ooquistes esporulados es que dependen normalmente de la flotación de sal y la centrifugación para la purificación. Esto no solamente consume mucho tiempo (en particular la centrifugación ha de tener lugar en lotes) sino también da lugar a que los ooquistes estén en contacto con una solución salina concentrada durante muchas horas. La cantidad de agua con respecto a la cantidad de ooquistes ha de mantenerse baja ya que de otra manera la etapa de centrifugación en lotes estaría muy lejos de ser económica. El efecto neto de todo esto, en particular el largo tiempo de proceso y el contacto de los ooquistes con sal concentrada, es que hasta el 80 % de los ooquistes viables se pierde durante este proceso de purificación conocido. También, los ooquistes purificados contienen residuos de las sales usadas para la técnica de flotación, cuya sal es desventajosa en etapas de proceso adicionales o que podría incluso incorporarse en la vacuna final e interferir con los constituyentes de la vacuna o con el animal huésped. También, los ooquistes se contaminan con los solutos normalmente usados en la técnica de centrifugación para construir un gradiente de densidad. Esta es otra desventaja de los métodos de la técnica anterior.

### Objetivo de la invención

Es un objetivo de la presente invención concebir un método que mitigue al menos las desventajas de los métodos de purificación de ooquistes de la técnica anterior, en particular para concebir un método en el que una gran parte de los ooquistes se purifique siendo aún viables y capaces de esporular. También es un objetivo de la invención concebir un sistema para aplicar este método y obtener ooquistes purificados con el mismo, preferentemente que no tenga la desventaja de estar presentes residuos de sal u otros solutos.

### Sumario de la invención

En el fin de alcanzar el primer objetivo de la invención, se ha concebido un método de acuerdo con la sección CAMPO GENERAL DE LA INVENCION, en el que para recuperar los ooquistes de la fracción acuosa, el método comprende las etapas de filtrar la fracción acuosa sobre una primera plataforma de filtro que tiene aberturas de malla que dejen pasar los ooquistes, con el fin de obtener un filtrado acuoso que comprende los ooquistes y un primer residuo que comprende partículas mayores que los ooquistes, y en lo sucesivo filtrar el filtrado acuoso sobre una segunda plataforma de filtro que tiene aberturas de malla que obstruyen el paso de los ooquistes a través de la plataforma de filtro, con el fin de obtener un segundo residuo que comprende los ooquistes purificados y un filtrado de deshecho que comprende partículas más pequeñas que los ooquistes.

El solicitante descubrió que aplicando un procedimiento de filtrado en dos etapas, los ooquistes 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 ooquistes (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 ooquistes (normalmente, bacterias, virus, restos digeridos de plantas, aglomerados proteicos, gotas de aceite, et.) se pueden retirar. De esta manera puede obtenerse una fracción de ooquistes que tiene una carga muy baja (o prácticamente ninguna) de microbios contaminantes, mientras que usando los métodos de flotación de la técnica anterior, la fracción de ooquistes todavía contiene una carga considerable de microbios. El filtrado se puede aplicar (semi-) continuamente y la cantidad de agua presente en la fracción acuosa en relación con la cantidad de ooquistes no se une con un máximo económico: el agua en último término pasa la segunda plataforma de filtro mientras que los ooquistes 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 ooquistes 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 ooquistes purificados. Sin desear quedar ligado por teoría alguna, parece que hay varias razones para esto. En primer lugar, los métodos comunes utilizados para purificar ooquistes se basan en la utilización de la densidad particular de los ooquistes, 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 ooquistes) que los ooquistes. Por lo tanto, dichos métodos pueden dar lugar a una composición que contiene ooquistes adecuadamente pura. Con el filtrado, no se puede discriminar entre partículas que tienen diferentes densidades, sino solo entre partículas que tienen diferentes tamaños (diferentes propiedades de filtrado). Esto da lugar inherentemente al hecho de que con el filtrado, otras partículas con el mismo intervalo de tamaño que los ooquistes, pero que tienen otra densidad se incorporen como contaminación adicional a la fracción de ooquistes. Por lo tanto, se espera comúnmente que con el filtrado los ooquistes no se puedan purificar hasta un nivel adecuado. También, los ooquistes 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 ooquistes de coccidio de las heces y obtiene una pureza que es adecuada para la utilización de los ooquistes en una vacuna eficaz.

