PROCESO PARA LA EXTRACCIÓN, DESLIPIDIZACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS A PARTIR DE YEMA DE HUEVO PROVENIENTE DE GALLINAS HIPERINMUNIZADAS, Y FORMULACIÓN CONCENTRADA DE INMUNOGLOBULINAS IGY DE ORIGEN AVIAR

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina veterinaria, en particular con el tratamiento de enfermedades en animales, y más específicamente con la prevención o tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo o PRRS (por las siglas del Inglés, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) en los porcinos, la Diarrea Epidémica Porcina (DEP), el síndrome de la mancha blanca en camarón, mastitis bovina, las infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos, las coccidiosis en aves y las intoxicaciones producidas por toxinas de los hongos, mediante la administración de una formulación de inmunoglobulinas concentrada de origen aviar, obtenida de yema de huevo proveniente de gallinas previamente hiperinmunizadas con una formulación de vacuna emulsionada que comprende antígenos, un aceite mineral ligero y un adyuvante particulado que consiste en partículas de un polímero biodegradable.

ANTECEDENTES

La sanidad de los animales es la clave principal para obtener alimentos sanos y de calidad. Es por ello que el control de las enfermedades y el empleo de todas las herramientas disponibles para ello resulta ser de

suma importancia. La vacunación es una herramienta más de las muchas que se emplean diariamente en las granjas, existiendo otras como medidas de bioseguridad para evitar la entrada de patógenos provenientes de otras explotaciones, la aplicación de pautas de higiene y el manejo de los animales para reducir la diseminación de enfermedades entre los animales de la misma explotación, control estricto de la alimentación, o la creación de un ambiente confortable para los animales de la granja.

No obstante a la fecha existen enfermedades que no ha sido posible controlar de manera adecuada. Dentro de estas enfermedades se encuentran las producidas por los virus, tal como la ocasionada por el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo, que es una enfermedad severa en los porcinos, la cual fue reportada en los Estados Unidos en 1987 y posteriormente se identificó en muchos otros países europeos. En 1991, en Holanda se reportó el aislamiento del agente etiológico llamándole virus Lelystad y debido a la sintomatología que presentaban los cerdos se le conocía como Síndrome Respiratorio y/o Aborto Epidémico del Cerdo.

Otra enfermedad viral que no ha sido posible controlar es la Diarrea Epidémica Porcina (PED), la cual es una enfermedad viral exclusiva de los porcinos, muy contagiosa y en la mayoría de las veces ocasiona la muerte. Esta enfermedad afecta el sistema digestivo y los lechones mueren en un periodo de 3-5 días a causa de la diarrea y deshidratación.

Otra enfermedad más es la ocasionada por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), principal patógeno del camarón y responsable de grandes pérdidas de producción y ganancias en esta industria a nivel mundial.

Hasta ahora no existe ningún tratamiento efectivo para controlar la infección.

El tratamiento de las enfermedades causadas por *coronavirus y rotavirus bovino* también resulta de interés.

Por otra parte encontramos las enfermedades ocasionadas por bacterias, tal como la mastitis bovina que produce una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos secretores, reduciendo la producción del volumen de leche y alterando su composición, e incluso su sabor, además de elevar su carga bacteriana normal. De acuerdo con su duración, se puede clasificar en aguda o crónica. En relación a sus manifestaciones clínicas, puede ser clínica o subclínica. Esta enfermedad provoca graves pérdidas económicas a la industria lechera.

También encontramos las enfermedades provocadas por el *Actinobacillus pleuropneumoniae*, bacteria responsable de problemas respiratorios en porcinos con distribución mundial, conociéndose desde hace 50 años, y teniendo una elevada incidencia desde los años 80, siendo frecuente en unidades de engorde. Responsable primario de la Pleuroneumonía porcina, así como agente involucrado directamente dentro del Complejo Respiratorio Porcino. Es una enfermedad de elevada diseminación, altamente contagiosa y en muchas ocasiones letal en porcinos desde el destete al sacrificio. Provoca en el 30-50% de los porcinos una pleuritis fibrinosa con adherencias costales bastante características y elevada mortalidad en cuadros agudos, con elevado retraso del crecimiento en las formas crónicas. Además se ha encontrado que el *Actinobacillus pleuropneumoniae* está involucrado en cuadros de otitis media, artritis y osteomielitis.

El tratamiento de las enfermedades causadas por *E. coli*, *Salmonella spp. y Clostridium perfringens* también es de interés para la salud de los animales.

Por otra parte, tenemos la coccidiosis que es una enfermedad infecciosa producida por parásitos de vida intracelular estricta de los géneros *Eimeria spp*. e *Isospora spp*. Las coccidias son omnipresentes pues existen en la mayoría de las instalaciones pecuarias alrededor del mundo. Estos parásitos pueden infectar a una gran variedad de animales incluyendo humanos, aves, rumiantes, cerdos, perros, gatos y otros animales domésticos, sin embargo, en la mayoría de los casos las coccidias son especies específicas.

Adicionalmente otro problema de salud que enfrenta la industria pecuaria son las ocasionadas por tricotecenos, toxinas producidas por varios hongos Fusarium, particularmente *Fusarium graminearum* y *Fusarium sporotrichioides*. Se producen en cosechas y entran al alimento a través de ingredientes contaminados. Los Tricotecenos son irritantes tisulares comprobados y su ingesta se asocia principalmente con lesiones orales, dermatitis e irritación intestinal. La principal respuesta fisiológica a estas micotoxinas es la pérdida del apetito. Los tricotecenos son micotoxinas supresoras fuertes que afectan la respuesta celular inmune con un impacto directo sobre la médula, el bazo, los tejidos linfoides, el timo y la mucosa intestinal, en donde se lesionan las células que se dividen activamente.

