

**"Método in vitro de cuantificación y evaluación de la
viabilidad de ooquistes de *Eimeria* spp."**

CAMPO DE LA INVENCION

[001] Este documento pertenece al campo de la Biología y la Medicina Veterinaria, presentando un nuevo método *in vitro* y simplificado de diferenciación, cuantificación y evaluación de viabilidad de ooquistes de *Eimeria* spp utilizando un reactivo a base de yodo.

DESCRIPCION DEL ESTADO DE LA TECNICA

[002] La eimeriosis o coccidiosis es una enfermedad común en animales causada por protozoos del género *Eimeria*, siendo más común particularmente en aves de engorde. Es una infección que suele causar animales jóvenes y puede llevar a la muerte de granjas avícolas enteras, impactando directamente en la economía de los productores rurales.

[003] Así, la principal estrategia actual para prevenir la coccidiosis en estos animales es a través de la vacunación de los rebaños. Las vacunas contra la coccidiosis se producen a partir de los ooquistes del parásito *Eimeria* spp.

[004] Actualmente, el análisis de factibilidad de ooquistes de *Eimeria* se realiza inoculando la suspensión de ooquistes en aves y esperando el tiempo de incubación de los ooquistes en aves para verificar los efectos patológicos causados por los ooquistes inoculados.

[005] Cuando los ooquistes no son viables, las aves no

muestran ningún grado de intensidad de los efectos patológicos de los ooquistes en comparación con las aves no inoculadas. Esta técnica es costosa debido a la necesidad de un área de manejo de estos animales para obtener un resultado después de días, además de presentar un desafío porque es un método de prueba en animales *in vivo*.

[006] Además, el método de evaluación de viabilidad actualmente utilizado en el mercado presenta resultados cualitativos, y no es posible cuantificar en porcentaje la viabilidad de los ooquistes para su posterior aplicación en la obtención de APIs para la producción de vacunas para prevenir la coccidiosis, una enfermedad muy común en las aves de corral y que puede conllevar pérdidas significativas en la avicultura industrial.

TÉCNICA ANTERIOR DE LA INVENCION

[007] La patente estadounidense 6,344,340 B1 describe un ensayo de viabilidad para protozoos formadores de esporoquistes, en donde una muestra del protozoo se trata con al menos un colorante vital para determinar la viabilidad del protozoo a partir de la diferenciación de la tinción mediante microscopía de fulorescencia. Por lo tanto, difiere completamente del método propuesto por el objeto de búsqueda, que propone un método colorimétrico que utiliza un reactivo a base de yodo para identificar ooquistes viables de *Eimeria* de una manera más simplificada, mediante una cámara de conteo bajo un microscopio óptico.

[008] El documento de patente IL176475A describe un

método para la purificación de ooquistes de *Eimeria* spp. a partir de material fecal utilizando enzimas. El método consiste en poner en contacto el material fecal con polisacaridasa, tal como celulasa y pectinasa, y posteriormente amilasa, con el fin de eliminar dicho material. Por lo tanto, difiere completamente del método propuesto por la invención reivindicada, que propone un método colorimétrico que utiliza un reactivo a base de yodo para identificar ooquistes viables de *Eimeria*, así como su diferenciación de otras partículas, como el almidón.

[009] El documento de patente AU200031298A describe un método para identificar ooquistes que implican la unión de anticuerpos, además de usar otra especie de protozoos (*Cryptosporidium* spp.). Por lo tanto, difiere completamente del método propuesto por la presente invención, que propone un método colorimétrico que utiliza un reactivo a base de yodo para la identificación de ooquistes de *Eimeria* viables.

[0010] La patente US7229615B2 describe un método para producir vacunas, donde parte de las reivindicaciones se refieren a la esporulación y separación de ooquistes de *Eimeria* para la producción de dichas vacunas. Más específicamente, el método descrito utiliza agua y peróxido de hidrógeno, y la posterior aireación del material y el acondicionamiento del pH para recuperar los ooquistes del material. Por lo tanto, difiere completamente del método propuesto por la presente invención, que propone un método colorimétrico que utiliza un reactivo a base de yodo para la identificación de ooquistes de *Eimeria* viables.

[0011] El documento de patente CN113367099A describe el uso de una solución de yodo en huevos en un método para obtener aves de corral libres de coccidiosis para su uso en el campo experimental. Por lo tanto, difiere completamente del método propuesto por el objeto de búsqueda, que propone un método colorimétrico que utiliza un reactivo a base de yodo para identificar ooquistes de *Eimeria* viables.

[0012] El artículo "A simple and efficient method for isolation of a single *Eimeria* oocyst from poultry litter using a micromanipulator" (Dongjean Yim *et al.*, 2011) revela el uso de un micromanipulador, así como la identificación genómica para el aislamiento de un solo ooquiste de *Eimeria* a partir de material fecal de pollo. Por lo tanto, difiere completamente del método propuesto por la presente invención, que propone un método colorimétrico que utiliza un reactivo a base de yodo para identificar ooquistes de *Eimeria* viables.

