

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 994**

51 Int. Cl.:

A61K 31/722 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 33/04 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2013 PCT/FR2013/053010**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14091138**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2013 E 13818279 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2931289**

54 Título: **Quitina o sus derivados para la prevención y/o el tratamiento de parasitosis**

30 Prioridad:

14.12.2012 FR 1262072

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

13.12.2019

73 Titular/es:

**LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)
41, rue Etienne Marcel
75001 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**AUCLAIR, ERIC;
MARDEN, JEAN-PHILIPPE;
LAURENT, FABRICE y
LACROIX-LAMANDE, SONIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 734 994 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

Quitina o sus derivados para la prevención y/o el tratamiento de parasitosis

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al campo de la prevención y/o el tratamiento de parasitosis, en particular de la criptosporidiosis, en el hombre y en animales

Antecedentes de la técnica

10 La criptosporidiosis es una enfermedad asociada a un protozoario, *Cryptosporidium*, que tiene consecuencias económicas negativas muy considerables en el ganado, a causa del aumento de la mortalidad y los retrasos del crecimiento, del coste de las intervenciones veterinarias y de los tratamientos que implica, así como del aumento de tiempo de trabajo para la gestión de los animales enfermos.

La criptosporidiosis afecta también al hombre y puede tener consecuencias graves en pacientes inmunodeprimidos, en particular en pacientes que portan el VIH, así como en recién nacidos.

15 El principal síntoma clínico asociado a la criptosporidiosis es una diarrea aguda. Los demás síntomas clínicos asociados a la criptosporidiosis son, en particular, deshidratación, debilidad intensa, pérdida de apetito y cólicos. Estos diferentes síntomas clínicos pueden implicar la muerte, particularmente de animales jóvenes.

La halofuginona es el único medicamento que posee una autorización de distribución en el mercado en Francia para la prevención y/o el tratamiento de la criptosporidiosis en terneras.

20 No obstante, la eficacia de la halofuginona no solo es parcial, sino que presenta una cierta toxicidad y se ha descrito un riesgo de desarrollo de resistencia de las criptosporidiosis a este compuesto, (véase Silverlas et al., Preventive Veterinary Medicine, 2009, 91:73-84).

Además, no se ha registrado medicamento alguno para el tratamiento de la criptosporidiosis en cabras y corderos.

En el hombre, la nitazoxanida y la paromomicina han sido utilizadas en el tratamiento de la criptosporidiosis. No obstante, en la actualidad, estas moléculas no tienen autorizaciones de distribución en el mercado en algunos países. Por ejemplo, no tienen autorización de distribución en el mercado en Francia.

25 Por tanto, no existe una solución realmente satisfactoria para la prevención y/o el tratamiento de la criptosporidiosis.

La quitina y el quitosano son compuestos biocompatibles, biodegradables y no tóxicos, caracterizados por una fuerte carga negativa. La quitina y el quitosano son utilizados en numerosas aplicaciones muy variadas, que van desde la agroalimenticia al tratamiento de aguas, pasando por técnicas analíticas, en cosmética y en el campo médico (véase Shahidi et al., Trends in Food Science & Technology, 1999, 10: 37-51).

30 Gracias a sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, la quitina y el quitosano son utilizado en particular como agente de conservación en la fabricación de películas alimentarias de protección.

35 En el campo médico, el quitosano es utilizado, por ejemplo, como adyuvante en vacunas, como hemostático, anticoagulante, antitrombógeno, como matriz para la fabricación de tejidos (piel, hueso, cartílago, hígado, nervios, vasos sanguíneos), agente de aceleración de la cicatrización y tratamiento de quemaduras, soporte para el transporte, inmovilización y encapsulación de moléculas, como para la liberación controlada de medicamentos.

40 Por ejemplo, Alvarez et al. (European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012, 47: 215-227) se ensayó *in vitro* el efecto de microesferas basadas en quitosano y poli(alcohol vinílico) que contenían como medicamento un complejo de furoato de dioxanida y de ciclodextrinas, sobre la infección de células intestinales por *C. parvum*. Los autores indican que la adhesión de las microesferas a las células intestinales *in vitro* podría permitir inhibir la unión de *C. parvum* a las células intestinales y servir de sistema de liberación del medicamento. Sin embargo, no se ha demostrado la capacidad de adhesión de estas microesferas a las células intestinales después de una administración.

45 Por tanto, existe una necesidad real de soluciones alternativas para la prevención y/o el tratamiento de las parasitosis y, en particular, de la criptosporidiosis. Preferentemente, estas soluciones alternativas tienen pocos efectos tóxicos o ninguno, se basan en compuestos de origen natural cuya inocuidad en el hombre y/o el animal son conocidas y son sencillas de preparar y de utilizar.

Compendio de la invención

50 De forma general, la presente invención se basa en la evidencia de que, de forma completamente original, la quitina o los derivados de quitina utilizados como único principio activo son eficaces para la prevención y/o el tratamiento de parasitosis.

Mediante "parasitosis" se entiende en la presente memoria descriptiva una enfermedad asociada a un protozooario, por ejemplo, *Cryptosporidium* en el caso de la criptosporidiosis.

La presente invención tiene particularmente por objeto la quitina o derivados de quitina utilizados como el único principio activo en la prevención y/o el tratamiento de la criptosporidiosis.

- 5 La invención se refiere igualmente a composiciones originales que asocian la quitina y/o un derivado de quitina como principio activo como uno o varios otros compuestos de origen natural, para el tratamiento y/o la prevención de parasitosis y, en particular, de la criptosporidiosis.

Estas composiciones originales según la invención permiten en particular reducir la mortalidad en animales jóvenes y/o la diarrea.

- 10 Además, estas composiciones presentan la ventaja de contener solo compuestos de origen natural cuya inocuidad en el hombre y/o animales es conocida a las dosis de utilización aconsejadas.

Por tanto, estas composiciones originales tienen pocos efectos tóxicos o ninguno.

El procedimiento de preparación de estas composiciones es simple de llevar a cabo, precisando solo una mezcla de diferentes compuestos.

- 15 Estas composiciones originales presentan también la ventaja de poder ser integradas en composiciones alimenticias, tanto sólidas como líquidas.

Un primer objeto de la invención se refiere por tanto a una composición que comprende:

- al menos un agente de base escogido entre quitina o un derivado de quitina, y
- un agente para estimular la inmunidad, como agentes secundarios.

- 20 El derivado de quitina se escoge entre quitosano, N-acetil-glucosamina o glucosamina.

Los agentes de base preferidos son quitosano y N-acetil-glucosamina.

El agente para estimular la inmunidad es una mezcla de paredes de levaduras, extracto de levadura, selenio y una bacteria del género *Bacillus*.

- 25 La composición puede comprender además un agente antiparasitario escogido entre un aceite esencial, carbón activado, ácido láurico o sus combinaciones.

Un agente antiparasitario preferido comprende un aceite esencial.

Dicha composición puede ser una composición alimenticia, un complemento alimenticio o una composición farmacéutica.

- 30 Un segundo objeto de la invención se refiere a la quitina, un derivado de quitina o una composición como se definió con anterioridad para una utilización en la prevención y/o el tratamiento de una parasitosis, preferentemente criptosporidiosis, en particular en el hombre o en animales.

Se proporciona a continuación una descripción más detallada de ciertos modos de realización preferidos de la invención.

Descripción detallada

- 35 Como se indicó anteriormente, la invención se refiere a composiciones basadas en quitina y/o derivados de quitina utilizados como principio activo y denominados en la presente memoria descriptiva agentes de base.

Estas composiciones pueden comprender además otros compuestos, preferentemente compuestos de origen natural, denominados en la presente memoria descriptiva agentes secundarios.

Los agentes secundarios se escogen entre un agente para estimular la inmunidad y un agente antiparasitario.

- 40 Por tanto, la presente invención tiene por objeto una composición que comprende:

- al menos un agente de base escogido entre quitina o un derivado de quitina, y
- un agente para estimular la inmunidad como se define en la reivindicación 1.

El derivado de quinta se escoge entre quitosano, N-acetil-glucosamina o glucosamina.

La quitina es un componente que se encuentra, por ejemplo, en el exoesqueleto de los artrópodos, el endoesqueleto

de los cefalópodos o la pared de los hongos.

La quitina es un polisacárido lineal compuesto principalmente por monómeros de N-acetil-glucosamina unidos entre ellos mediante enlaces $\beta(1-4)$.

- 5 La quitina se obtiene generalmente mediante un procedimiento que comprende etapas de desproteínización y, ocasionalmente, desmineralización de la cutícula o el caparazón de crustáceos, seguidamente generalmente de una etapa de decoloración.

La etapa de desproteínización es generalmente una etapa de tratamiento básico (por ejemplo, con sosa, potasa, carbonato de sodio, carbonato de potasio o fosfato de sodio).

- 10 La etapa de desmineralización es generalmente una etapa de tratamiento ácido (por ejemplo, con ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido acético o ácido fórmico).

La etapa de decoloración se efectúa, por ejemplo, mediante tratamiento con un agente oxidante.

La quitina tiene un grado de acetilación (DA) superior a 50%.

El grado de acetilación es el número medio de unidades de N-acetil-glucosamina para 100 monómeros.

Se puede utilizar también el grado de desacetilación (DDA) es que igual a $100 - DA$ (en porcentaje).