Para el control preventivo de todas estas enfermedades, existen básicamente dos formas de protección. Se les puede exponer a antígenos derivados de un agente infeccioso para estimular una reacción inmunitaria protectora o bien se les puede administrar un

anticuerpo preformado que se haya obtenido de algún sujeto inmune.

La primera forma de protección se logra por medio de vacunas que pueden ser de diferentes clases: microorganismos vivos, liofilizados, o muertos en emulsiones oleosas, y recientemente la creación de vacunas clonadas y recombinantes. Cada una de ellas presenta ventajas y desventajas en cuanto a protección, respuesta inmune y duración de la protección. Sin embargo, se ha encontrado que en algunos casos se presentan lesiones indeseadas en el huésped a causa del virus vacunal (*Tizard, I.R. 1998. Vacunación y vacunas In: Inmunología Veterinaria. 5ª Ed. Mc. Graw-Hill. Pp.285-305*).

La segunda forma de protección también llamada inmunidad pasiva involucra la transmisión de anticuerpos específicos contra agentes infecciosos a un huésped.

Tradicionalmente, a nivel de investigación, los anticuerpos son elaborados principalmente en mamíferos y en menor frecuencia en aves. Los tipos de anticuerpos que regularmente se elaboran en mamíferos son monoclonales y policlonales, y policlonales en aves (*Larsson, et al 1993. Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.72: 1807-1812*).

En el caso de las aves, la especie *Gallus gallus domesticus* (gallos y gallinas) es la única especie de la cual se obtienen anticuerpos en forma más accesible y de manera altamente definida. El principal anticuerpo sérico presente en dicha especie es la lgG aunque la lgG es transportada al huevo de una manera similar a la transferencia de la lgG de mamíferos a través de la placenta.

En el huevo, la inmunoglobulina Y (IgY) se encuentra en mayor concentración en la yema, no obstante también se encuentran pequeñas cantidades de IgY en la clara. Incluso se ha encontrado que las cantidades de IgY son mayores en la yema que en el suero de la gallina (*Larsson, et al 1993. Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.72: 1807-1812*).

Para tener una noción de la cantidad de anticuerpos que elaboran las gallinas, basta señalar que una ponedora produce aproximadamente de 5 a 6 huevos por semana con un volumen de yema de aproximadamente de 15 ml, por lo tanto, en una semana una gallina puede llegar a producir anticuerpos en yema equivalente a 90 a 100 ml de suero o 180 a 200 ml de sangre completa. Esto al compararse contra los 20 ml de sangre completa que otorga un conejo inmunizado por semana permite apreciar claramente la eficiente productividad de los anticuerpos en yema de huevo. Obviamente si se utilizan animales más grandes como caballos o vacas, la cantidad de suero y de anticuerpos sería mayor que en el huevo, pero además de que el procedimiento es costoso también es más doloroso para los animales.

Entre las ventajas de los anticuerpos de yema de huevo de gallina se encuentran:

1. No fijan el complemento.

2. No se unen a la Proteína A de *Staphilococcus aureus.*

3. No reacciona con el Factor Reumatoide.

4. Debido a su diferencia filogenética con los anticuerpos de mamíferos, la IgY no muestra reacción cruzada con los anticuerpos de mamíferos.

5. Bajo costo de obtención.

En años recientes se han empleado los anticuerpos de yema de huevo (inmunoglobulinas) como herramientas de diagnóstico y terapia (Schmidt, et al. 1989). Es así que aprovechando su diferencia filogenética con las inmunoglobulinas de mamíferos, las Ig's han presentado varias ventajas cuando se han usado en inmunodiagnóstico. Por ejemplo, las Ig's de yema se han empleado para detectar varios virus mediante las técnicas de ELISA, inmunodifusión, inmunofluorescencia y fijación de complemento. Dado su bajo punto isoeléctrico comparado con la Ig de humanos, se ha empleado en ensayos de electroforesis para la cuantificación de inmunoglobulinas en suero de varios animales (*Altschuh, D. et al. 1984. Determination of IgG and IgM levels in serum by Rocket Immunoelectrophoresis using yolk antibodies from immunized chickens. J. Immunolog. Methods. 69:1-7; Larsson, A. et al. 1988. Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests. J. Immunol. Methods. 108:205-208; Larsson, A. et al. 1992. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. J. Immunol. Methods. 156: 79-83.; Larsson, et al 1993. Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.72: 1807-1812; Schade, R. et al 1996. The production of avian (Egg yolk) antibodies: IgY. Atla.24:925-934*).

En cuanto a su aplicación terapéutica, las IgY se han empleado como inmunoterapia en diferentes campos de la ciencia como por ejemplo la administración de inmunoglobulinas de yema de huevo por vía oral ha prevenido infecciones por rotavirus en ratones, bovinos, y porcinos entre otros (*Ikemori, Y. et al. 1992. Protection of neonatal calves against fatal enteric*

colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with 1<99-pillated enterotoxigenic Escherichia coli. Am.J.Vet.Res.53:2005-2008; Kuroki, M. et al 1994. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. Arch. Virol. 138: 143-148; Marquart, R. 1998. Antibody-loaded eggs for piglets: prevention of baby pigs from diarrhea. Proc. 2nd international Symposium on Egg Nutrition and Newly Emerging Ovo-Technologies. Alberta, Canada).

Incluso las inmunoglobulinas IgY de yema de huevo se han empleado como antivenenos contra víboras y escorpiones los cuales se pueden inyectar para neutralizar las toxinas sin riesgo de las reacciones anafilácticas comunes encontradas con los antivenenos elaborados en caballo (*Larsson, et al 1993. Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.72: 1807-1812*). Una aplicación más ha sido para prevenir la caries en humanos provocada por *Streptococcus mutans* (*Hatta, H. et al. 1997. Passive immunization Against Dental Plaque Formation in Humans: Effect of a Mouth Rinse containing Egg Yolk Antibodies (IgY) Specific to Streptococcus mutans. Caries.Res.31:268-274*).