Como cualquier persona experta en la técnica de la filtración conoce, nótese que “que tiene aberturas de malla que dejan a los ooquistes pasar” no se iguala sencillamente a “que tiene aberturas de malla más grandes que la dimensión más grande de los ooquistes”, ni que “que tiene aberturas de malla para obstruir el paso de los ooquistes” se iguala sencillamente a “que tiene aberturas de malla más pequeñas que la dimensión más pequeña de los ooquistes”. Como se conoce comúnmente, que una partícula que tiene dimensiones particulares pase por la plataforma de filtro (de esta manera que las aberturas de malla dejen o no pasar a la partícula) no depende solamente de las dimensiones de partícula con respecto al tamaño de las aberturas, sino que también depende del material de alambre de la plataforma de filtro, el grosor del alambre, el tipo de malla (tejida, el tipo de trenzado, por bombardeo atómico, molido, de ablación láser, perforado, etc.), de la forma de las aberturas de malla, si la plataforma de filtro se hace o no vibrar, de la amplitud de la vibración, si se usa o no fluido adicional para ayudar a que las partículas pasen por la plataforma de filtro, de la forma de las partículas, etc. Por ejemplo, una plataforma de filtro que tiene aberturas de malla de 150  $\mu\text{m}$ , bajo las circunstancias de que la plataforma no vibre, puede ser capaz de dejar pasar solamente partículas que tengan un diámetro de menos de 50  $\mu\text{m}$  (ya que pueden formarse normalmente “puentes” de 2-3 partículas en una abertura de malla). Otras circunstancias también pueden jugar un papel. Por ejemplo, un filtro que tiene aberturas de malla de 100  $\mu\text{m}$  puede ser capaz de dejar pasar partículas con un límite superior de tamaño de 30  $\mu\text{m}$ , o por ejemplo 60  $\mu\text{m}$  o incluso por ejemplo 99  $\mu\text{m}$  dependiendo de la cantidad de lubricante (normalmente agua) usada y la cantidad de vibración de la plataforma. De forma correspondiente, esto es cierto para la situación en que las aberturas de malla son de tal manera que deben obstruir el paso de la partícula. Usando el conocimiento general de la técnica del filtrado, la persona experta puede concebir una preparación de filtrado que pueda usarse de acuerdo con la presente invención.

Otra ventaja de la presente invención es que los ooquistes purificados ya no necesitan contener (sustancialmente) todos los ooquistes presentes en las heces. Con el presente método uno puede elegir un intervalo de tamaño de los ooquistes que uno desea purificar. Con los métodos de la técnica anterior, todos los ooquistes de una cierta densidad se purifican como una fracción. Con el método actual es posible por ejemplo dejar los ooquistes más pequeños, o elegir por ejemplo solamente la fracción que representa ciertas especies de coccidios (cada especie tiene intervalos de tamaño típicos para sus ooquistes).

Para cumplir el segundo objetivo de la invención para el uso de un sistema para purificar ooquistes de coccidios que tienen dimensiones entre  $D_{\text{min}}$  y  $D_{\text{max}}$  de las heces o de una fracción fina de las mismas, se ha concebido el

sistema que comprende una primera plataforma de filtro sin fin que tiene aberturas de malla adecuadas para dejar pasar los ooquistes por la plataforma de filtro en un filtrado y obstruir partículas más grandes que los ooquistes, medios para cargar automáticamente el filtrado al interior de la segunda plataforma de filtro sin fin, en el que la segunda plataforma de filtro tiene aberturas de malla para obstruir el paso de los ooquistes a través de esta  
5 plataforma de filtro y dejar pasar partículas más pequeñas que los ooquistes.