- 15 Mediante "derivado de quitina" se entiende cualquier compuesto que puede ser obtenido a partir de quitina, en particularmente, mediante una o varias etapas de hidrólisis, desacetilación, carboximetilación, succinilación o acidificación.

Un ejemplo de quitina es el quitosano.

- 20 El quitosano, denominado también chitosán, es un polisacárido lineal compuesto por monómeros de glucosamina y N-acetil-glucosamina distribuidos de forma aleatoria y unidos entre ellos mediante enlaces $\beta(1-4)$.

El quitosano tiene un grado de acetilación (DA) inferior a 50%.

El quitosano utilizado en la composición según la invención tiene preferentemente un grado de acetilación inferior a 40%, más preferentemente inferior a 30%, incluso más preferentemente inferior a 20%, por ejemplo, inferior o igual a 10%.

- 25 El quitosano puede ser obtenido mediante desacetilación química (por ejemplo, mediante tratamiento en una solución de sosa concentrada), termoquímica o enzimática de quitina.

El quitosano así obtenido es generalmente insoluble en soluciones acuosas ácidas (particularmente aun pH inferior a 6).

- 30 Es posible utilizar métodos bien conocidos por el experto en la técnica para hacer el quitosano soluble en soluciones acuosas ácidas (particularmente a un pH inferior a 6).

Por ejemplo, puede ser obtenido quitosano soluble mediante tratamiento con ácido clorhídrico.

Una composición según la invención puede comprender quitosano soluble y/o quitosano insoluble.

En el contexto de la presente invención, el carácter insoluble o soluble del quitosano se determina por tanto mediante la medición de su solubilidad en solución acuosa ácida, en particular a un pH inferior a 6.

- 35 En una composición preferida según la invención, el quitosano utilizado es un quitosano soluble.

Otro ejemplo de derivado de quitina es la N-acetil-glucosamina, denominada también N-acetil-D-glucosamina o NAG.

La N-acetil-glucosamina es obtenida, por ejemplo, mediante hidrólisis completa de quitina o quitosano, por ejemplo, mediante hidrólisis enzimática o ácida o incluso mediante N-acetilación de glucosamina.

- 40 Todavía, otro ejemplo de derivado de quitina es la glucosamina, denominada también D-Glucosamina.

La glucosamina es obtenida, por ejemplo, mediante hidrólisis completa de quitosano, como hidrólisis enzimática o ácida.

Los derivados de quitina preferidos para ser utilizados en las composiciones según la invención son quitosano y N-acetil-glucosamina.

Una composición preferida según la invención comprende un único agente de base.

Cuando la composición comprende un solo agente de base, el agente de base es preferentemente quitosano o N-acetil-glucosamina, más preferentemente quitosano.

En un modo de realización ventajoso, la composición según la invención comprende al menos dos agentes de base.

- 5 Por ejemplo, otra composición preferida según la invención puede comprender dos agentes de base.

Cuando la composición según la invención comprende dos agentes de base, estos dos agentes de base son preferentemente quitosano y N-acetil-glucosamina.

En otro modo de realización de la invención, la composición comprende al menos tres agentes de base, por ejemplo, tres agentes de base, cuatro agentes de base o más.

- 10 Una composición preferida según la invención comprende, como agentes de base, quitosano y, opcionalmente, N-acetil-glucosamina.

El agente para estimular la inmunidad es preferentemente un compuesto de origen natural o una combinación de compuestos de origen natural.

- 15 Por tanto, la presente invención tiene por objeto una composición como se define con anterioridad, caracterizada porque el agente para estimular la inmunidad es una mezcla de paredes de levaduras, un extracto de levadura, selenio, o un microorganismo que es una bacteria del género *Bacillus*.

Las paredes de levaduras corresponden a la fracción insoluble de las levaduras, es decir, la pared de las levaduras y la membrana plasmídica de las levaduras.

Un extracto de levadura corresponde a la fracción soluble de las levaduras.

- 20 La levadura utilizada para preparar las paredes de levaduras y/o el extracto de levadura se escogen preferentemente entre el género *Saccharomyces*, preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, o *Saccharomyces bayanus*; el género *Torulasporea*, preferentemente *Torulasporea delbrueckii*; el género *Lindnera*, por ejemplo, *Lindnera jadinii*; y el género *Kluyveromyces*, preferentemente *Kluyveromyces lactis* o *Kluyveromyces marxianus*.

- 25 Una levadura preferida para preparar las paredes de levaduras y/o el extracto de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

Normalmente, las paredes de levaduras o el extracto de levadura se obtienen mediante un procedimiento que comprende una etapa de autólisis de las levaduras seguida de una etapa de separación de la fracción soluble respecto a la fracción insoluble, correspondiendo la fracción insoluble aislada a las paredes de levaduras y correspondiendo la fracción soluble al extracto de levadura.

- 30

La fracción insoluble y/o la fracción soluble pueden ser seguidamente secadas

En un modo de realización ventajoso, las paredes de levaduras se obtienen según un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- producción de levaduras en fermentador para obtener una crema de levadura,
- 35 - acidificación de la crema de levadura a un pH comprendido entre 1 y 5,
- autólisis a una temperatura fija o variable comprendida entre 45°C y 70°C, eventualmente en presencia de enzimas proteolíticas,
- separación de la fracción insoluble correspondiente a las paredes de levaduras (entre 10% y 14% de materia seca),
- enfriamiento a 4°C;
- 40 - ocasionalmente, secado.

Las paredes de levaduras se pueden presentar en forma líquida, en forma seca o en forma viscosa. Se considera que están en forma seca cuando su contenido de materia seca es de al menos 85%, preferentemente al menos 90% y, todavía más preferentemente, al menos 94% en peso. Por el contrario, si su contenido de materia seca es inferior a 20% en peso, se considera que están en forma líquida. A partir de 20% y por debajo de 85% en peso de materia seca, se considera que las paredes de levaduras están en forma viscosa.

- 45

Las paredes de levaduras comprenden mayoritariamente glúcidos (entre 40% y 60% de glúcidos en peso de materia seca) constituidos principalmente por β -glucanos y mananos. Contienen también de 10% a 30%, en particular

aproximadamente de 15 a 30% de materias proteicas en peso de materia seca.

Las paredes de levaduras son utilizadas preferentemente en forma seca.

En un modo de realización ventajoso, el extracto de levadura es obtenido según un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- 5 - producción de levaduras en fermentador para obtener una crema de levadura,
- acidificación de la crema de levadura a un pH comprendido entre 1 y 5,
- autólisis a una temperatura fija o variable comprendida entre 45°C y 70°C, ocasionalmente en presencia de enzimas proteolíticas,
- separación de la fracción soluble correspondiente al extracto de levadura,
- 10 - enfriamiento a 4°C,
- ocasionalmente, secado.

El extracto de levadura se puede presentar en forma seca, preferentemente en forma de polvo hidrosoluble fino, en forma líquida o en forma de pasta.

- 15 Se considera que el extracto de levadura está en forma seca cuando su contenido de materia seca es de al menos 85%, preferentemente de al menos 90% y, más preferentemente, incluso de al menos 94% en peso. Si su contenido de materia seca es inferior a 70% en peso, se considera que está en forma líquida. A partir de 70% y por debajo de 85% en peso de materia seca, se considera que el extracto de levadura está en forma de pasta.

El extracto de levadura utilizado está preferentemente en forma seca, más preferentemente en forma de polvo hidrosoluble fino.

- 20 Un extracto de levadura comprende mayoritariamente materias proteicas, preferentemente al menos 55% de materias proteicas.

El selenio es el selenio en forma mineral o en forma orgánica, preferentemente en forma orgánica.

- 25 El selenio en forma orgánica está, por ejemplo, en forma de selenometionina, selenocisteína, selenóxido, S-(metilseleno)cisteína, Se-metilselenocisteína, Se-adenosilhomocisteína, selenoantionina, selenocistina, selenocistationina, γ -glutamyl-Se-metilselenocisteína, dimetilseleniuro, dimetildiseleniuro, detilseleniuro, ácido (S)-2-amino-4-(metilselanil)butanoico, ácido R,S-2-hidroxi-4-metilselenobutanoico o sus combinaciones.

El selenio en forma orgánica a aportado, por ejemplo, en forma de una levadura enriquecida en selenio, selenio extraído total o parcialmente de levadura o sus combinaciones.

- 30 Una levadura enriquecida en selenio puede ser obtenida mediante multiplicación de levaduras en presencia de selenio.

Preferentemente, la levadura enriquecida en selenio es una levadura de *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura enriquecida en selenio está preferentemente en forma de levadura inactivada, siendo inactivada la levadura, por ejemplo, mediante tratamiento térmico.

- 35 La levadura enriquecida en selenio comprende, por ejemplo, al menos 2000 mg de selenio por kg de materia seca con 97% a 99% de selenio y en forma orgánica y un 63% de selenio total está en forma de selenometionina.

La levadura enriquecida en selenio es utilizada preferentemente en forma de polvo.

Por tanto, la presente invención tiene particularmente por objeto una composición como se define con anterioridad, caracterizada porque el selenio está en forma de una levadura enriquecida en selenio, selenio extraído total o parcialmente de levadura o sus combinaciones.