En el caso de las enfermedades en animales antes mencionadas, a lo largo del tiempo se han desarrollado numerosas medidas de control y prevención debido a la extensión y repercusión económica de dichas enfermedades. Entre las estrategias para combatirlas se encuentran las vacunas inactivadas y las vacunas a virus vivo. Sin embargo, ninguna de estas estrategias ha sido 100% eficaz.

En el caso específico de los virus de RNA como el virus del PRRS o el virus de PED la falta de control se debe en gran parte a su alto índice de mutación. Esta es una característica en común entre los virus de RNA a consecuencia de la falta de actividad de *proofreading* de la RNA polimerasa. Entonces, esta falla junto con la rápida cinética de replicación del virus incrementan el riego de mutación y surgimiento de cuasiespecies (Manreetpal Singh Brar, Mang Shi, Raymond Kin-Hi Hui and Frederick Chi-Ching (2014) Leung mail Genomic Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Isolates Revealed by Deep Sequencing. PLOS one). Se ha reportado que la variación genética del virus de PRRS es entre 0.48 y 1.32 % (Murtaugh M., (2012) Use and interpretation of sequencing inf PRRSV control programs. Allen D. Leman Swaine Conference. Veterinary Continuing Education). Estas características del virus de PRRS explican la inadecuada protección que se ha obtenido por vacunas.

Una de las estrategias que se ha utilizado para prevenir las enfermedades ocasionadas por estos virus son las autovacunas, lo cual implica desarrollar vacunas no sólo por país, sino por regiones, de lo contrario la prevención por estos medios resulta ser insuficiente.

También se ha observado que en el caso del virus causante del PRRS se logra neutralizar utilizando inmunoglobulinas provenientes del suero de mamífero (US 5,846,805). Estos resultados enseñan que las inmunoglobulinas son una alternativa para el tratamiento de virus de RNA. Sin embargo, el problema con esta alternativa es que los anticuerpos obtenidos de esta manera son inviables.

La aplicación de inmunoglobulinas obtenidas a partir de la yema de huevo (IgY) ya ha sido utilizada en diversas aplicaciones en salud y profilaxis animal e incluso en humanos. Las investigaciones realizadas por Akita y Nakai (*Akita, E., Nakai, S. (2000). Egg nutrition and biotechnology, CAB International, New York, p.301*), demuestran que la función protectora de IgY contra agentes infecciosos es atribuida principalmente por su capacidad para prevenir la colonización o neutralizar las toxinas.

Por lo anterior, un objetivo de la presente invención se refiere a la obtención de formulaciones de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar, efectivas y seguras contra diversos agentes que infectan a los animales, incluyendo por ejemplo el virus PRRS, el virus de la Diarrea Epidémica Porcina (DEP), el virus *White Spot Syndrome Baculovirus Complex*, las bacterias que provocan la mastitis bovina, el *Actinobacillus pleuropneumoniae* y las coccidiosis, así también como las intoxicaciones provocadas por tricotecenos, debido a que su factibilidad podría incidir directamente hacia una disminución importante en los gastos asociados a procesos de vacunación y de manera más importante aún, disminuirían fuertemente las pérdidas productivas asociadas a dichas enfermedades.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Con el fin de alcanzar el objetivo de la presente invención, se evaluó experimentalmente la capacidad de una formulación que comprende inmunoglobulinas IgY concentradas y específicas para neutralizar al virus de PRRS, obtenida a partir de yema de huevo proveniente de

gallinas previamente hiperinmunizadas con una formulación de vacuna emulsionada que comprende antígenos provenientes de una o varias cepas del virus del PRRS, aceite mineral ligero y un adyuvante particulado que consiste en partículas, micro-particular o nano-partículas de un polímero biodegradable.

Los inventores de la presente solicitud han logrado exitosamente el objetivo de la presente invención y han encontrado sorprendentemente que con antígenos de una o más cepas diferentes del virus del PRRS, cuidadosamente seleccionadas, se puede generar la esperada protección cruzada contra otras cepas del mismo virus e inducir la generación de inmunoglobulinas capaces de neutralizar un mayor número de virus de PRRS circulantes en el campo. La formulación de vacuna emulsionada, además debe incluir un aceite mineral ligero, como por ejemplo Marcol y un adyuvante particulado que consiste en partículas, micro-partículas o nano-partículas de un polímero biodegradable para potenciar la vacunación, preferentemente empleando un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β-(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilatada), tal como Chitosan. En donde el Mercol 52 es una mezcla purificada de hidrocarburos líquidos saturados. Es un líquido aceitoso incoloro, transparente y es esencialmente inodoro y sin sabor. Se obtiene del petróleo a través de varias etapas de refinación, incluyendo una purificación final por hidrogenación catalítica.

Marcol 52 se fabrica para superar los requisitos de pureza de las Farmacopeas. Debido a su inercia química superior, demuestra un mejor color y estabilidad

oxidativa que la mayoría de los aceites minerales y vegetales, cuando se almacena y se usa bajo condiciones controladas.

Los aceites blancos se fabrican y controlan según el sistema de gestión de la calidad del producto en ISO 9000 o equivalente.

Las especificaciones del Mercol 52 de acuerdo con el certificado expedido del distribuidor, son:

Prueba.	**Resultado**	**Unidad**	**Especificación**
Densidad relativa (15/15):	0.83		
Densidad 20 °C	0.826	g/cm^3	0.825-0.834
Índice de Refracción 20 °C	1.4		1.457-1.460
Viscosidad cinemática 40 °C	7.4	mm^2/s	7.0-8.0

Con una formulación de vacuna emulsionada así preparada se inmuniza a las aves de postura para obtener, a través de la yema de huevo, inmunoglobulinas IgY neutralizantes contra agentes infecciosos o toxinas, las cuales tras un método de extracción, deslipidización y concentración, donde se utilizan cantidades mínimas, se obtiene finalmente una formulación concentrada de dichas inmunoglobulinas IgY capaces de lograr una protección inesperada de hasta aproximadamente el 100%, además de regularizar el nivel de S/P en granjas ya infectadas.