Una composición de ooquistes de coccidios se obtiene usando el método o sistema anteriormente descritos, en la que la composición contiene partículas que tienen dimensiones entre  $D_{min}$  y  $D_{max}$  y que tienen una densidad diferente de la densidad de los ooquistes.  
10

### Definiciones

Una preparación de ooquistes purificada de las heces significa que al menos un 90 %, en particular 91, 92, 93, 94, 95 % o más de material no ooquistes se retira de las heces en las que se excretan los ooquistes.  
15

*D<sub>min</sub>* de una partícula es una dimensión mínima (longitud, anchura o altura) de esa partícula.

*D<sub>max</sub>* de una partícula es una dimensión máxima (longitud, anchura o altura) de esa partícula.

Un objeto macroscópico: 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.  
20

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.  
25

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. Con respecto a esto "alrededor de un valor X para un tamaño de malla significa que 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.  
30  
35

*Automáticamente* significa sin intervención de un operador. Automáticamente no descarta que una operación se inicie o detenga por un operador.

### Realizaciones

En una primera realización la primera plataforma de filtro tiene aberturas de malla más grandes que la  $D_{min}$  y hasta la  $D_{max}$  y la segunda plataforma de filtración tiene aberturas de malla alrededor de la  $D_{min}$ . Con respecto a la segunda plataforma de filtración, se descubrió que si las aberturas de malla están alrededor de la  $D_{min}$ , cualquier ooquiste 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  $D_{min}$  pueden pasar la plataforma. De esta manera puede obtenerse una fracción de ooquistes que es prácticamente estéril. 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 particular normalmente también de alguna manera se obstruiría por la plataforma y de esta manera permanecerían como una contaminación en el residuo de ooquistes. Sin embargo, dichas partículas críticas parece que no están presentes (no perceptibles razonablemente) en las heces animales de distintas clases, y por lo tanto, el uso de un tamaño de malla alrededor de la  $D_{min}$  parece perfectamente adecuado para mantener los ooquistes en el residuo mientras que las partículas contaminantes pasarán por esta plataforma de filtro. Con respecto a la primera plataforma de filtro, es obvio que las aberturas de malla son preferentemente al menos el tamaño de  $D_{min}$ . Sin embargo, el tamaño máximo preferible no es obvio en sí mismo. Un tamaño por encima de  $D_{min}$  pero sustancialmente por debajo de  $D_{max}$  podría ser adecuado si por ejemplo se usa una cantidad suficiente de agua adicional para intentar y hacer que los ooquistes pasen por la plataforma de filtro, funcionando el agua como lubricante y re-disponiendo la orientación de los ooquistes (no esféricos) con respecto a la plataforma. Cualquier tamaño más grande de las aberturas permitiría un pasaje más fácil de los ooquistes. El solicitante descubrió que el tamaño máximo de las aberturas de la primera plataforma de filtro es alrededor de la  $D_{max}$ . Tener las aberturas incluso más grandes puede dar lugar a que demasiadas partículas contaminantes pasen a través de la plataforma de filtro junto con los ooquistes.  
45  
50  
55  
60

En otra realización la primera plataforma de filtro tiene aberturas de malla alrededor de  $D_{max}$  y la segunda plataforma de filtro tiene aberturas de malla alrededor de  $D_{min}$ . El solicitante descubrió que de esta manera puede obtenerse una fracción de ooquistes adecuadamente purificados en la segunda plataforma de filtro, a pesar del  
65

hecho de que cualquier partícula contaminante que tenga un intervalo de tamaño entre  $D_{min}$  y  $D_{max}$  también sería probable que se capturara en el residuo en la segunda plataforma de filtro.

5 En otra realización más la primera plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de 50  $\mu m$  y la segunda  
 10 plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de 10  $\mu m$ . Las aberturas de malla de este tamaño parecen  
 ser idealmente adecuadas para obtener un residuo de ooquistes altamente purificados de cualquier tamaño, incluso  
 si por ejemplo, los ooquistes 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 de la primera plataforma de filtro, 50  $\mu m$ , parece ser adecuado para mantener  
 cualquier partícula contaminante en el lado "grueso", mientras que el tamaño de las aberturas de la segunda  
 15 plataforma de filtro, de 10  $\mu m$ , parece ser adecuado para mantener cualquier partícula contaminante en el lado "fino".  
 Aparentemente, en la región de 10  $\mu m$  a 50  $\mu m$  la cantidad de partículas contaminantes es tan baja que estas  
 partículas no dan lugar a ooquistes inadecuadamente purificados.