- 40 En una composición preferida de la invención, el selenio está en forma de una levadura enriquecida en selenio.

El microorganismo comprendido en el agente para estimular la inmunidad según la reivindicación 1 es una bacteria del género *Bacillus*.

- 45 La composición según la invención puede comprender además otro agente para estimular la inmunidad, que es un microorganismo escogido entre una bacteria del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Pediococcus* o *Lactococcus*, o una levadura del género *Saccharomyces* o *Kluyveromyces* o sus combinaciones.

- Un microorganismo del género *Bacillus* es escogido, por ejemplo, entre las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus agglomerans*, *Bacillus clausii* o *Bacillus cereus*.
- 5 Un microorganismo del género *Lactobacillus* es escoge, por ejemplo, entre las especies *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus gasseri* o *Lactobacillus salivarius*.
- Un microorganismo del género *Bifidobacterium* se escoge, por ejemplo, entre las especies *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve* o *Bifidobacterium adolescentis*.
- 10 Un microorganismo del género *Enterococcus* se escoge, por ejemplo, entre las especies *Enterococcus faecium*.
- Un microorganismo del género *Propionibacterium* se escoge, por ejemplo, entre las especies *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acidipropionici* o *Propionibacterium jensenii*.
- Un microorganismo del género *Lactococcus* se escoge, por ejemplo, entre las especies *Lactococcus lactis* o *Lactococcus thermophilus*.
- 15 Un microorganismo del género *Saccharomyces* es escogido, por ejemplo, entre las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* o *Saccharomyces bayanus*.
- Un microorganismo del género *Kluyveromyces* es escogido, por ejemplo, entre las especies *Kluyveromyces lactis* o *Kluyveromyces marxianus*.
- 20 Un microorganismo del género *Pediococcus* es escogido, por ejemplo, entre las especies *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus dextrinicus* o *Pediococcus pentosaceus*.
- En una composición preferida de la invención, la bacteria del género *Bacillus* es de la especie *Bacillus subtilis*.
- En otra composición preferida según la invención, el microorganismo es una bacteria del género *Lactobacillus*, más preferentemente *Lactobacillus johnsonii*.
- 25 Todavía en otra composición preferida según la invención, el microorganismo es una combinación de una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Lactobacillus*, más preferentemente una combinación de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus johnsonii*.
- El microorganismo puede estar vivo o desactivado.
- Mediante "desactivado" o incluso "inactivado" se entiende un microorganismo muerto, es decir, cuyo metabolismo está irremediablemente detenido.
- 30 Un microorganismo desactivado puede ser obtenido mediante técnicas bien conocidos por un experto en la técnica, como un tratamiento térmico, un tratamiento consistente en someter el microorganismo a varios ciclos de congelación sucesivos, un tratamiento por irradiación, un tratamiento por atomización o una combinación de estos tratamientos.
- Preferentemente, la composición según la invención comprende un microorganismo desactivado.
- 35 El agente antiparasitario es preferentemente un compuesto de origen natural o una combinación de compuestos de origen natural.
- El agente antiparasitario se escoge, por ejemplo, entre un aceite esencial, carbón activado, ácido láurico o sus combinaciones.
- 40 Un agente antiparasitario preferido consiste en un aceite esencial o una mezcla de aceites esenciales y, opcionalmente, carbón activado y/o ácido láurico.
- Un aceite esencial es un líquido concentrado en compuestos aromáticos volátiles de una planta.
- La expresión "aceite esencial" es sinónima de la expresión "esencia vegetal".
- Los procedimientos de obtención de un aceite esencial a partir de una planta son bien conocidos por un experto en la técnica.
- 45 El aceite esencial puede ser obtenido, por ejemplo, mediante hidrodestilación, es decir, destilación mediante arrastre con vapor de agua, extracción con disolventes volátiles, extracción mediante expresión en frío o extracción con CO₂ supercrítico.

La presente invención tiene particularmente por objeto una composición como se define con anterioridad, caracterizada porque el aceite esencial se escoge entre aceite esencial de ajo, aceite esencial de limoncillo, aceite esencial de canela, aceite esencial de tomillo, aceite esencial de orégano, aceite esencial de árbol de té, aceite esencial de limón, aceite esencial de eucaliptus o sus combinaciones.

5 El aceite esencial de ajo tiene un elevado contenido de alicina y puede ser obtenido a partir de *Allium sativum*.

El aceite esencial de limoncillo tiene un elevado contenido de citral y citranal y puede ser obtenido a partir de *Melissa officinalis*.

El aceite esencial de canela tiene un elevado contenido de cinamaldehído y acetato de cinamilo y puede ser obtenido a partir de *Cinnamomum zeylanicum*.

10 El aceite esencial de tomillo tiene un elevado contenido de tomillo y puede ser obtenido a partir de *Thymus vulgaris*.

El aceite esencial de orégano tiene un elevado contenido de timol y carvacrol y puede ser obtenido a partir de *Origanum vulgare*.

El aceite esencial de árbol de té tiene un elevado contenido de gamma-terpineno, terpinen-4-ol y alfa-terpineol y puede ser obtenido a partir de *Melaleuca alternifolia*.

15 El aceite esencial de limón tiene un elevado contenido de limoneno y puede ser obtenido a partir de *Citrus limon*.

El aceite esencial de eucaliptus tiene un elevado contenido de 1,8-cineol y puede ser obtenido a partir de *Eucalyptus globulus* o *Eucalyptus radiata*.

Preferentemente, el agente antiparasitario comprende o consiste en una mezcla de al menos dos aceites esenciales, preferentemente al menos tres aceites esenciales, más preferentemente incluso cuatro aceites esenciales.

20 En un modo de realización particularmente ventajoso, el aceite esencial o la mezcla de aceites esenciales están encapsulados en paredes de levadura.

Por tanto, se habla de aceite esencial encapsulado o de mezcla encapsulada de aceites esenciales.

25 Los procedimientos de encapsulación de los aceites en paredes de levadura son bien conocidos por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, el documento EP0242135 o la publicación de Normand et al., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 7532-7543).

Normalmente, el aceite esencial encapsulado o la mezcla encapsulada de aceites esenciales en paredes de levadura son obtenidos mediante una etapa de poner en contacto dicho aceite esencial o dicha mezcla de aceites esenciales que van a ser encapsulados en una suspensión que comprende paredes de levadura, seguido de una ocasional etapa de secado.

30 Las paredes de levadura utilizadas son como se definen con anterioridad.

Se trata preferentemente de paredes de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*.

La presente invención tiene más particularmente por objeto una composición como se define con anterioridad, caracterizada porque el agente antiparasitario comprende aceite esencial de ajo, aceite esencial de limoncillo, aceite esencial de canela y aceite esencial de tomillo.

35 En un modo de realización preferido, los aceites esenciales de ajo, limoncillo, canela y tomillo son aportados en forma de una mezcla de estos cuatro aceites esenciales.

Dicha mezcla de aceites esenciales de ajo, limoncillo, canela y tomillo está preferentemente encapsulada en paredes de levadura.

40 Una mezcla de aceites esenciales preferida según la invención comprende de 3% a 7% de aceite esencial de ajo, de 7% a 13% de aceite esencial de limoncillo, de 59% a 69% de aceite esencial de canela y de 21% a 32% de aceite esencial de tomillo, siendo expresados los porcentajes en peso respecto al peso de la mezcla.

45 En otro modo de realización ventajoso, la mezcla de aceites esenciales anterior está encapsulada en paredes de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y esta mezcla encapsulada de aceites esenciales comprende de 10% a 30% de aceites esenciales en peso respecto al peso total, preferentemente de 20% a 30% de aceites esenciales en peso respecto al peso total.

El carbón activado, denominado también carbón activo o carbón vegetal activado, es un polvo negro, ligero, constituido esencialmente por materia carbonada de estructura porosa, caracterizado por una gran superficie específica.

El carbón activado puede ser producido a partir de cualquier materia orgánica vegetal con elevado contenido de carbono mediante procedimientos bien conocidos por un experto en la técnica.

El ácido láurico, denominado también ácido dodecanoico, es un ácido graso de cadena media compuesta por 12 átomos de carbono.

5 Un ejemplo de composición según la invención comprende o consiste en:

- quitosano y/o N-acetil-glucosamina como agentes de base, preferentemente quitosano,

- un agente para estimular la inmunidad que comprende o consiste en:

- o paredes de levadura,
- o un extracto de levadura,

10 o selenio, preferentemente en forma de una levadura con elevado contenido de selenio, y

- o un microorganismo que es *Bacillus subtilis* y, opcionalmente, además otro microorganismo escogido entre *Lactobacillus johnsonii* o *Saccharomyces cerevisiae* o sus combinaciones.

- un agente antiparasitario que comprende o consiste en:

15 o aceite esencial de tomillo, aceite esencial de limoncillo, aceite esencial de canela y aceite esencial de ajo, preferentemente en forma de una mezcla encapsulada de aceites esenciales,

- o opcionalmente carbón activado, y

- o opcionalmente ácido láurico.