[0013] El artículo "Single oocyst infection: a simple method for isolation of *Eimeria* spp. from the mixed field samples" (R. E. Khalafalla *et al.*, 2010) revela dos métodos simples de identificación morfológica de ooquistes esporulados de *Eimeria* spp. Aislado. El primero describe el uso de gelatina, y el segundo describe un método de extracción de ADN para identificar ooquistes. Por lo tanto, difiere completamente del método propuesto por el objeto de búsqueda, que propone un método colorimétrico que utiliza un reactivo a base de yodo para identificar ooquistes de *Eimeria* viables.

[0014] Por lo tanto, el uso de una solución a base de yodo para la diferenciación, cuantificación y evaluación de viabilidad de ooquistes viables de *Eimeria* spp., en un método simplificado y completamente *in vitro*, no se describe en el estado de la técnica.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0015] La presente invención se establece y caracteriza en las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes describen otras características de la invención o realizaciones relacionadas con la idea inventiva principal.

[0016] En un primer aspecto, la presente invención reivindica el uso de solución a base de yodo en la cuantificación y evaluación *in vitro* de la viabilidad de los ooquistes de *Eimeria* spp., utilizando una cámara de recuento bajo microscopio óptico.

[0017] En un segundo aspecto, la invención reivindica que la solución de yodo utilizada tiene como formulación 0,4% a 3% de yodo resublimado; 1,8% a 5% de yoduro de potasio; 70% a 85% de alcohol; 25% a 35% de agua purificada.

[0018] En un tercer aspecto, la invención reivindica que la diferenciación de los ooquistes tiene lugar a partir de la diferenciación de partículas teñidas y no teñidas y los ooquistes viables se vuelven translúcidos, mientras que las partículas y/u ooquistes de almidón no viables se tiñen.

Además, la presente invención proporciona que el recuento se puede realizar manualmente y/o utilizando un sistema de análisis de imágenes.

[0019] En un cuarto aspecto, la invención reivindica que las cámaras de recuento de microscopio óptico utilizadas pueden ser cámaras de Neubauer, Fuchs Rosenthal, Petroff-Hausser, Sedgwick-Rafter o Burkner.

[0020] En un quinto aspecto, la presente invención reivindica que la metodología se puede aplicar en la verificación del estado de los ooquistes a granel, en la definición del tiempo de estabilidad de los ingredientes farmacéuticos activos y las vacunas, en el control de calidad del proceso de fabricación de vacunas contra la coccidiosis, en la evaluación de las mejoras del proceso de producción, en la estimación del nivel de respuesta de la vacuna contra la coccidiosis *in vitro*.

OBJETIVOS DE LA INVENCION

[0021] El objetivo principal de la presente invención es proponer una técnica innovadora y simplificada para la evaluación cuantitativa de ooquistes viables de *Eimeria* spp., además de su diferenciación de otras partículas y no ooquistes (como el almidón, por ejemplo) mediante tinción de ooquistes suspendidos utilizando reactivo a base de yodo.

[0022] Otro objeto de la presente invención es optimizar el proceso de evaluación de la viabilidad de los ooquistes, sin necesidad de realizar pruebas en animales, siendo un

método posible de realizar *in vitro*.

[0023] Otro objetivo de la presente invención es facilitar el recuento de ooquistes con presencia de alta cantidad de almidón en las suspensiones y la reducción de errores analíticos en la diferenciación de ooquistes de no ooquistes, además de facilitar la cuantificación de las suspensiones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0024] Las características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción y reivindicaciones de la misma a partir de los dibujos adjuntos, en los que:

[0025] Las Figuras 1 y 2 demuestran la visualización de la diferencia entre ooquistes teñidos y no teñidos bajo un microscopio óptico.

[0026] Las Figuras 3 y 4 demuestran la cuantificación convencional de ooquistes.

[0027] Las Figuras 5 y 6 demuestran la cuantificación de ooquistes utilizando la solución de yodo.

DESCRIPCIÓN EN DETALLE DE LA INVENCION

[0028] La presente descripción tiene como objetivo profundizar en el detalle del concepto inventivo, proporcionar ejemplos que faciliten su comprensión y proporcionar datos técnicos precisos sobre algunas de las formas de realizar el concepto inventivo de la invención. La descripción detallada también tiene como objetivo evitar

la repetición, por parte de terceros, de la extensa experimentación, inversiones financieras, tiempo y actividad intelectual que los inventores/depositantes realizaron para resolver los problemas técnicos ahora resueltos.

[0029] Actualmente, los recuentos de ooquistes se realizan utilizando la cámara de Neubauer para el control de procesos y para la formulación de vacunas contra la coccidiosis. El proceso de fabricación de la vacuna se basa en la recolección de heces de aves infectadas con los ooquistes.