15 En una realización la segunda plataforma de filtro tiene forma de cilindro, el filtrado acuoso se carga en el interior de  
 este cilindro y el cilindro rota mientras se filtra el filtrado acuoso. En esta realización, el residuo puede construirse  
 como una capa fina en el interior de este cilindro. Esto es ventajoso en el procesamiento adicional de los ooquistes.  
 Preferentemente, el cilindro 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 cilindro. Por debajo de esta velocidad puede que los ooquistes de  
 20 la capa, en particular a baja humedad relativa del ambiente gaseoso en el cilindro, se sequen demasiado, mientras  
 que por encima de 40 m/min los ooquistes pueden afrontar demasiadas fuerzas mecánicas y se dañen.

25 En otra realización la segunda plataforma de filtro tiene forma de cilindro, la fracción acuosa se carga en el interior  
 de este cilindro y el cilindro rota mientras se filtra la fracción acuosa. En esta realización, la fracción acuosa puede  
 añadirse más o menos continuamente a la primera plataforma de filtro ya que puede tener una superficie  
 relativamente elaborada y se rota continuamente para permitir que el filtrado (que contiene los ooquistes) pase  
 fácilmente por la plataforma de filtro.

30 En otra realización más, durante el filtrado se añade medio acuoso adicional a las plataformas de filtro. Esta agua  
 adicional puede servir ventajosamente como un lubricante y opcionalmente como un medio para rediseñar la  
 orientación que los ooquistes tienen con respecto a la plataforma de filtro para permitir el filtrado fácil incluso si las  
 dimensiones de las aberturas son cercanas a  $D_{min}$ . En otra realización el medio acuoso tiene una temperatura entre  
 19 °C y 37 °C. De esta manera, los ooquistes pueden iniciar ya el proceso de esporulación mientras se purifican de  
 35 las heces usando el proceso de filtro actual. Esto puede beneficiar el rendimiento final del método. Preferentemente,  
 el medio acuoso adicional tiene una temperatura de aproximadamente 28 °C.

El uso de un sistema de acuerdo con la invención puede incorporar rasgos para permitir que se aplique una o más  
 de estas realizaciones del método de acuerdo con la invención. Las reivindicaciones del sistema dependientes  
 recitan dichos rasgos.

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

### Ejemplos

45 La Figura 1 presenta en forma de diagrama un sistema para recolectar ooquistes para la purificación.  
 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.  
 50 La Figura 5 presenta esquemáticamente una plataforma de filtro para su uso como un soporte que permite que  
 esporulen los ooquistes purificados.

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

### Figura 1

55 La Figura 1 representa en forma de diagrama un sistema para recolectar heces animales que contienen ooquistes  
 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 ooquistes para su purificación adicional.  
 En general, se conocen en la técnica varios métodos diferentes para preparar ooquistes para su purificación  
 60 posterior. Cualquiera o una combinación de dichos métodos se puede utilizar antes de la purificación posterior. Un  
 método preferido se expone posteriormente.

Para comenzar, una vez que los animales huésped (normalmente pollos) comienzan a diseminar el organismo, se  
 pueden recolectar los ooquistes. Más comúnmente, los pollos se mantienen en jaulas (1), y se alimentan con  
 65 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

estiercol líquido (6) y se mezcla añadiendo agua (7). El material fecal diluido resultante se proporciona en un filtro (9) para 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 µm. Los restos resultantes (11) se desechan, y el filtrado se recolecta como una fracción acuosa (10) que contiene los ooquistes.

**Figura 2**

La Figura 2 representa esquemáticamente una realización de un sistema 20 para su uso 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 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 ooquistes pasen para obtener el filtrado acuoso 32 que comprende los ooquistes, y un primer residuo 31 que comprende partículas más grandes que los ooquistes. El filtrado acuoso 32 se proporciona en la parte superior de la segunda plataforma de filtro 22, cuya plataforma de filtro tiene aberturas de malla para obstruir el paso de los ooquistes a través de esta plataforma de filtro. De esta manera se obtienen un segundo residuo 40 que comprende los ooquistes purificados y un filtrado residual 42 que comprende partículas menores que los ooquistes.