La invención presenta la ventaja adicional de estabilizar a la piara, parvada, rebaño o bancos, reduciendo la circulación de los agentes infecciosos. Así también, usando la formulación concentrada de origen aviar de la invención como programa, se reduce la generación de subpoblaciones a la maternidad y al destete

se logra retrasar la seroconversión de los animales de engorda.

A la fecha las inmunoglobulinas evaluadas han provenido de suero de mamífero y solamente han sido probadas por ejemplo en un modelo experimental desafiando con la misma cepa del virus con el que se vacunaron. Es decir, a diferencia de la presente invención, a las vacunas del estado de la técnica se les ha probado únicamente la protección homóloga (WO 02/067985).

Además, la formulación concentrada de origen aviar de la invención, que comprende inmunoglobulinas IgY concentradas puede utilizarse en cualquier etapa productiva de los animales sin generar efectos adversos o indeseables.

La formulación concentrada de origen aviar de la invención se encuentra altamente concentrada y protege contra desafíos más altos del agente infeccioso o toxinas. Se cuenta con evidencias de protección contra desafíos de 10 a la siete (10,000,000), lo cual resulta muy superior a lo ya conocido en el estado de la técnica (WO 2007/061281 A2).

Adicionalmente a lo anterior, mediante los procesos de la presente invención se logra concentrar las inmunoglobulinas (IgY) neutralizantes contra los agentes infecciosos circulantes de campo o toxinas, de tal manera que se puede formular un concentrado donde se aplica únicamente 1 ml ó 3 ml por dosis, mientras que la aplicación de las vacunas y productos del estado de la técnica, es hasta de 5 ml y más aún hasta 10 ml, e incluso más de 10 ml (WO 2007/061281 A2).

La reducción en el volumen de aplicación es beneficiosa en varios aspectos. Primero porque la aplicación se hace sencilla, y segundo porque se reduce

costos de producción y tercero, porque el transporte a diferentes áreas ocupa menor espacio.

Las dosis de 1 ml o hasta 3 ml que se pueden lograr gracias a la formulación concentrada de inmunoglobulinas (IgY) de la presente invención, según la gravedad, obviamente, siguen un esquema de inmunización y, aún sin ser propiamente una vacuna, puede funcionar como tal y controlar los animales infectados. La formulación concentrada de origen aviar de la invención entra dentro de la plataforma de inmunidad pasiva, porque contiene inmunoglobulinas neutralizantes contra agentes infecciosos o toxinas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra los resultados de titulación por MNT de diferentes muestras de huevo colectado de aves inmunizadas con vacunas diferentes. El grupo A fue vacunado con 2 vacunas elaboradas con aceite mineral cada una de ellas conteniendo 3 cepas del virus de PRRS y aplicadas de maneara alternativa mensualmente. El grupo B fue vacunado con 1 vacuna elaborada con aceite mineral y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente. El grupo C fue vacunado con una vacuna elaborada con marcol y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente.

Estos resultados indican que los títulos de anticuerpos IgY producidos por la vacuna que contuvo seis cepas del virus PRRS, utilizando una formulación con

marcol y chitosan resulta ser la que induce mayor cantidad de anticuerpos contra el Síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo.

La Figura 2 muestra el promedio del título de anticuerpos IgY en la yema utilizando tres tipos de formulaciones de vacuna. El grupo A fue vacunado con 2 vacunas elaboradas con aceite mineral cada una de ellas conteniendo 3 cepas del virus de PRRS y aplicadas de maneara alternativa mensualmente. El grupo B fue vacunado con 1 vacuna elaborada con aceite mineral y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente. El grupo C fue vacunado con una vacuna elaborada con marcol y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente.

La Figura 3 muestra el incremento en el título de inmunoglobulinas después de aplicar el proceso de concentración. Se extrajeron inmunoglobulinas de yema, una parte se cuantificó por el método de MNT y el resto se sometió al proceso de concentración. El grupo A fue vacunado con 2 vacunas elaboradas con aceite mineral cada una de ellas conteniendo 3 cepas del virus de PRRS y aplicadas de manera alternativa mensualmente. El grupo B fue vacunado con 1 vacuna elaborada con aceite mineral y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente. El grupo C fue vacunado con una vacuna elaborada con marcol y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente.

La Figura 4 muestra la disminución paulatina de los niveles de anticuerpos en las hembras del hato reproductor tras recibir la formulación concentrada.

En la figura 5 se muestra el monitoreo de la mortalidad a partir de la semana 3 y hasta la 26. Los grupos que fueron tratados con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención se resaltan en un cuadro azul más intenso (grupos del 07 al 16).

La Figura 6 presenta una gráfica con los porcentajes de mortalidad de cada grupo evaluado, en donde se destacan aquéllos que fueron tratados con la formulación concentrada de origen aviar de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Inmunización de aves de postura para obtener inmunoglobulinas (IgY) neutralizantes contra agentes infecciosos o toxinas.

Se genera una vacuna emulsionada compuesta de antígenos para producir anticuerpos neutralizantes y no sólo contra una cepa de un determinado agente infeccioso o toxina, sino contra varias cepas circulantes de campo (vigilancia epidemiológica) o toxinas.

Lo anterior es muy importante para el caso de los virus de RNA, porque derivado de nuestra investigación se observó que no todas las cepas de un virus circulante pueden ser neutralizadas con anticuerpos generados a partir de los antígenos de una cepa en específico. Lo mismo sucede con las vacunas contra virus, pues cuando se vacuna con una cepa heteróloga, la protección es parcial.