Una composición preferida según la invención comprende o consiste en:

20 - 2% a 15% de quitosano, preferentemente de 4% a 10% de quitosano, más preferentemente de 6% a 10% de quitosano y/o de 2% a 30% de N-acetil-glucosamina, preferentemente de 2% a 20% de N-acetil-glucosamina, más preferentemente de 4% a 10% de N-acetil-glucosamina como agentes de base (preferentemente quitosano y, opcionalmente, N-acetil-glucosamina),

- un agente para estimular la inmunidad que comprende o consiste en:

25 o 25% a 85% de paredes de levadura, preferentemente de 30% a 70% de paredes de levadura, más preferentemente de 40% a 60% de paredes de levadura,

- o 1% a 15% de un extracto de levadura, preferentemente de 2% a 10% de un extracto de levadura, más preferentemente de 2% a 5% de un extracto de levadura,

30 o 0,002% a 0,02% de selenio, preferentemente de 0,004% a 0,01% de selenio, más preferentemente de 0,004% a 0,006% de selenio, o bien de 1% a 10% de levadura con elevado contenido de selenio, preferentemente de 2% a 5% de levadura con elevado contenido de selenio, más preferentemente de 2% a 3% de levadura con elevado contenido de selenio,

35 o de 10^5 UFC a 10^{12} UFC por 100 g de composición de un microorganismo *Bacillus subtilis* y, opcionalmente, además otro microorganismo escogido entre *Lactobacillus johnsonii*, *Saccharomyces cerevisiae* o sus combinaciones, preferentemente 10^5 UFC a 10^{11} UFC, preferentemente de 10^5 UFC a 10^{10} UFC, preferentemente de 10^6 UFC a 10^9 UFC, más preferentemente de 10^6 UFC a 10^8 UFC,

- un agente antiparasitario que comprende o consiste en:

40 o 0,4% a 20% de un aceite esencial, preferentemente de 0,4% a 12%, más preferentemente de 1% a 6% , todavía más preferentemente de 1,5 a 4%, estando el aceite esencial preferentemente en forma de una mezcla encapsulada de aceites esenciales de tiempo, limoncillo, canela y ajo, o bien de 2% a 65% de aceite esencial encapsulado, preferentemente de 2% a 40%, más preferentemente de 5% a 20%, todavía más preferentemente de 8% a 12%, estando el aceite esencial encapsulado preferentemente en forma de una mezcla de aceites esenciales de tomillo encapsulada, limoncillo, canela y ajo,

- o opcionalmente, de 2% a 25% de carbón activado, preferentemente de 4% a 15%, más preferentemente de 4% a 8%, y

45 o opcionalmente, de 5% a 40% de ácido láurico, preferentemente de 5% a 30%, más preferentemente de 6% a 20%.

Los porcentajes están expresados en g respecto a 100 g de composición.

Una UFC corresponde a una Unidad Formadora de Colonias.

En las composiciones que anteceden, los porcentajes de paredes de levadura no comprenden las ocasionales paredes de levadura utilizadas como agente de encapsulación para encapsular los aceites esenciales.

- 5 Las composiciones según la invención se obtienen mediante una etapa simple de mezcla de sus diferentes constituyentes, ocasionalmente seguida de una etapa de secado.

Generalmente, la mezcla de los diferentes constituyentes proporciona una composición en forma seca, sin necesitar una etapa posterior de secado.

- 10 Las composiciones como se definen con anterioridad están preferentemente en forma seca, en particular en forma de polvo.

Las composiciones según la invención pueden estar también en forma líquida.

Las composiciones líquidas se obtienen generalmente poniendo en solución una composición como se define con anterioridad en forma seca.

Las composiciones según la invención son, por ejemplo, las composiciones A, B, C y D descritas en el ejemplo 3.

- 15 La presente invención tiene también por objeto una composición como se define con anterioridad, caracterizada porque dicha composición es una composición alimenticia, un complemento alimenticio o una composición farmacéutica.

La composición alimenticia puede ser una composición destinada a la alimentación humana o animal.

Una composición alimenticia indica cualquier tipo de alimento, bebida o confitería.

- 20 Cuando la composición alimenticia está destinada a la alimentación humana, la composición alimenticia puede ser, por ejemplo, una bebida, una barrita de cereales, una goma de mascar, chocolate, un producto lácteo, como un producto lácteo fermentado o un producto fermentado de origen vegetal.

Preferentemente, la composición alimenticia está destinada a un animal.

- 25 Una composición alimenticia destinada a un animal puede comprender además, por ejemplo, un compuesto escogido entre lactosuero, leche en polvo, proteínas de lactosuero, alimentos con gluten de maíz, torta de soja, una mezcla previa de minerales y vitaminas, aceite, por ejemplo, aceite de palma o de copra.

La composición alimenticia destinada a un animal es, por ejemplo, agua de bebida, calostro o leche, en particular leche adaptada al animal y su edad.

- 30 La expresión "complemento alimenticio" indica un producto comestible cuyo objetivo es completar el régimen alimenticio normal.

Un complemento alimenticio constituye una fuente concentrada de nutrientes o de otras sustancias que tienen un efecto nutritivo o fisiológico, solos o combinados.

- 35 Un complemento alimenticio es comercializado en forma de dosis, a saber, formas de presentación como una cápsula, pastilla, comprimido, píldora y otras formas similares, bolsita de polvo, ampolla de líquido, frasco provisto de un cuentagotas y otras formas análogas de preparaciones líquidas o en polvo destinadas a ser comprimidas en unidades medidas de baja cantidad.

Una composición farmacéutica según la invención está destinada preferentemente a una administración por vía oral.

Como ejemplo de composición que a en forma adaptada para una vía oral se puede citar un comprimido, una cápsula, una tableta, un polvo una crema, un jarabe, una pasta, un gel o una ampolla.

- 40 La composición farmacéutica puede ser administrada en mezcla con un alimento sólido o líquido (por ejemplo, leche en animales jóvenes).

Una composición farmacéutica puede comprender, además del o de los agentes de base y del o de los agentes secundarios, al menos un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

- 45 Un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable puede ser un vehículo o excipiente apropiado para una administración al hombre y/o un animal.

El vehículo o excipiente se escoge, por ejemplo, entre los normalmente utilizados que son adecuados para la

preparación de formas orales.

Una composición farmacéutica según la presente invención puede comprender, además, al menos un principio activo farmacéutico complementario (es decir, además del o de los agentes de base y del o de los agentes secundarios).

- 5 Mediante "principio activo farmacéutico" se entiende cualquier compuesto o sustancia cuya administración tiene un efecto terapéutico o un efecto beneficioso para la salud o el estado general de un paciente o de un sujeto al que se le administra.

Por tanto, un principio activo farmacéutico complementario puede ser activo contra la criptosporidiosis y/o los síntomas clínicos asociados como diarrea, deshidratación, debilidad, pérdida de apetito y cólicos.

- 10 Ejemplos de principios activos farmacéuticos que pueden estar presentes en una composición de la presente invención incluyen, sin limitación, criptosporidiostáticos, antiinflamatorios, antibióticos, agentes antipiréticos, agentes antieméticos, agentes antihistamínicos, vitaminas, agentes antiespasmódicos, etc.

- 15 En un modo de realización ventajoso, la composición farmacéutica según la invención no contiene un principio farmacéutico complementario para un tratamiento directo contra *Cryptosporidium* como, por ejemplo, un criptosporidiostático.

En otro modo de realización ventajoso, la composición farmacéutica según la invención no contiene un principio activo farmacéutico complementario.

La composición farmacéutica según la presente invención puede ser administrada utilizando cualquier combinación de dosificación y de vía de administración eficaz para obtener el efecto terapéutico deseado.

- 20 La cantidad exacta que va a ser administrada puede variar de un paciente o de un animal a otro, en función de la edad, el peso, estado general y tipo de tratamiento preventivo o curativo.

En particular, la presente invención tiene por objeto una composición como se define con anterioridad para una utilización en la prevención y/o el tratamiento de una parasitosis.

- 25 Como se indicó anteriormente, es la primera vez que se describe la utilización de la quitina o derivados de quitina como único principio activo en la prevención y/o el tratamiento de parasitosis y, en particular, en la prevención y/o el tratamiento de la criptosporidiosis.

También, la presente invención tiene así mismo por objeto la quitina y/o un derivado de quitina para una utilización en la prevención y/o el tratamiento de una parasitosis.

- 30 La presente invención tiene más particularmente por objeto la quitina, un derivado de quitina o una composición como se define con anterioridad, para una utilización en la prevención y/o el tratamiento de una parasitosis, caracterizada porque la parasitosis es criptosporidiosis.

El microorganismo responsable de la criptosporidiosis es *Cryptosporidium*, preferentemente escogido entre las especies *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. andersoni*, *C. cervine*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. suis*, *C. baileyi* y *C. canis*.

- 35 El derivado de quitina es como se define con anterioridad.

El derivado de quitina para una utilización en la prevención y/o el tratamiento de una parasitosis se escoge preferentemente entre quitosano, N-acetil-glucosamina o glucosamina.

- 40 La presente invención tiene particularmente por objeto la quitina, un derivado de quitina o una composición como se define con anterioridad, para una utilización en la prevención y/o el tratamiento de una parasitosis, preferentemente criptosporidiosis, en el hombre o en un animal.

La prevención y/o el tratamiento de la criptosporidiosis en un animal se refiere muy particularmente a animales jóvenes, como ternera, cabrito o cordero.