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

**Figura 3**

La Figura 3 representa esquemáticamente una realización de una plataforma de filtro 21 (aberturas de malla de 50 µm) 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 cilindro. El cilindro 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 cilindro, por debajo del depósito 26, y el cilindro 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 cilindro 21. El filtrado acuoso se recolecta en el depósito 27. En cima del cilindro se coloca una fila de cabezas pulverizadoras 28. Estas cabezas se pueden utilizar para añadir agua al cilindro, para que sirva como lubricante durante el filtrado, o después de terminar el filtrado, para liberal los residuos del cilindro y recolectarlos en el depósito 25. Este depósito se puede retirar deslizándolo sobre el eje 25.

**Figura 4**

La Figura 4 representa esquemáticamente otra realización de un sistema 20 para su uso de acuerdo con la invención, en el que 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 µm), 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 material particulado macroscópico de las heces disueltas. La fracción acuosa 10 que contiene los ooquistes se recolecta y se aporta un filtro rotatorio 21' con forma de cilindro (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 ooquistes y un primer residuo (no mostrado), que comprende partículas mayores que los ooquistes. 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 ooquistes a través de esta plataforma de filtro, de manera que se produce un resto que comprende los ooquistes purificados en el lado interno de esta plataforma de filtro 22' con forma de cilindro. El filtrado de desechos 12 comprende partículas más pequeñas que los ooquistes, 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 ooquistes 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 cilindro 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 cilindro está por debajo del nivel de agua. El cilindro se monta con su eje longitudinal 24 extendiéndose en paralelo con la superficie de este volumen de agua. Durante la esporulación el cilindro rota para mantener la capa 40 intermitentemente en el oxígeno que contiene el ambiente gaseoso 60. El cilindro gira a 10-12 rpm a través del agua 50'. La humedad relativa del ambiente gaseoso en el cilindro es del 100 %. Se descubrió que de esta manera los ooquistes 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 cilindro que tiene una longitud de 40 cm y un diámetro del cilindro de 80 cm (Se pueden utilizar ventajosamente cilindros 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 cilindros 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 ooquistes purificados (una composición que contenía una cantidad estimada de aproximadamente 85 gramos de partículas fecales no ooquistes, normalmente granos de arena finos, partículas de barro y arcilla, y aproximadamente 34 gramos de ooquistes) 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 cilindro 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 ooquistes esporulados pueden servir como antígeno para una vacuna de coccidiosis como se conoce en la técnica anterior.



REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar ooquistes de coccidio que tienen dimensiones entre  $D_{min}$  y  $D_{max}$  de heces, que comprende las etapas de recoger las heces (5) que contienen los ooquistes de coccidios de los animales huésped, diluir las heces en un medio acuoso (7), opcionalmente separar una fracción gruesa (11) que comprende materia particulada macroscópica de las heces diluidas y recoger una fracción acuosa (10) que contiene los ooquistes, **caracterizado por que** el método comprende además
- filtrar la fracción acuosa sobre una primera plataforma de filtro (21) que tiene aberturas de malla que dejen pasar los ooquistes, con el fin de obtener un filtrado acuoso (11, 32) que comprende los ooquistes y un primer residuo (31) que comprende partículas mayores que los ooquistes,
  - filtrar el filtrado acuoso sobre una segunda plataforma de filtro (22) que tiene aberturas de malla para obstruir el paso de los ooquistes a través de la plataforma de filtro, con el fin de obtener un segundo residuo (40) que comprende los ooquistes purificados y un filtrado de deshecho (12, 42) que comprende partículas más pequeñas que los ooquistes,
  - en donde el segundo residuo es adecuado para su uso en una vacuna.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la primera plataforma de filtro tiene aberturas de malla más grandes que  $D_{min}$  y hasta  $D_{max}$  y la segunda plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de  $D_{min}$ .
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la primera plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de  $D_{max}$  y la segunda plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de  $D_{min}$ .
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la primera plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de 50  $\mu m$  y la segunda plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de 10  $\mu m$ .
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la segunda plataforma de filtro tiene forma de cilindro, el filtrado acuoso se carga en el interior de este cilindro y el cilindro rota mientras se filtra el filtrado acuoso.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la primera plataforma de filtro tiene forma de cilindro, la fracción acuosa se carga en el interior de este cilindro y el cilindro rota mientras se filtra la fracción acuosa.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** durante el filtrado se añade medio acuoso adicional a las plataformas de filtro.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** el medio acuoso adicional tiene una temperatura de entre 19 °C y 37 °C.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** el medio acuoso adicional tiene una temperatura de aproximadamente 28 °C.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la purificación de los ooquistes no comprende una etapa de centrifugación.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el método comprende además esporular el ooquiste purificado en el segundo residuo.
12. Uso de un sistema (20) para purificar ooquistes de coccidios que tienen dimensiones entre  $D_{min}$  y  $D_{max}$  de heces o una fracción fina de las mismas, comprendiendo el sistema:
- una primera plataforma de filtro sin fin (21') que tiene aberturas de malla adecuadas para dejar pasar los ooquistes por la plataforma de filtro en un filtrado (11) y obstruir partículas más grandes que los ooquistes,
  - medios para cargar automáticamente el filtrado al interior de la segunda plataforma de filtro sin fin (22'),
  - teniendo la segunda plataforma de filtro aberturas de malla para obstruir el paso de los ooquistes a través de esta plataforma de filtro y dejar pasar partículas más pequeñas que los ooquistes.
13. Uso de un sistema de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado por que** las plataformas de filtro tienen forma de cilindro.
14. Uso de un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, **caracterizado por que** la primera

## ES 2 716 905 T3

plataforma de filtro tiene aberturas de malla más grandes que  $D_{min}$  y hasta  $D_{max}$  y la segunda plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de  $D_{min}$ .

5 15. Uso de un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado por que** la primera plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de  $D_{max}$  y la segunda plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de  $D_{min}$ .

10 16. Uso de un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, **caracterizado por que** la primera plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de  $50\ \mu m$  y la segunda plataforma de filtro tiene aberturas de malla de alrededor de  $10\ \mu m$ .