En el caso de los microorganismos, se seleccionaron las cepas mediante pruebas de MNT (microneutralización) cruzada. Esta prueba consiste en probar el nivel de neutralización de las inmunoglobulinas, obtenidas

utilizando una vacuna con cepas definidas, contra los nuevos aislamientos del agente infeccioso. En nuestro trabajo en el laboratorio, hemos determinado que si el nuevo aislamiento presenta títulos menores a 1:160 en la MNT entonces se considera a esa cepa como candidata para incluirse en una nueva vacuna. Por lo tanto, a la fecha nuestra vacuna ha contenido algunas cepas que confieren un espectro de neutralización amplio contra las cepas de los agentes infecciosos circulantes en México. Sin embargo, esto no limita a la invención y no debe entenderse que la invención se refiere a una vacuna que únicamente incluye las cepas seleccionadas, porque las cepas del agente infeccioso podrán ir variando conforme se vaya monitoreando la circulación en campo de cepas nuevas, las cuales pueden incluirse posteriormente en la vacuna para mantener la protección en los animales. También podría ampliarse el espectro de neutralización de la presente invención y adecuarse contra otras cepas de agentes infecciosos circulantes en otros países o en otras regiones.

Las cepas del agente infeccioso pueden ser aislamientos de campo obtenidos a partir de suero o tejido de animales enfermos. La base para la selección, como mencionamos, radica en la prueba de microneutralización cruzada entre las diferentes cepas aisladas, con los Ig’s contenidos en el producto y generados a partir de las cepas seleccionadas.

En el caso del virus de PRRS se pueden replicar en la línea celular MARC-145 y no se realizan más de cinco pases del virus de la semilla de trabajo, para evitar la atenuación. Los antígenos seleccionados se inactivan con formol al 0.1% o por otro método descrito en el estado de la técnica. En nuestro laboratorio hemos determinado que

la mezcla de los antígenos debe tener cada uno un título mínimo de $DIE_{50\%}$ 10^4/ml.

Considerando lo anterior, la formulación de la vacuna emulsionada para inmunizar a las aves comprende además de antígenos de una o varias cepas cuidadosamente seleccionadas, un aceite mineral ligero y un adyuvante particulado que consiste en partículas, micro-partículas o nano-partículas de un polímero biodegradable para potenciar la vacunación, en particular se prefiere un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β-(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilatada), tal como Chitosan.

La formulación de la vacuna de tipo agua en aceite, puede contener aproximadamente 50% a 70% y preferentemente aproximadamente 60% a 67% de Marcol, aproximadamente 20% a 40% y preferentemente aproximadamente 28% a 35% de agua con antígenos del virus PRRS; aproximadamente 5% a 15% de cada cepa del virus PRRS seleccionada con base en los criterios antes explicados, aproximadamente 2% a 5% de Monooleato de polioxietileno Sorbitan (Tween 80), aproximadamente de 2% a 8% de Sorbitán Monooleato de Sorbitan (Span 80) y un adyuvante como un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β-(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilatada), particularmente 4 a 6% de chitosan. Para la preparación de la vacuna, cada componente se adiciona uno por uno bajo sistema de agitación durante 1 a 5 minutos, adicionando al final el chitosan.

La vacuna se aplica a las aves de postura libres de patógenos, con 0.5 ml, 1 vez al mes, por la vía de

administración subcutánea desde la semana 8 y hasta la 60 de edad, para finalmente obtener una formulación de inmunoglobulinas (IgY) neutralizantes de los agentes infecciosos de campo o toxinas a partir de la yema de huevo.

En particular, el nivel de anticuerpos para cada una de las cepas del agente infeccioso es evaluado por microneutralización (MNT) de las muestras de yema de huevo colectadas de la parvada vacunada. El título serológico mínimo debe cumplir el criterio de 1:160.

Tras la inmunización, se cosechan los huevos de las aves inmunizadas y los mismos se someten a un proceso de extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas a partir de la yema de huevo.

Proceso de extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas IgY.

Se realizan los siguientes pasos para realizar la extracción y concentración de las inmunoglobulinas IgY neutralizantes de agentes infecciosos o toxinas a partir de la yema de huevo.

La yema de huevo se diluye 1:4 ó 1:8 (sin la clara) con azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración por lo menos durante toda el día, preferentemente de 12 a 24 horas. Posteriormente, el sobrenadante se separa y se agrega 1 al 15% de hidroxipropilmetilcelulosaftalato (HPMCP) en proporción de 0.25 ml por cada 100 ml de yema. Se deja reposar por lo menos 24 horas. La capa de lípidos que se forma en la parte superior de la solución es separada y la parte acuosa se filtra, luego se le adiciona PEG, preferentemente 8000, en una proporción del 5-30% P/V, se

mezcla y se deja reposar al menos durante 4 horas, pero de preferencia se deja toda la noche a 4°C. Después se centrifuga por 20 a 30 minutos y se retira el sobrenadante. La pastilla resultante se solubiliza con PBS 1X o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen original.

Terapias con la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de la invención.

La formulación resultante del proceso de extracción, deslipidización y concentración de las inmunoglobulinas IgY neutralizantes de agentes infecciosos o toxinas, obtenida a partir de la yema de huevo de gallinas previamente hiperinmunizadas con una vacuna emulsionada que comprende antígenos, un aceite mineral ligero y un adyuvante particulado que consiste en partículas, micro-partículas o nano-partículas de un polímero biodegradable, tal como un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β-(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilatada) (Chitosan), puede comprender: aproximadamente 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY concentradas contra patógenos o toxinas de la invención, preferentemente 1% de inmunoglobulinas IgY concentradas, aproximadamente 80% a 90% de agua y aproximadamente 0.001% a 0.03% de conservadores. La dosis de tratamiento de la formulación concentrada de la invención puede ser de 1 ml y de 3 ml como máximo, la cual logra neutralizar las variedades de campo los agentes infecciosos o toxinas de la invención, ofreciendo inesperadamente una protección de hasta el 100% en

animales, además de regularizar el nivel de S/P en granjas ya infectadas, tal como se muestra más adelante.