[0030] Debido a la matriz donde se encuentran los ooquistes (heces de ave), se encuentran varias partículas que afectan considerablemente la identificación de los ooquistes, encontrándose principalmente la presencia de almidón. Para mejorar la identificación de ooquistes con respecto a estas partículas, y diferenciar aún más los ooquistes viables de los no viables, se agregó un reactivo que contiene yodo.

[0031] El yodo se une a las moléculas de almidón, causando su coloración oscura, facilitando la diferenciación de las partículas de almidón, que se oscurecen, de los ooquistes que se vuelven translúcidos.

[0032] Con esta técnica también es posible observar que algunos ooquistes se tiñen con una coloración menos intensa que el almidón. También se observa que dichos ooquistes teñidos tienen deformaciones características de los ooquistes no viables.

[0033] Después de varios experimentos y análisis de muestras, se observó que otros ooquistes, a pesar de su apariencia normal, estaban siendo teñidos por el reactivo. Además, mediante la realización de un procedimiento de inactivación forzada de los ooquistes, fue posible evaluar la correlación del porcentaje de pérdida de viabilidad con los ooquistes teñidos. Por lo tanto, fue posible verificar que el método reivindicado es útil para diferenciar los ooquistes de almidón, y también para evaluar la viabilidad de los ooquistes.

[0034] La solución de yodo utilizada para los métodos reivindicados por la presente invención tiene la siguiente formulación:

[0035] - 0.4% a 3% de yodo resublimado;

[0036] - 1,8% a 5% de yoduro de potasio;

[0037] - 70% a 85% de alcohol;

[0038] - 25% a 35% de agua purificada.

[0039] El primer método que utiliza la solución de yodo mencionada anteriormente reivindicada en la presente invención es mediante un procedimiento simple, cuyas etapas se describen a continuación:

[0040] a. Diluir la solución de yodo en agua destilada en una proporción entre 1:0.2 y 1:20 a una temperatura de 15-30° C en el momento de su uso;

[0041] b. Tomar alícuotas de la solución de yodo diluido en tubos;

[0042] c. Mantener la suspensión de *Eimeria* a analizar en el rango de temperatura entre 15°C y 30°C;

[0043] d. Homogeneizar la suspensión de *Eimeria* y transferirla al tubo que contiene la solución de yodo de a);

[0044] e. Opcionalmente, diluya la suspensión de *Eimeria* en diluciones en serie utilizando la solución de yodo cuando sea necesario;

[0045] f. Espere hasta 35 minutos;

[0046] g. Cuantifique la diferencia de ooquistes teñidos y no teñidos en una cámara de conteo de microscopio óptico, como la cámara de Neubauer.

[0047] El segundo método reivindicado en la presente invención tiene lugar mediante las etapas descritas a continuación:

[0048] i) Diluir entre 1:0.1 y 1:10 la solución de yodo en agua destilada refrigerada entre 2 y 8° C en el momento de su uso;

[0049] ii) Alicuotar la solución de yodo diluido en viales adecuados para la dilución en serie;

[0050] iii) Mantener refrigerada la suspensión de *Eimeria* a analizar en un rango de temperatura entre 2 y 8°C;

[0051] iv) Homogeneizar la suspensión de *Eimeria*;

[0052] v) Transferir la suspensión al matraz que contiene la solución de yodo (1:1) y luego proceder a la dilución en serie utilizando la solución de yodo hasta la dilución ideal del estudio;

[0053] vi) Cuantificar en una cámara de microscopio óptico el número de ooquistes de *Eimeria* spp. encontrados.

[0054] El método descrito anteriormente permite la diferenciación de ooquistes de *Eimeria* spp de no ooquistes al facilitar el recuento de ooquistes con presencia de una alta cantidad de almidón en las suspensiones, permitiendo mejoras en el proceso de recuento y reducción de errores analíticos en la diferenciación.

[0055] Ambos métodos anteriores proporcionan información cuantitativa que puede ser útil en las siguientes situaciones:

[0056] Comprobar el estado de los ooquistes a granel (APIs) antes de su formulación, ajustando la fórmula según el % de viabilidad permitiendo la producción de vacunas que tengan los mismos niveles de calidad en varios lotes producidos.

[0057] Defina el tiempo de estabilidad de los API y las vacunas de acuerdo con la temperatura y las condiciones de almacenamiento.

[0058] Compruebe el almacenamiento de los API y las vacunas producidas (que se ven afectadas negativamente por la temperatura de almacenamiento), si estaban a la temperatura ideal o si estaban expuestas a temperaturas fuera de la especificación.

[0059] Control de procesos de fabricación de vacunas de coccidiosis, siendo utilizado para evaluar la pérdida de viabilidad durante el proceso de producción, con el fin de ayudar en la validación de la descontaminación de superficies, materiales y procesos.

[0060] Evaluar las mejoras del proceso productivo debido a la inclusión de soluciones para reducir la pérdida de viabilidad.

[0061] Estimar el nivel de respuesta a la vacuna sin necesidad de pruebas en animales.