- 45 En un modo de realización ventajoso, la presente invención tiene por objeto la quitina, un derivado de quitina o una composición como se define con anterioridad, para una utilización en la prevención y/o el tratamiento de una parasitosis, preferentemente criptosporidiosis, en un hombre o un animal, siendo realizada la administración de la quitina, el derivado de quitina o la composición durante la fase calostrala.

Cuando la composición es administrada durante la fase calostrala, dicha composición no comprende preferentemente bacterias vivas y, más generalmente, tampoco microorganismos vivos.

La presente descripción tiene también por objeto un método de tratamiento preventivo o curativo de la criptosporidiosis que comprende una etapa de administración al sujeto enfermo, hombre o animal, de quitosano, un derivado de quitina o una composición como se define con anterioridad.

La dosificación diaria depende del hombre o animal, su edad y el tipo de tratamiento preventivo o curativo.

- 5 Como ejemplo, la dosificación diaria en un hombre corresponde a una administración de 10 g a 25 g de la composición según la invención, preferentemente de 15 a 20 g de la composición.

La dosis diaria puede ser administrada una, dos o tres veces.

También como ejemplo, la dosis diaria en un animal puede ser de:

- 10 - 2 g a 10 g de la composición según la invención por día, durante 7 días consecutivos, para un animal con un peso vivo de 3 kg a 5 kg,
- 5 g a 15 g de la composición según la invención por día, durante 7 días consecutivos, para un animal con un peso vivo de 30 kg a 50 kg,
- 10 g a 20 g de la composición según la invención por día, durante 7 días consecutivos, para un animal con un peso vivo superior a 50 kg.

- 15 A las dosis ensayadas, no se han observado efectos secundarios de la composición según la invención sobre animales.

Otras características y ventajas de la invención se apreciarán todavía mejor a través de la lectura de los ejemplos de realización siguientes, que ilustra la invención sin limitarla, y para cuya comprensión se hará referencia a los dibujos anejos.

- 20 Ejemplo 1: Inhibición de la multiplicación de *C. Parvum in vitro*

Experimentos realizados en colaboración con el equipo "parásitos transmitidos por alimentos" de la entidad Unité Mixte de Recherche Biologie moléculaire et Immunologie Parasitaire et fongique (BIPAR), en la Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Material y métodos

- 25 (i) Líneas celulares

Se ensayaron dos modelos celulares: células HCT-8 (célula de adenocarcinoma ileocecal humano) y células Caco-2 (célula de adenocarcinoma colónico humano).

(ii) Compuestos ensayados: quitosano, NAG, paromomicina

- 30 El quitosano soluble es hidrocloreto de quitosano con un grado de desacetilación superior o igual a 90% y un grado de viscosidad de 5,5 mPas (viscosidad dinámica medida a 20°C en solución de agua destilada al 0,5%) (Kraeber & Co GMBH, Alemania).

La NAG (N-acetil-glucosamina) procede de la entidad Kraeber & Co GMBH, Alemania.

La paromomicina (sulfato de paromomicina 100%, Antibioticos SPA, Italia) es un medicamento antimicrobiano utilizado en el tratamiento de criptosporidiosis que permite la reducción de la excreción de ooquistes.

- 35 (iii) *C. parvum*

Se utiliza la cepa de *Cryptosporidium parvum* Iowa (Waterborne inc., New Orleans, LA, USA) para los ensayos.

(iv) Infección de las células

La infección se efectúa sobre células al 70%-80% de confluencia cultivadas en monocapa sobre laminillas revestidas con colágeno en placas de 24 pocillos.

- 40 La materia sobrenadante de las células en monocapa se sustituye con 3 ml de medio de cultivo a los que se añaden $1 \cdot 10^4$ ooquistes de *C. Parvum*. Después de 3 horas de incubación en un termostato húmedo a 37°C y 5% de CO₂, la materia sobrenadante se sustituye con 3 ml de medio de cultivo y se pone en incubación durante 48 h en un termostato húmedo a 37°C, 5% de CO₂ y 80% de humedad.

(iv) Ensayo de preincubación

45

ES 2 734 994 T3

En cada pocillo de una placa se ponen en contacto 1·10⁴ ooquistes con 500 µg/ml de paromomicina, quitosano o NAG.

Las placas se ponen en incubación durante 24 h en un termostato húmedo a 37°C y 5% de CO₂.

La infección de las células se realiza seguidamente como se indicó con anterioridad.

5 (v) Ensayo directo

El medio de cultivo de las células infectadas se sustituye con 1 ml de medio de cultivo al que se añade seguidamente el compuesto que va a ser ensayado, a una concentración final de 500 µg/ml. Las placas se ponen en incubación durante 48 h en un termostato húmedo a 37°C y 5% de CO₂.

(vi) Coloración y recuento de ooquistes intracelulares

- 10 Los ooquistes intracelulares están coloreados después de la fijación de las células en metano. El marcado se efectúa utilizando un anticuerpo policlonal conjugado específico (Sporo-Glo 20X Waterborne inc., New Orleans, LA, USA). Las laminillas se disponen seguidamente sobre hojas. El recuento de los ooquistes intracelulares se efectúa en microscopio de fluorescencia. Sobre cada hoja, se hace un recuento de 6 x 50 campos escogidos de forma aleatoria sobre toda la superficie de la hoja.

15 (vii) Análisis estadístico

Los resultados obtenidos son una media de un triplicado. Los datos se analizan mediante ANOVA. Un valor de p (p-value) inferior o igual a 0,05 se considera como significativo.

Resultados

(i) Citotoxicidad

- 20 Los ensayos preliminares permitieron determinar las dosis óptimas toleradas por las células HCT-8 y Caco-2 y condujeron a elegir la dosis de 500 µg/ml para el ensayo de cada uno de los compuestos.

(ii) Efecto de la preincubación de los compuestos ensayados con los ooquistes de *C. parvum* antes de la infección

Los compuestos ensayados se ponen en incubación durante 24 h con ooquistes de *C. Parvum* antes de la infección *in vitro* a una dosis de 500 µg/ml.

- 25 Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 1 para las células HCT-8 y en la tabla 2 para las células Caco-2.

La paromomicina es capaz de inhibir el desarrollo del parásito de manera significativa a la vez sobre las células HCT-8 y Caco-2 ($p < 0,001$): la paromomicina reduce un 99,5% el desarrollo del parásito en las células HCT-8 y 97,1% en las células Caco-2.

Son válidos tanto para quitosano como para NAG.

- 30 El quitosano soluble reduce, respectivamente, un 95,7% el desarrollo del parásito en células HCT-8 y un 97,6% en células caco-2 ($p < 0,001$).

La NAG reduce, respectivamente un 99,0% el desarrollo del parásito en células HCT-8 y un 97,4% en células Caco-2 ($p < 0,001$).

Tabla 1

Ensayo	Células HCT-8	Número de esporozoitos	Media	Disparidad-tipo	% de esporozoitos viables
1	T+	1040	1046	10,68	100
2	T+	1037			
3	T+	1061			
4	Paromomicina	3	6	2,49	0,53
5	Paromomicina	9			
6	Paromomicina	5			

ES 2 734 994 T3

Ensayo	Células HCT-8	Número de esporozoitos	Media	Disparidad-tipo	% de esporozoitos viables
7	NAG	12	11	2,49	0,99
8	NAG	14			
9	NAG	7			
10	quitosano	47	47	6,24	4,3
11	quitosano	52			
12	quitosano	37			
13	T-	0	0	0	0

T+: células infectadas/T-: células no infectadas

Tabla 2

Ensayo	Células HCT-8	Número de esporozoitos	Media	Disparidad-tipo	% de esporozoitos viables
1	T+	844	1146	298,7	100
2	T+	1553			
3	T+	1042			
4	Paromomicina	23	33	12,97	2,87
5	Paromomicina	51			
6	Paromomicina	24			
7	NAG	21	30	9,0	2,61
8	NAG	39			
9	NAG	31			
10	quitosano	19	28	10,8	2,44
11	quitosano	40			
12	quitosano	25			
13	T-	0	0	0	0

T+: células infectadas/T-: células no infectadas

- 5 (iii) Efecto de los compuestos ensayados sobre el desarrollo de *C. parvum* durante una adición directa sobre las células infectadas

Los diferentes compuestos se ensayaron a una dosis de 500 µg/ml.

Los resultados se exponen en las tablas 3 (células HCT-8) y 4 (células Caco-2).

Tabla 3

Ensayo	Células HCT-8	Número de esporozoitos	Media	Disparidad-tipo	% de esporozoitos viables
1	T+	393	345	37,6	100
2	T+	342			

ES 2 734 994 T3

Ensayo	Células HCT-8	Número de esporozoitos	Media	Disparidad-tipo	% de esporozoitos viables
3	T+	301			
4	Paromomicina	178	191	12,6	55,4
5	Paromomicina	187			
6	Paromomicina	208			
7	NAG	172	134	29,9	11,6
8	NAG	131			
9	NAG	99			
10	quitosano	90	73	11,8	6,4
11	quitosano	66			
12	quitosano	64			
13	T-	0	0	0	0

T+: células infectadas/T-: células no infectadas

La paromomicina, NAG y el quitosano inducen una reducción significativa del desarrollo del parásito en las ds líneas celulares ($p < 0,005$):

- respectivamente de 44,6% a 88,4% y 93,6% en células HCT-8, y

5 - respectivamente, 33,6%, 35,2% y 68% en células Caco-2.

