República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112016022784-0 B1

(22) Data do Depósito: 02/04/2015

(45) Data de Concessão: 13/12/2022

(54) Título: MÉTODO PARA PURIFICAR OOCISTOS DE COCCÍDEOS

(51) Int.Cl.: C12N 1/02; C12N 1/10.

(30) Prioridade Unionista: 03/04/2014 EP 14163340.4.

(73) Titular(es): INTERVET INTERNATIONAL B.V..

(72) Inventor(es): KOEN GEVERS; THEODORUS PETRUS MARIA SCHETTERS.

(86) Pedido PCT: PCT EP2015057294 de 02/04/2015

(87) Publicação PCT: WO 2015/150512 de 08/10/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/09/2016

(57) Resumo: MÉTODO E SISTEMA APROPRIADO PARA PURIFICAR OOCISTOS DE COCCÍDIOS, E, COMPOSIÇÃO DE OOCISTOS DE COCCÍDIOS PURIFICADOS. A invenção refere-se a um método para purificar oocistos de coccídeos tendo dimensões entre Dmin e Dmax a partir de fezes compreendendo as etapas de coleta das fezes contendo os oocistos de coccídeos de animais hospedeiros, diluindo as fezes em um meio aquoso, de separação de uma fração grosseira compreendendo material particulado macroscópico das fezes diluídas e de coleta de uma fração aquosa contendo os oocistos, distinguido pelo fato de que o método compreende ainda o peneiramento da fração aquosa sobre um primeiro estrado de peneiramento tendo aberturas de malha para permitir a passagem dos oocistos, para obter um filtrado aquoso compreendendo os oocistos e um primeiro resíduo compreendendo partículas maiores do que os oocistos, e peneiramento do filtrado aquoso sobre um segundo estrado de peneiramento tendo aberturas de malha para obstruir a passagem dos oocistos através deste estrado de peneiramento, para obter um segundo resíduo compreendendo os oocistos purificados e um filtrado de resíduos compreendendo partículas menores do que os oocistos. A invenção também se refere a um sistema apropriado para aplicação deste método e aos oocistos obtidos com o mesmo.

MÉTODO PARA PURIFICAR OOCISTOS DE COCCÍDEOS

CAMPO GERAL DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a um método para purificar oocistos de coccídeos, tendo dimensões entre Dmin e Dmax, a partir de fezes, compreendendo as etapas de coleta das fezes contendo os oocistos de coccídeos de animais hospedeiros, diluindo as fezes em um meio aquoso, opcionalmente separando de uma fração grosseira compreendendo material particulado macroscópico a partir das fezes diluídas, e coletando uma fração aquosa (que poderia ser as fezes diluídas no meio aquoso) contendo os oocistos, a fim de recuperar os oocistos dos mesmos. A invenção também se refere a um sistema apropriado para aplicar este método e aos oocistos obtidos com o mesmo.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Coccidiose é uma doença de vários animais, em que a mucosa intestinal é invadida e danificada por um protozoário da subclasse *Coccidia*. Os efeitos econômicos da coccidiose podem ser especialmente graves na indústria avícola onde o alojamento intensivo de aves favorece a propagação da doença. Infecção por protozoários de coccídeos é, em sua maior parte, específica da espécie. Numerosas espécies, no entanto, podem infectar um único hospedeiro. Por exemplo, existem sete espécies de protozoários de coccídeos que infectam galinhas, seis das quais são consideradas moderadas a severamente patogênicas.

[003] O ciclo de vida do parasita coccídeo é complexo. Por exemplo, protozoários dos gêneros Eimeria, Isospora, Cystoisospora ou Cryptosporidium tipicamente requerem apenas um único hospedeiro para completar seu ciclo de vida, embora Cystoisospora possa utilizar um hospedeiro intermediário. Em condições naturais, o ciclo de vida começa com a ingestão de oocistos esporulados do meio ambiente. Oocistos são geralmente de formato ovoide a elipsoide, na faixa de 10-48μm de