Considerando lo descrito anteriormente, en una primera modalidad, la presente invención se refiere a una formulación de vacuna emulsionada que comprende antígenos, un aceite mineral ligero, preferentemente Marcol y un adyuvante particulado que consiste en partículas, micro-partículas o nano-partículas de un polímero biodegradable, tal como por ejemplo el polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β-(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilatada), preferentemente Chitosan. Además, la formulación de vacuna de la presente invención, comprende uno o más emulsionantes, tal como Monooleato de polioxietileno Sorbitan (Tween 80), Sorbitán Monooleato de Sorbitan (Span 80), o una mezcla de los mismos.

Los antígenos pueden provenir de una o varias cepas diferentes de uno o varios agentes infecciosos o de toxinas, tales como por ejemplo virus, baterías o protozoos, más particularmente del virus del PRRS, del virus de PED, del virus *White spot Syndrome Baculovirus Complex*, de *Rotavirus spp.* o de *Coronavirus spp.*, y más particularmente de los virus de PRRS que tienen una secuencia de nucleótidos del gen ORF5 seleccionada del grupo que consiste de SEQ. ID. NO: 1, SEQ. ID. NO: 2, SEQ. ID. NO: 3, SEQ. ID. NO: 4, SEQ. ID. NO: 5, SEQ. ID. NO: 6 y SEQ. ID. NO: 7, y también del virus de la Diarrea Epidémica Porcina (DEP). También los antígenos puede provenir de una o varias bacterias, tal como de Salmonella spp., de las seleccionadas del grupo que consiste en: *Staphylococcus aureus, Streptococcus*

agalactiae, Escherichia coli, Corynebacterium pyogenes y Mycoplasma bovis, o también de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Los antígenos además pueden provenir de uno o varios protozoarios seleccionados del grupo que consiste en: *Eimeria tenella, Eimeria acervulina y Eimeria máxima*, o de toxinas producidas por hongos, tales como tricotecenos y más particularmente de 4-deoxinivalenol (DON). Más aun, los antígenos pueden provenir de una o varias cepas diferentes de uno o varios virus, una o varias bacterias o uno o varios protozoarios, tal como por ejemplo de antígenos que provienen de *Escherichia coli, Salmonella spp., Clostridium perfringens, Rotavirus spp. y Coronavirus spp.* En particular, los antígenos también pueden provenir del grupo que consiste de *Escherichia coli, Rotavirus spp. y Coronavirus spp.*

La formulación de vacuna emulsionada de la invención puede contener cepas virales seleccionadas por tener un título serológico menor a 1:160, evaluado por microneutralización cruzada utilizando un pool de inmunoglobulinas obtenidas con la vacuna en curso.

Asimismo, la formulación de vacuna emulsionada de la invención puede contener una mezcla de antígenos con títulos mayores a $DIE_{50\%}$ 10^4/ml.

De acuerdo con el o los antígenos seleccionados, la presente invención también se refiere al uso de la formulación de vacuna emulsionada en la elaboración de una composición concentrada de inmunoglobulinas IgY útil para el tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo (PRRS) en porcinos, el tratamiento de Diarrea Epidémica Porcina (DEP) en porcinos, el tratamiento del síndrome de la mancha blanca en camarón, el tratamiento de mastitis bovina, el tratamiento de

infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos, el tratamiento de coccidiosis en aves, el tratamiento de intoxicaciones provocadas por tricotecenos, particularmente en donde el tricoteceno es 4-deoxinivalenol (DON), respectivamente, en donde la formulación de vacuna emulsionada es administrable por la vía subcutánea a las aves de postura.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a un proceso para la extracción y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo de gallinas previamente hiperinmunizadas con la formulación de vacuna de la presente invención, caracterizado por los siguientes pasos:

a) Se diluye la yema 1:4 ó 1:8 (sin la clara) con azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración por lo menos durante 24 horas.

b) Se separa el sobrenadante y se agrega hidroxipropilmetilcelulosaftalato (HPMCP) al 1-15% en proporción de 0.25 ml por cada 100 ml de yema. Se deja reposar por lo menos 24 horas.

c) Se separa la capa de lípidos que se forma en la parte superior de la solución y se filtra la parte acuosa.

d) Se adiciona PEG, preferente PEG 8000 en una proporción del 5-30% P/V, se mezcla y se deja reposar al menos durante 4 a 12 horas a 4°C.

e) Se centrifuga por 20 a 30 minutos y se quita el sobrenadante.

f) La pastilla resultante se solubiliza con PBS 1X o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen original, mantener el pH en 7.

En una modalidad adicional, la presente invención se dirige a una formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar obtenida por el proceso para extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo proveniente de gallinas previamente hiperinmunizadas con la vacuna emulsionada de la invención. Dichas formulaciones concentradas de origen aviar de la invención puede comprender además aproximadamente de 70% a 85% de agua y/o aproximadamente de 0.001% a 0.03% de conservadores. En particular, la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY está caracterizada porque comprende 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY concentradas neutralizantes del virus que causa el PRRS.

Además, según el o los antígenos seleccionados, la presente invención también se refiere al uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo (PRRS) en porcinos, la Diarrea Epidémica Porcina (DEP) en porcinos, el síndrome de la mancha blanca en camarón, mastitis bovina, las infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos, la coccidiosis en aves y las intoxicaciones provocadas por tricotecenos, particularmente las provocadas por tricotecenos como 4-deoxinivalenol (DON), en donde el medicamento puede ser administrable por la vía de administración parenteral, preferentemente por la vía intramuscular o es administrable vía oral y con el alimento, según sea el caso.

Los siguientes ejemplos muestran los resultados de la aplicación de la formulación concentrada de la invención en porcinos. No obstante, dichos ejemplos son

proporcionados con el fin de ilustración y no de limitación.