Por tanto, la NAG y el quitosano son más eficaces que la paromomicina en células HCT-8 y el quitosano es el más eficaz en células Caco-2.

Tabla 4

Ensayo	Células HCT-8	Número de esporozoitos	Media	Disparidad-tipo	% de esporozoitos viables
1	T+	774	881	79,0	100
2	T+	908			
3	T+	962			
4	Paromomicina	318	592	193,4	66,4
5	Paromomicina	782			
6	Paromomicina	675			
7	NAG	656	571	85,5	64,8
8	NAG	485			
9	NAG	337			
10	quitosano	372	282	70,8	32,0
11	quitosano	199			
12	quitosano	276			

Ensayo	Células HCT-8	Número de esporozoitos	Media	Disparidad-tipo	% de esporozoitos viables
13	T-	0	0	0	0

T+: células infectadas/T-: células no infectadas

Ejemplo 2: Adhesión o replicación de *C. parvum* en enterocitos *in vitro*

Material y métodos

(i) Líneas celulares ensayadas y ooquistes

- 5 Los ooquistes de *C. parvum* utilizados fueron aislados de heces (defecaciones) de terneros infectados experimentalmente (por la entidad INRA de Tours).

Los ensayos se realizaron en células de la línea de múridos CMT-93 (sin micoplasma) cultivadas en medio completo que comprendía 10% de SVF (suero de ternera fetal).

(ii) Compuestos ensayados

- 10 El quitosano insoluble es poli(N-desacetil-D-glucosamina) con una materia seca de 6,43% y un grado de desacetilación de 95,5% (Fédéral Laboratories Chemical Corp, NY, USA).

El quitosano soluble es hidrocloreto de quitosano con un grado de desacetilación superior o igual a 90% y un grado de viscosidad de 5,5 mPas (viscosidad dinámica media a 20°C en una solución de agua destilada al 0,5%) (Kraeber & Co GMBH, Alemania).

- 15 La NAG (N-acetil-glucosamina) procede de la entidad Kraeber & Co GMBH, Alemania.

Se ensayaron también:

- paredes de levadura (Safmannan, Lesaffre),
- una levadura enriquecida en selenio (Selsaf, Lessaffre),
- carbón activado,

- 20 - aceite esencial de ajo,

- una mezcla de aceites esenciales (que comprende 6% de aceite esencial de ajo, 10 a 13% de aceite esencial de limoncillo, 59 a 72% de aceite esencial de canela y 23 a 32% de aceite esencial de tomillo),

- una levadura de *Saccharomyces cerevisiae* viva (Actisaf, Lesaffe).

- 25 El interferón γ 10 ng/ml se utiliza como testigo positivo. En efecto, se ha descrito una inhibición parcial de la multiplicación de *C. parvum* en enterocitos bajo la acción de esta citoquina.

(iii) Ensayo del efecto de los compuestos sobre el desarrollo de *C. parvum*

Se siembran células de la línea CMT-93 a razón de $3,6 \cdot 10^5$ células por pocillo.

- 30 Los compuestos que van a ser ensayados se añaden al cabo de 8 h. Después de 16 h de incubación, se realiza seguidamente una infección con ooquistes de *C. parvum* (relación de 5 ooquistes/célula) en presencia de los compuestos ensayados, a las dosis seleccionadas, que no afectan a la viabilidad celular en más de un 15%.

Después de 24 h, las células son lisadas con tripsina y marcadas con una lectina fluorescente (VVL-FITC) con el fin de poder recuperar las células infectadas con microscopio de fluorescencia. El número de células infectadas se determina manualmente. Esta técnica es más laboriosa, pero ha mostrado ser más precisa que un recuento de las células parasitadas por citometría.

- 35 Resultados

El quitosano soluble y la NAG ensayados a 18 $\mu\text{g/ml}$ reducen en 31% y 43%, respectivamente, la multiplicación parasitaria en las células de la línea CMT-93 con respecto al testigo no tratado. Estas reducciones son similares a la observada para el testigo positivo, interferón γ .

- 40 El quitosano insoluble ensayado a 18 $\mu\text{g/ml}$ permite una reducción menos considerable de la multiplicación parasitaria, con aproximadamente un 40% de células infectadas frente a un 50% de células infectadas para el testigo

no tratado.

El carbón activado a una dosis de 18 µg/ml reduce en 36% la multiplicación parasitaria con respecto al testigo no tratado. A esta dosis, el efecto del carbón sigue siendo similar al del interferón γ.

- 5 La mezcla de aceites esenciales (que comprende 6% de aceite esencial de ajo, 10 a 13% de aceite esencial de limoncillo, 59 a 72% de aceite esencial de canela y 23 a 32% de aceite esencial de tiempo) a la dosis de 3,3 µg/ml o 30 µg/ml permite también una reducción en 30% de la multiplicación parasitaria con respecto al testigo no tratado y similar a la observada para el interferón γ.

No se observa efecto alguno con los otros compuestos a las dosis ensayadas en la multiplicación parasitaria.

Ejemplo 3: Respuesta inmune de las células epiteliales y de las células dendríticas

- 10 (i) Líneas celulares ensayadas y ooquistes

Los ooquistes de *C. parvum* utilizados fueron aislados de heces (defecaciones) de terneras infectadas experimentalmente (por la entidad INRA de Tours).

- 15 Los ensayos se realizan en células de la línea de múridos CMT-93 (sin micoplasma) cultivadas en medio completo que comprende 10% de SVF (suero de ternera fetal) o células dendríticas derivadas de médula ósea (inmadura) en presencia de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) añadido regularmente al cultivo durante 9 días.

(ii) Compuestos ensayados

Los productos ensayados en las células epiteliales son:

- 20 - NAG (N-acetil-glucosamina) (Kraeber & Co GMBH, Alemania).
- paredes de levadura (Safmannan, Lesaffre),
- una levadura de *Saccharomyces cerevisiae* viva (Actisaf, Lesaffre),
- una cepa de *Lactobacillus johnsonii* inactivada.

Los productos ensayados en las células dendríticas son:

- 25 - paredes de levadura (Safmannan, Lesaffre),
- una levadura de *Saccharomyces cerevisiae* viva (Actisaf, Lesaffre),
- una cepa de *Bacillus subtilis*,
una cepa de *Lactobacillus johnsonii* viva,
- una cepa de *Lactobacillus johnsonii* inactivada,
- una cepa de *E. coli*.

- 30 (iii) Ensayo de la respuesta inmune de las células epiteliales y dendríticas

- Células epiteliales

- 35 La producción de quimiocinas por el epitelio de otras células intestinales es importante para la capacidad de las células inflamatorias necesarias para la protección contra la criptosporidiosis en recién nacidos. La producción de quimiocina por células epiteliales se mide mediante RT-PCR cuantitativa (cuantificación mediante incorporación de Sybr green) después de una incubación de las células CMT-93 con los diferentes compuestos durante 24 h.

- Células dendríticas

Los ensayos se realizaron en células dendríticas derivadas de médula ósea (Inmadura) en presencia de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) añadido regularmente al cultivo durante 9 días.

- 40 Se mide la producción de la citoquina IL-12p40 mediante ELISA 24 h después de la adición de los productos a diferentes diluciones. Se añade un antibiótico 4 h después de la inoculación de los productos vivos.

Resultados

Para las células epiteliales, las quimiocinas (CXCL2, CCL3, CCL20, CXCL10, CCL2) capaces de atraer los fagocitos mononucleares son producidas por las células epiteliales in vitro en respuesta a los compuestos ensayados, no

obstante, en una cantidad menor que mediante la infección parasitaria. El producto NAG muestra a menudo ser el más eficaz para CXCL10 y CCL20, seguidamente las paredes de levadura y la levadura viva (Actisaf) para CCL3.

- 5 Para células dendríticas, paredes de levadura, cepa de *Bacillus subtilis*, lactobacilos, *E. coli* y levadura viva inducen todas ellas producciones muy considerables de IL-12p40. Este experimento se reanuda en macrófagos diferenciados in vitro (en presencia de M-CSF durante 6 días) y se obtiene una respuesta muy considerable para lactobacilos, así como para levadura viva.

Ejemplo 4: Tratamiento de criptosporidiosis inducida en cabritos

Material y métodos

Modelo de cabrito

- 10 (i) Composiciones ensayadas

Compuestos	1º ensayo	2º ensayo		
	Composición A 2,5 g, 5 g o 10 g/cabrito/comida*	Composición B 5 g/cabrito/comida*	Composición C 7,5 g/cabrito/comida*	Composición D 5 g/cabrito/comida*
Paredes de levadura	70%	76%	51%	38%
Extracto de levadura	3%	3%	2%	2%
Levadura enriquecida en selenio	3%	3%	2%	2%
Levadura viva	0%	0%	33%	50%
NAG	6%	0%	0%	0%
Quitosano	6% (soluble)	8% (insoluble)	5% (insoluble)	4% (insoluble)
Carbón activado	6%	0%	0%	0%
Mezcla de aceites esenciales	6%	10%	7%	5%

* Los cabritos son alimentados dos veces al día.

Las paredes de levaduras son un producto de la entidad Safmannan (Lesaffre).

El extracto de levadura es el producto EXL2020 (Biospringer).