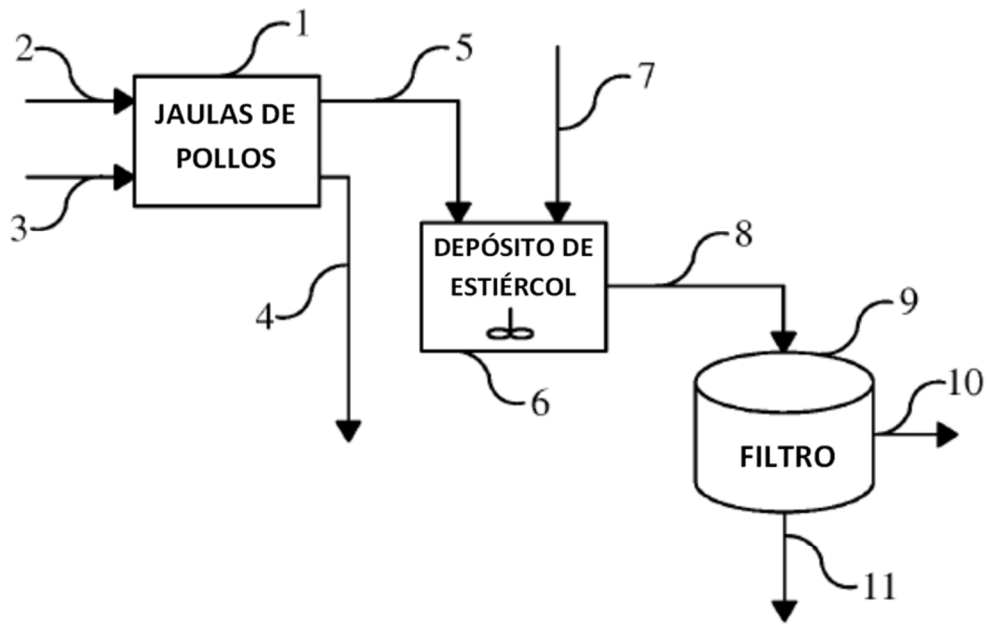


FIG. 1

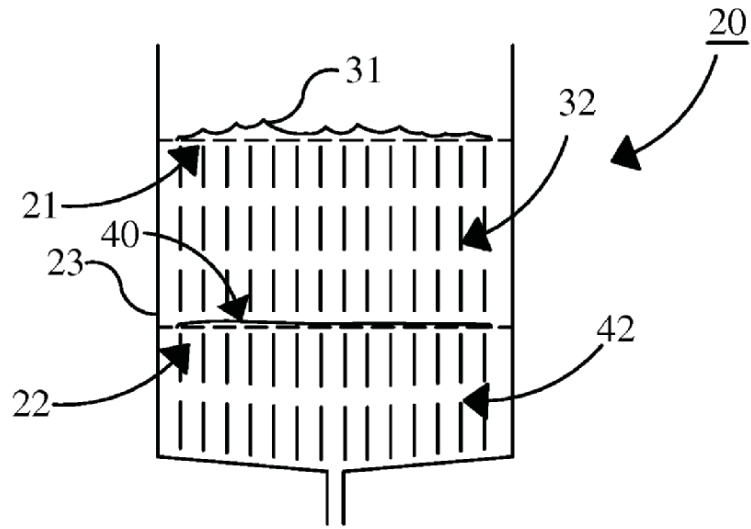


FIG. 2

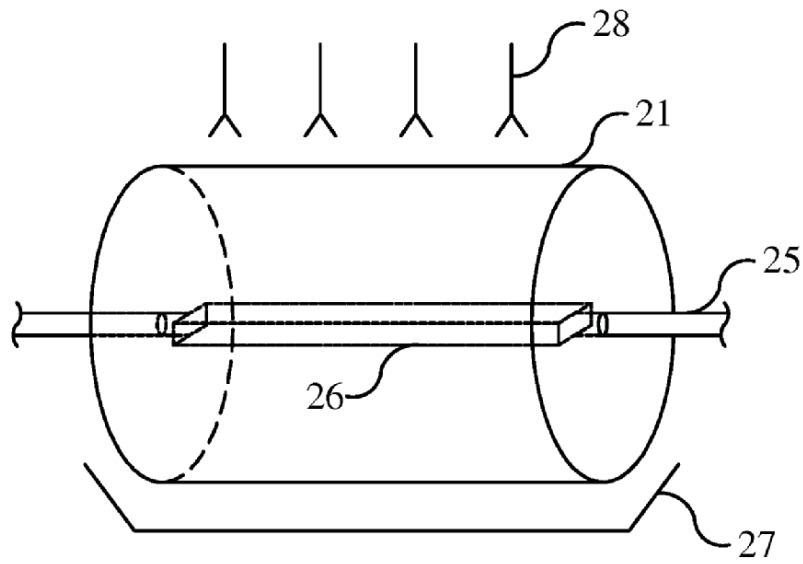
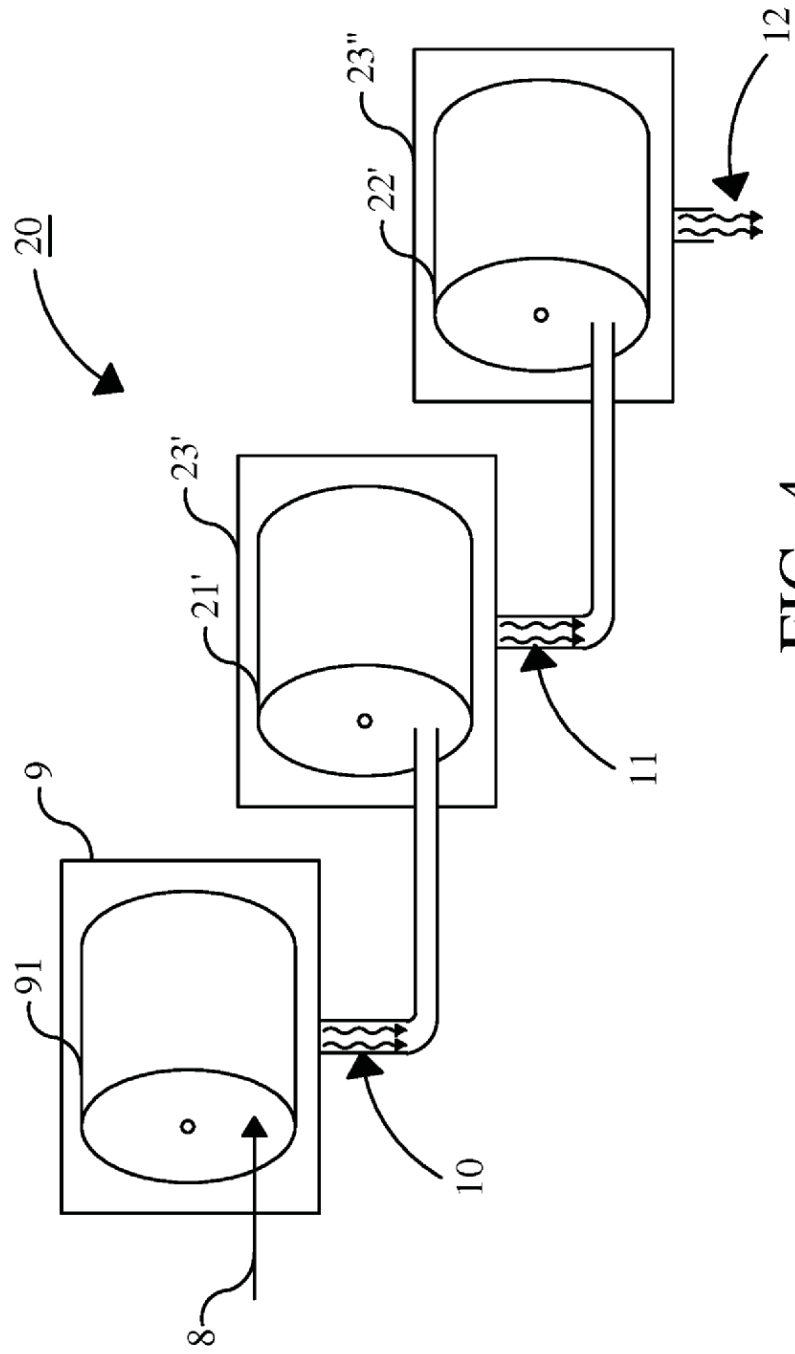