EJEMPLO 1

Se elaboraron dos vacunas que contuvieron tres cepas cada una del virus PRRS, utilizando una formulación sin marcol y sin chitosan. Estas vacunas se aplicaron a las aves de manera mensual y alternadas; es decir, un mes se administró una y al siguiente la otra y así sucesivamente.

Tras la inmunización, se cosecharon los huevos de las aves inmunizadas y se sometieron a un proceso de extracción de inmunoglobulinas a partir de la yema de huevo, tal como antes fue descrito.

Como resultado de la inmunización anterior, se obtuvo una formulación con inmunoglobulinas IgY neutralizantes de virus del PRRS, pero cuya concentración fue baja.

La figura 1 muestra los resultados de este experimento (grupo A), en los que se puede apreciar el bajo rendimiento de inmunoglobulinas IgY neutralizantes de virus del PRRS de la formulación previamente obtenida, la cual es incapaz de llevar a cabo un tratamiento eficiente en porcinos que padecen del Síndrome Respiratorio y Reproductivo, pues es necesario emplear volúmenes mayores a 5 mL y que proteja a títulos de 10^4. Además, este experimento resultó ser complicado y problemático por el manejo de dos vacunas.

EJEMPLO 2

Se elaboró una vacuna conteniendo seis cepas diferentes del virus PRRS, utilizando una formulación sin marcol y con chitosan, la cual fue administrada a las aves mediante un esquema de inmunización mensual.

Tras la inmunización, se cosecharon los huevos de las aves inmunizadas y se sometieron a un proceso de extracción de inmunoglobulinas a partir de la yema de huevo, tal como antes fue descrito.

Como resultado de la inmunización anterior, el rendimiento mejoró con respecto al experimento del ejemplo 1, pero no fue suficiente (Ver figura 1, grupo B).

Como resultado de este experimento, se encontró que el rendimiento de inmunoglobulinas IgY neutralizantes de virus del PRRS es inadecuado para llevar a cabo un tratamiento efectivo en porcinos que padecen del Síndrome Respiratorio y Reproductivo.

EJEMPLO 3

Se formuló nuevamente una vacuna, pero ahora utilizando Marcol como aceite mineral ligero y chitosan como adyuvante particulado. Esta vez, se incluyeron antígenos de 6 cepas del virus PRRS en una sola vacuna.

Tras la inmunización, se cosecharon los huevos de las aves inmunizadas y se sometieron a un proceso de extracción de inmunoglobulinas a partir de la yema de huevo, tal como antes fue descrito.

Nuestros resultados indican que los títulos de anticuerpos se incrementan hasta 2 veces respecto a lo obtenido con la formulación del experimento del ejemplo 2 (ver figura 1, grupo C).

Las figuras 1 y 2 muestran los resultados de este experimento, en los que se puede apreciar que el

rendimiento de inmunoglobulinas IgY neutralizantes de virus del PRRS se incrementa significativamente cuando se utiliza una formulación con marcol y chitosan, lo cual resulta adecuado para llevar a cabo un tratamiento efectivo en porcinos que padecen del Síndrome Respiratorio y Reproductivo.

EJEMPLO 4

En este ejemplo se analizó el producto terminado de inmunoglobulinas. Se inmunizaron aves de postura, se cosecharon los huevos de las aves inmunizadas y las yemas de huevo se sometieron a un proceso de extracción y concentración de inmunoglobulinas, tal como antes fue descrito. Las vacunas con las que se inmunizaron a las parvadas fueron las mismas que se presentaron en los ejemplos 1 a 3, pero en este caso, se incrementó el tamaño del lote a 10,000 huevos por parvada.

Nuestros resultados indican que el proceso de concentración, descrito anteriormente, incrementa los títulos de anticuerpos respecto a lo obtenido sin dicho proceso. El incremento en la concentración va de 1.6 a 2.1 veces (figura 3). Como resultado de este experimento, se encontró que el rendimiento de inmunoglobulinas IgY neutralizantes de virus del PRRS es adecuado para llevar a cabo un tratamiento efectivo en porcinos que padecen del Síndrome Respiratorio y Reproductivo, utilizando un volumen menor para alcanzar la protección.

EJEMPLO 5

Aplicación de inmunoglobulinas (tipo IgY) en las hembras del hato reproductor.

Se realizó un seguimiento longitudinal de la presencia de anticuerpos contra el virus de PRRS mediante la evaluación de sueros de 30 cerdas seleccionadas aleatoriamente a partir de una granja de explotación de ciclo completo con 500 cerdas, situada en el occidente de la República Mexicana. Esta granja produce lechones negativos al virus de PRRS, que se contaminan a lo largo de la vida productiva.

El hato reproductor fue tratado con una aplicación de 1 ml de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención, por vía intramuscular cada 4 meses y una repetición 15 días después. Posteriormente se realizaron aplicaciones semanales a los 70 y 85 días de gestación.

Las cerdas del pie de cría fueron monitoreadas de forma bimestral para determinar el movimiento viral. Se tomaron muestras de sangre de los mismos 30 animales seleccionados inicialmente. Para la evaluación, se utilizó la técnica de ELISA (IDEXX, PRRS X3), que es una manera indirecta para medir la efectividad del tratamiento con IgY concentradas. El kit mide los niveles de anticuerpos del tipo IgG que genera el cerdo en respuesta a una viremia. Por lo tanto, si el cerdo está infectado producirá anticuerpos del tipo IgG como respuesta y se obtendrán valores de S/P por arriba del punto de corte, pero si no hay viremia el kit arrojará valores S/P inferiores al punto de corte. El punto de corte de la ELISA fue de 0.4 S/P.

En la figura 4 se muestra que el tratamiento aplicado al hato reduce los niveles de anticuerpos de

manera paulatina a medida que se realiza el monitoreo bimestral y por ende se demuestra que el virus de PRRS fue neutralizado por las inmunoglobulinas aplicadas (del tipo IgY), limitando de esta manera la infección. Es importante señalar que sorpresivamente nuestro producto neutralizó al virus de tal manera que al cabo de 6 meses ya no se registró una reinfección del virus de PRRS. Esto mismo se prueba porque se registró una diferencia sustancial en los parámetros productivos de granjas negativas y positivas.