- 15 La levadura enriquecida en selenio es un producto de Selsaf® (Lesaffre).

La levadura viva corresponde a la cepa depositada el 2 de diciembre de 2010 en la entidad Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS Cedex 15) con el número I-4407 (Actisaf, Lesaffre, à 9·10⁹ UFC/g).

- 20 La mezcla de aceites esenciales comprende 6% de aceite esencial de ajo, 10 a 13% de aceite esencial de limoncillo, 59 a 72% de aceite esencial de canela y 23 a 32% de aceite esencial de tomillo.

La NAG procede de la entidad Kraeber & Co GMBH, Alemania.

El quitosano soluble es hidrocloreto de quitosano con un grado de desacetilación superior o igual a 90% y un grado de viscosidad de 5,5 mPas (viscosidad dinámica medida a 20°C en una solución de agua destilada al 0,5%) (Kraeber & Co GMBH, Alemania).

- 25 El quitosano insoluble es un quitosano con un grado de desacetilación superior a 90% (Federalabs, Estados Unidos).

Las composiciones A, G, C y D están en forma de polvo.

(ii) 1º ensayo

Los cabritos se reparten en 4 grupos de 11 cabritos con edades de 2 a 4 días:

Grupo 1: testigo infectado que no recibe tratamiento

Grupo 2: 2,5 g de la composición A por cabrito, 2 veces al día

Grupo 3: 5 g de la composición A por cabrito, 2 veces al día

5 Grupo 4: 10 g de la composición A por cabrito, 2 veces al día

Debe apreciarse que los cabritos son tratados todos por medio de metafilaria con marbofloxacina en inyección subcutánea a una dosis de 0,1 ml/kg una vez al día, para atender lesiones de neumonía detectadas en cabritos muertos antes del reparto en los 4 grupos. Este tratamiento no interfiere con el ensayo clínico ya que la marbofloxacina no es eficaz contra la criptosporidiosis.

10 Los cabritos son infestados experimentalmente por vía oral por medio de una jeringuilla a una dosis de 10^6 ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Waterborne Inc, New Orleans, USA) puesto en suspensión en agua.

La distribución de la composición A se hace después de ponerla en suspensión en 100 ml de leche (alimento completo de lactancia Optiprim del grupo Sofivo). La puesta en solución de la composición se hace de forma extemporánea, justo antes de la distribución.

15 La distribución de la mezcla se hace de forma individual, en biberón por motivos de comodidad, recibiendo cada cabrito 100 ml de mezcla.

La distribución del tratamiento tiene lugar por la mañana y por la tarde durante 14 días y la administración comienza media jornada antes de la infestación experimental. La distribución del tratamiento tiene lugar antes de la comida para garantizar una mejor recepción del tratamiento.

20 (iii) 2º ensayo

Los cabritos se reparten en 4 grupos de 11 carritos con edades de 2 a 4 días:

- Grupo 1: testigo infectado que no recibe tratamiento

- Grupo 2: 5 g de composición B por cabrito, 2 veces al día

- Grupo 3: 7,5 g de composición C por cabrito, 2 veces al día

25 - Grupo 4: 5 g de composición D por cabrito, 2 veces al día.

Los cabritos son infestados experimentalmente por vía oral por medio de una jeringuilla a una dosis de 10^6 ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Waterborne Inc, New Orleans, USA) puesta en suspensión en agua.

30 La distribución de las composiciones B, C y D se hace después de ponerlas en suspensión en 100 ml de leche (alimento completo de lactancia Optiprim del grupo Sofivo). La puesta en solución de la composición se hace de forma extemporánea, justo antes de la distribución.

La distribución de la mezcla se hace de forma individual, al biberón por motivos de comodidad, recibiendo cada cabrito 100 ml de mezcla.

35 La distribución del tratamiento tiene lugar por la mañana y por la tarde durante 14 días y la administración comenzó media jornada antes de la infestación experimental. La distribución del tratamiento tiene lugar antes de la comida para garantizar una mejor recepción del tratamiento.

(iii) Medidas y recogida de datos

Se toman muestras de materias fecales de forma cotidiana en cada cabrito con el fin de medir la excreción individual mediante el método semicuantitativo de Heine. Las tomas de muestras se efectúan en el recto.

Se atribuye una valoración de la excreción para cada cabrito:

40 - 0 = ausencia de ooquiste

- 1 = menos de 1 ooquiste

- 2 = 1 a 10 ooquistes

- 3 = 11 a 20 ooquistes

- 4 = 21 a 30 ooquistes

- 5 = 31 a 40 ooquistes.

Se atribuye una valoración de diarrea que varía de 0 a 2 a cada cabrito:

- 0 = ausencia de diarrea,

- 1 = diarrea pastosa, y

5 - 2 = diarrea líquida.

La excreción de los ooquistes, así como la apreciación de la diarrea, reflejan la eficacia de la composición ensayada en el parásito. Una bajada de la excreción permite disminuir la presión de infestación que generalmente va acompañada de una puntuación que se aproxima a cero. Por tanto, son interesantes desde un punto de vista epidemiológico.

10 (iv) Análisis estadísticos

Los resultados se analizan a través del programa de ordenador Statistica. Se utilizaron ensayos de Chi 2, ANOVA, ANOVA de datos repetidos, coeficiente gamma de Goodman y ensayo de Kruskal-Wallis.

Resultados

(i) Primer ensayo

15 Reparto de los grupos

Este ensayo se realizó con cabritos de orígenes múltiples, lo que presenta diferentes inconvenientes: microbismo variable en función del origen (pasteurelosis, colibacilosis), cabritos de raza (sin efecto sobre la criptosporidiosis) y plantillas diferentes (efecto potencial sobre la capacidad de supervivencia al episodio clínico).

Cada grupo comprendía 11 cabritos al comienzo del experimento.

20 Validación de la infección experimental

La infección fue concluyente ya que casi un 100% de los cabritos excretaron ooquistes 4 días después de la infección. Los cabritos de crianza 1 comenzaron a excretar ooquistes desde la mañana siguiente a la infección, lo que pone de manifiesto una infección en la crianza anterior a su llegada a tienda de animales. Los cabritos del grupo testigo procedentes de las crianzas 2 y 3 comenzaron a excretar ooquistes 3 días después de la infección experimental. Un 100% de los cabritos testigos excretaron ooquistes 4 días después de la infección (edad media de los cabritos: 8 días) y esto durante 4 días.

25

Evolución de la excreción

La evolución de la excreción es similar entre el grupo testigo y los grupos tratados 2, 3 y 4.

Valoración media de la diarrea

30 En el grupo testigo 1, la puntuación media de la diarrea aumentó a partir de la edad de 7 días y comenzó a decrecer después de 15 días, paralelamente a la excreción.

En los grupos 3 y 4, se observó una disminución de la puntuación media de la diarrea en el período máximo de diarrea.

La duración media de la diarrea en los animales vivos es más baja en los grupos 3 y 4 que en el grupo 1 testigo.

35 Los cabritos del grupo 3 presentaban indicios de diarrea de forma más tardía que los otros grupos y a un nivel menor.

Morbilidad

La morbilidad se calculó como el porcentaje de cabritos que presentan diarrea (puntuaciones de diarrea 1 o 2) con respecto al número total de cabritos presentes.

40 En el grupo 1 testigo, más de un 60% de los cabritos presentaban diarrea entre 8 y 15 días de forma concomitante a un aumento de la excreción de ooquistes.

El grado de morbilidad del grupo 4 es menos elevado que en los otros grupos.

45 Además, el retraso en la aparición de diarrea en el grupo 3 es más tardío: mientras que más de un 60% de los cabritos de los grupos 2 y 4 presentan diarrea desde la edad de 8 días, este porcentaje solo se alcanza a la edad de 11 días en el grupo 3.

Mortalidad

5 Murieron 21 cabritos de forma "natural" y se efectuaron 3 sacrificios por compasión. Los cabritos muertos tenían edades de 5 a 17 días en el momento de la muerte. La mayoría entre ellos presentaba una excreción de ooquistes, diarrea e indicios macroscópicos en el momento de la autopsia compatibles con la criptosporidiosis. Algunos de los cabritos no murieron de criptosporidiosis en este ensayo.

No se pudo comprobar efecto importante alguno por la administración de las composiciones.

Conclusión

10 En este ensayo, el transporte y la llegada a la tienda de animales han sido soportados de ciertamente mal por los cabritos ya debilitados por la circulación en las cranzas de agentes patógenos responsables de enfermedades pulmonares y 5 cabritos murieron antes de ser incluidos en el lote. Esto puede explicar que los resultados de las composiciones según la invención son menos espectaculares que los esperados.

No obstante, la composición A tuvo un efecto beneficioso sobre la diarrea y la morbilidad de los cabritos con respecto al grupo no tratado.

La dosis de 5 g para cabrito administrada dos veces al día proporcionó los mejores resultados.

15 (ii) Segundo ensayo

Reparto de los grupos

20 Este 2º ensayo se realizó con cabritos de uno solo y mismo origen, por lo cual era muy homogéneo en cuanto a la edad y peso y sin patologías coincidentes. La sensibilidad extrema de los cabritos a la infección experimental confirma la ausencia de infección previa por criptosporidiosis. Cada grupo comprendía 11 cabritos al comienzo del ensayo.