FIG. 3



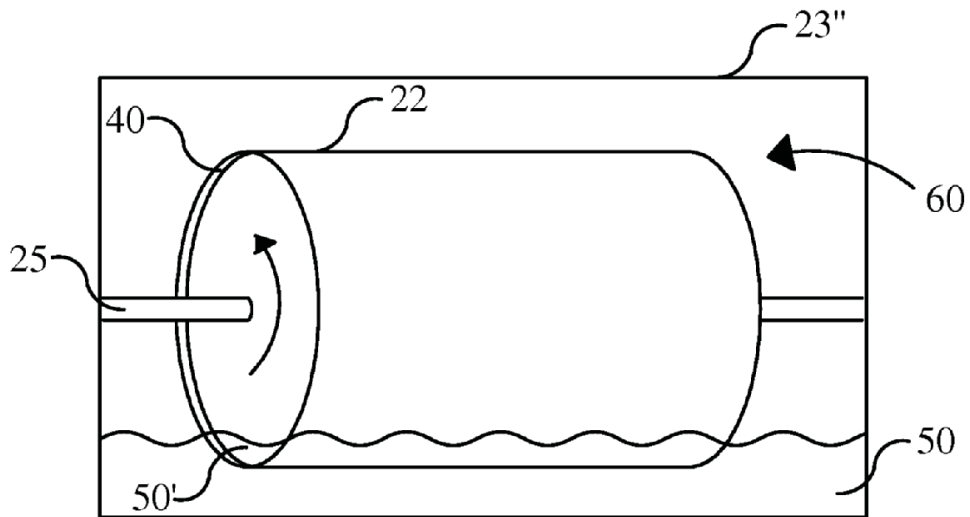


FIG. 5