EJEMPLO 6

Aplicación de inmunoglobulinas (IgY) concentradas en lechones

En el presente ejemplo se muestran los resultados de evaluación de disminución de la viremia en lechones clínicamente afectados por el virus de PRRS. Los lechones no presentaron viremia durante la etapa de maternidad (primeras 3 semanas). Sin embargo, hubo evidencia clínica de viremia alrededor de las 6-8 semanas de edad. Esto se comprobó mediante la técnica de PCR en tiempo real, en donde se generaron 5 pools de sueros de animales virémicos; cada pool integrado por sueros de 5 porcinos diferentes (un total de 25 porcinos evaluados). Como se observa en la tabla, la carga viral alcanzó títulos entre 6.16×10^5 y 2.24×10^7.

Identificación	Carga Viral inicial	Carga viral después del Tratamiento

Destete 6	$6.16X10^5$	NEGATIVO
Destete 6	$4.98X10^6$	NEGATIVO
Destete 7-8	$5.54X10^4$	NEGATIVO
Destete 7-8	$2.24X10^7$	NEGATIVO
Destete 7-8	$1.21X10^7$	NEGATIVO

Una vez que se confirmó la viremia, se les aplicó un tratamiento con la formulación concentrada de origen aviar de la invención. Se aplicó una dosis de 3 mL por vía intramuscular. Para evaluar la eficacia del tratamiento, se observaron los datos clínicos y además se cuantificó la cantidad de virus circulante en los porcinos.

Los resultados del monitoreo a los 10 días posteriores a la aplicación de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención evidenció que el 100% de las muestras fueron negativas a la presencia de material genético del virus PRRS en suero.

Con los resultados obtenidos, se demuestra que la aplicación de un programa con inmunoglobulinas en el pie de cría evita la circulación viral y puede neutralizar la viremia en lechones de destete con cargas de 10^7 partículas virales por mL.

EJEMPLO 7

El uso de inmunoglobulinas IgY concentradas reduce la mortalidad de lechones

La formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención fue aplicada a porcinos destetados y destinados para engorda. Durante todo el

tiempo de producción se registró la mortalidad bajo diferentes sistemas de tratamiento.

La granja en estudio se ubica en la región centro occidente de la república mexicana y con 1100 cerdas en su hato reproductor y una producción semanal de 500 lechones. La granja tiene antecedentes de infección endémica de PRRS, aun cuando se han implementado varias estrategias de control. Se tiene un sistema de autoreemplazo, en el cual se considera la introducción de cerdas cada 4 meses. En el pie de cría se incluye la aplicación de la vacuna a virus vivo modificado contra PRRS cada 3 meses.

En el presente ejemplo se hizo un monitoreo semanal y se calculó el porcentaje de mortalidad tanto en el destete (semanas 3 a 9) como en el periodo de engorda (semana 10 a 26).

Se compararon dos tratamientos. Uno basado en vacuna viva y otro con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención, además también se consideró un bloque control sin tratamiento. Cada tratamiento estuvo integrado por diferentes grupos que fueron evaluados de manera independiente: los grupos del 01 al 06 corresponden a lechones tratados de forma convencional (vacuna viva) y los grupos del 07 al 16 fueron los que recibieron dos dosis de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención, en tanto los grupos 17, 18 y 19 no fueron tratados.

Tipo de tratamiento	Descripción del tratamiento	Grupos que recibieron el tratamiento
Vacuna a virus vivo modificado	Aplicación de la vacuna a los 21 días de edad y 3 meses.	6, Del 01 al 06
Inmunoglobulinas Altamente Concentradas de Origen Aviar especificas para PRRS (tipo IgY)	Dos aplicaciones de 3 ml c/u, semana 1 y 10 después del destete.	10, Del 07 al 16
Control sin tratamiento	Sin tratamiento	3, Del 17 al 19

En la figura 5 se muestra el monitoreo de la mortalidad a partir de la semana 3 y hasta la 26. Los grupos que fueron tratados con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención se resaltan en un cuadro azul más intenso (grupos del 07 al 16).

El porcentaje de mortalidad promedio de los grupos no tratados fue el más alto (25.06%), en seguida se ubica a los grupos que recibieron el tratamiento convencional (21.2% en promedio) y el mejor tratamiento fue el de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de nuestra invención, donde se obtuvo un porcentaje promedio de mortalidad del 10.27%. Es decir, que con el uso de las inmunoglobulinas IgY se alcanza una supervivencia de casi el 90% de los animales tratados que representa 10% más de lo alcanzado por el método de vacunación.

En la figura 6 se presenta una gráfica de los porcentajes de mortalidad acumulada de cada grupo evaluado, en donde se destacan aquéllos que fueron tratados con la formulación concentrada de origen aviar de la invención.

Los resultados del uso de inmunoglobulinas del tipo IgY concentradas muestran una reducción significativa en los porcentajes de mortalidad asociados al virus de PRRS. Aún más, se observó que el estado de salud y productividad de estos animales también mejoró, a diferencia de los grupos que recibieron la vacuna. Es importante señalar que esta es la primera vez que se evidencia el uso de inmunoglobulinas aviares para el tratamiento en lechones.

Estos resultados son muy significativos, pues el programa con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención en lechones no sólo disminuye el porcentaje de mortalidad, sino que además brinda la posibilidad de obtener otras mejoras en los parámetros productivos.

Por lo anterior, se apreciará que aunque las modalidades específicas de la invención se han descrito en la presente para propósitos de ilustración, pueden hacerse varias modificaciones sin desviarse de la naturaleza y alcance de la invención. En consecuencia, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones anexas.