Validez de la infección experimental

La totalidad de los cabritos del grupo testigo 1 excretó ooquistes de *C. parvum* de forma masiva a partir de la edad de 8 días (valoración media de excreción; 4,5 sobre una escala de 0 a 5), es decir, 4 días después de la infección experimental. Un único cabrito superviviente del grupo testigo 1 excretó ooquistes continuamente durante 8 días

25 Evolución de la excreción

La evolución de la excreción de ooquistes fue comparable en los grupos 2, 3 y 4 que recibieron, respectivamente, las composiciones B, C y D.

La media de las valoraciones de excreción más elevada en los grupos 2, 3 y 4 fue inferior a la del grupo testigo.

30 La excreción media fue más baja en el grupo 3 entre los 8 y 15 días con respecto al grupo testigo 1 y los grupos 2 y 4.

Valoración media de diarrea

La diarrea apareció más temprano en los grupos 2, 3 y 4 que en el grupo 1 testigo, en particular en el grupo 3 en el que más de un 35% de los cabritos estaban diarreicos antes de 6 días.

35 El episodio de diarrea debido a criptosporidiosis fue seguidamente similar entre los grupos 2, 3 y 4 y el grupo 1 testigo.

Debe apreciarse que la interpretación de la comparación con el grupo testigo más allá de 13 días resultó imposible por la presencia de un solo cabrito superviviente en el grupo testigo.

El porcentaje de cabritos diarreicos fue ligeramente inferior en los grupos 2, 3 y 4 con respecto al grupo testigo 1.

40 La media de puntuaciones de diarrea más elevada fue netamente inferior en los grupos 2, 3 y 4 (respectivamente 1,7, 1,7 y 3,7) con respecto al grupo testigo (4,5).

La duración de la diarrea en los cabritos vivos fue reducida en los grupos 2, 3 y 4 con respecto al grupo testigo.

Entre los 12 y los 18 días de edad, las puntuaciones de diarrea son significativamente ($p < 0,005$) más elevadas en el grupo 1 que en el grupo 2; entre los 16 y 17 días, son más elevadas en el grupo 1 que en el grupo 3; y entre los 17 y 18 días, son más elevadas en el grupo 1 que en el grupo 4.

45 Morbilidad

La morbilidad se calculó como el porcentaje de cabritos que presentan diarrea (puntuaciones de diarrea 1 o 2) con respecto al número total de cabritos presentes. En el grupo testigo, más de un 80% de los cabritos presentaban diarrea entre los 7 y 12 días de edad, de forma concomitante a un aumento de la excreción de ooquistes.

Mortalidad

- 5 Murieron 14 cabritos de forma "natural" y se efectuaron 13 sacrificios por compasión. El pico de mortalidad, incluidos todos los grupos, se observó a la edad de 10-11 días, a continuación del episodio de diarrea.

La mortalidad acumulada en el grupo 1 fue de 91%, en el grupo 2 de 36%, en el grupo 3 de 64% y en el grupo 4 de 55%.

La mortalidad en el grupo 1 es significativamente más elevada que en el grupo 2.

- 10 Si se excluye el cabrito del grupo 4 que no murió de criptosporidiosis, la mortalidad es significativamente más considerable en el grupo testigo 1 que en el grupo 4.

La mortalidad en el grupo 3 es reducida.

Debe apreciarse que la edad media en el momento de la muerte es más elevada en los grupos tratados (13,5 para el grupo 2; 11,7 para el grupo 3; 16,4 para el grupo 4) que en el grupo testigo (10,7).

- 15 Conclusión

Las composiciones B, C y D según la invención permitieron mejorar los rendimientos zootécnicos, reducir la diarrea y disminuir la mortalidad.

La composición C permitió también disminuir la excreción de ooquistes.

Ejemplo 5: Tratamiento de criptosporidiosis inducida en ratones jóvenes

- 20 (i) Composiciones ensayadas

Paredes de levadura (Safmannan, Francia)

(ii) Ensayo del efecto de los compuestos sobre el desarrollo de *C. parvum*

Los ratones jóvenes son inoculados con 5×10^5 ooquistes de *C. parvum*.

- 25 La administración por vía oral de 500 µg de paredes de levadura, en lo que sigue denominadas "paredes", se realiza la víspera de la infección mediante *C. parvum*, así como al día siguientes y 4 días después de la invención, mediante sondado de ratones jóvenes C57BL/6 con edades de 2 a 3 días.

Los ooquistes presentes en el contenido intestinal, excretados por vía oral, se cuentan 6 días después de la inoculación.

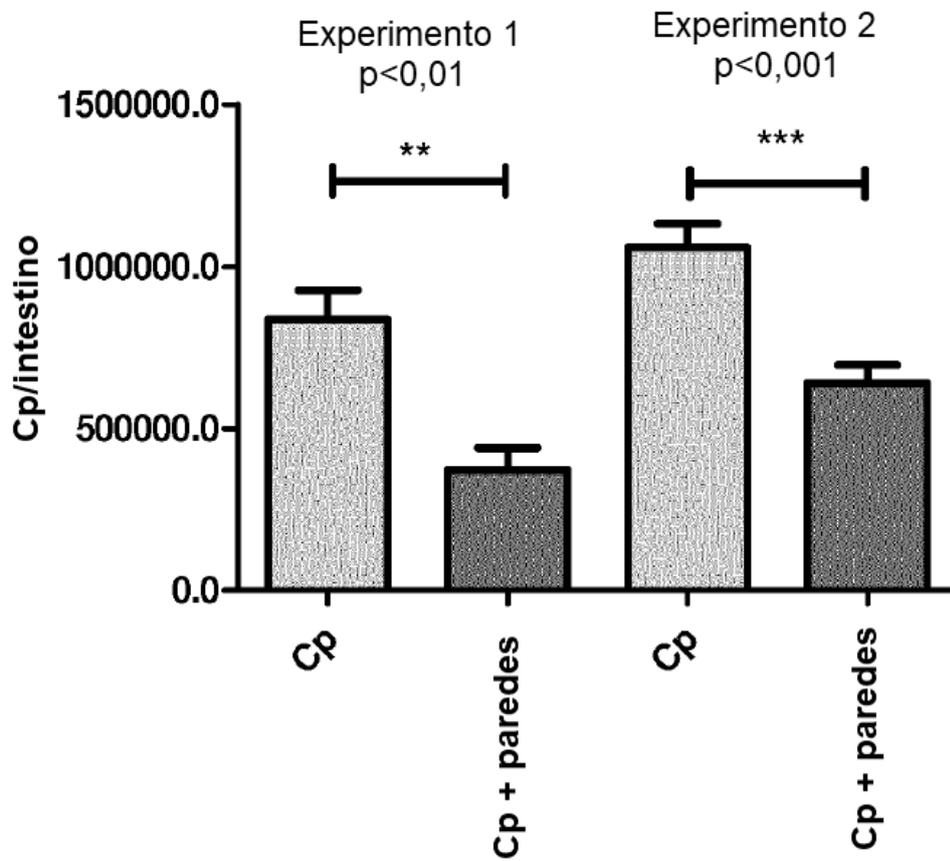
Número de ratones jóvenes:

- 30
- Experimento 1: n = 7-15 ratones jóvenes
 - Experimento 2 (n = 13 por cada lote).

El análisis estadístico se efectuó comparando el lote no tratado con cada uno de los lotes (ensayo no paramétrico Mann Whitney: **p<0,01).

Resultados

- 35 En el D6 después de la infección, el contenido parasitario intestinal permite evaluar el nivel de protección obtenido con respecto a los animales infectados y no tratados.



El gráfico representa los resultados de 2 experimentos independientes. La administración de paredes induce una disminución significativa ($p < 0,01$) de los ooquistes en los dos experimentos.

Interpretación:

- 5 La administración de paredes de levaduras permite una disminución significativa de la excreción de ooquistes.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:
 - al menos un agente de base escogido entre quitina, quitosano, N-acetil-glucosamina o glucosamina, y
 - un agente para estimular la inmunidad que es una mezcla de paredes de levadura, un extracto de levadura, selenio o una bacteria del género *Bacillus*.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además un agente antiparasitario escogido entre un aceite esencial, carbón activado, ácido láurico o sus combinaciones.
3. Composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque comprende además un agente para estimular la inmunidad que es un microorganismo escogido entre una bacteria del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Pediococcus* o *Lactococcus* o una levadura del género *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*, o sus combinaciones.
4. Composición según la reivindicación 3, caracterizada porque el selenio está en forma de una levadura enriquecida en selenio, selenio extraído total o parcialmente de levadura o sus combinaciones.
5. Composición según la reivindicación 2, caracterizada porque el aceite esencial se escoge entre aceite esencial de ajo, aceite esencial de limoncillo, aceite esencial de canela, aceite esencial de tomillo, aceite esencial de orégano, aceite esencial de árbol de té, aceite esencial de limón, aceite esencial de eucaliptus o sus combinaciones.
6. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque dicha composición es una composición alimenticia, un complemento alimenticio o una composición farmacéutica.
7. Quitina, quitosano, N-acetil-glucosamina, glucosamina o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para una utilización en la prevención y/o el tratamiento de una parasitosis.
8. Quitina, quitosano, N-acetil-glucosamina, glucosamina o composición para una utilización según la reivindicación 7, caracterizados porque la parasitosis es criptosporidiosis.