comprimento por 10-30μm de largura, e podem conter estruturas especializadas, como capas polares, micropilos, corpos residuais e cristalinos. Quando oocistos esporulados são ingeridos por um animal susceptível, a parede do oocisto esporulado é quebrada para liberar os esporocistos em seu interior. Nas aves domésticas, a liberação do esporocisto é o resultado de ruptura mecânica do oocisto esporulado na moela. Dentro dos esporocistos, estão os esporozoítos que são o estágio infeccioso do organismo. Em aves domésticas, a ruptura do revestimento do esporocisto e a liberação dos esporozoítos são realizadas bioquimicamente através da ação de sais biliares e quimiotripsina no intestino delgado. Uma vez liberados, os esporozoítos invadem a mucosa intestinal ou células epiteliais em outros locais. O sítio de infecção é característico das espécies envolvidas. Por exemplo, no gênero Eimeria, *E. tenella* está localizado no ceco; *E. necatrix* é encontrado nas porções anteriores e do meio do intestino delgado; *E. acervulina* e *E. praecox* ocorrem na metade superior do intestino delgado; *E. brunetti* ocorre no intestino delgado inferior, reto, ceco e cloaca; *E. mitis* é encontrado no intestino delgado inferior, enquanto *E. maxima* pode ser encontrado em qualquer um destes locais fisiológicos.

[004] Uma vez dentro das células dos animais hospedeiros, esporozoítos se desenvolvem em merontes multinucleados, também chamados esquizontes. Cada núcleo do meronte desenvolve-se em um corpo infeccioso chamado um merozoíto que entra em novas células e repete o processo. Depois de um número variável de gerações assexuadas, merozoítos se desenvolvem em microgametócitos ou macrogametas. Microgametócitos se desenvolvem em muitos microgametas que, por sua vez, fertilizam os macrogametas. Um revestimento resistente então se forma em torno dos zigotos resultantes. Os zigotos encistados são chamados oocistos e são lançados não esporulados nas fezes. Aves infectadas podem lançar oocistos nas fezes durante dias ou semanas. Sob condições apropriadas de temperatura

e umidade, os oocistos se tornam infecciosos através do processo de esporulação. Aves susceptíveis então ingerem os oocistos esporulados através de suas atividades normais de ciscar ou busca na terra/lixo e o ciclo se repete sozinho. Ingestão de oocistos esporulados viáveis é o único meio natural de infecção. Infecção com protozoários de coccídeos resulta em imunidade de modo que a incidência da doença diminui ao longo do tempo como membros do bando se tornam imunes. Esta natureza autolimitante de infecções de coccídeos é amplamente conhecida em galinhas e outras aves domésticas. A imunidade conferida, no entanto, é específica da espécie, de modo que a introdução de outra espécie de protozoário coccídeo irá resultar em um novo surto da doença.

[005] A parede do oocisto de protozoários coccídeos fornece uma barreira altamente eficaz para a sobrevivência de oocistos. Oocistos podem sobreviver por muitas semanas fora do hospedeiro. No laboratório, oocistos intactos são resistentes a extremos em pH, detergentes, enzimas proteolíticas, glicolíticas e lipolíticas, ruptura mecânica e produtos químicos como o hipoclorito de sódio e dicromato.

[006] Dois métodos são atualmente usados para controlar coccidiose em aves domésticas. O primeiro envolve o controle por quimioterapia. Numerosas drogas estão disponíveis para o controle da coccidiose em aves domésticas. Devido ao número de espécies que causam a doença, poucas drogas são eficazes contra todas as espécies, embora uma única droga possa ser eficaz contra várias espécies. Na produção moderna de frangos de corte, por exemplo, administração de drogas para controlar a coccidiose é uma rotina. A despesa com medicação preventiva contra coccidiose representa um custo significante de produção.

[007] Vacinação de aves contra a coccidiose é uma alternativa à quimioterapia. Uma vantagem de vacinação é que ela pode reduzir de modo significativo ou eliminar a necessidade de administrar drogas anticoccídeos,

reduzindo, assim, os custos com drogas para os produtores avícolas, evitando o desenvolvimento de cepas resistentes a drogas, e diminuindo a preocupação de consumidores com relação aos resíduos de drogas. Numerosos métodos têm sido desenvolvidos para imunizar aves domésticas contra protozoários coccídeos. Os métodos de sucesso foram todos baseados na administração de protozoários vivos, quer cepas totalmente virulentas ou cepas atenuadas. A via mais comum de administração é oral, embora tenham sido usadas outras vias. Tipicamente, galinhas são vacinadas por administração oral, quer diretamente na boca ou através da ração ou água de oocistos esporulados viáveis.

[008] Independentemente da via de administração, procedimentos para a produção de vacinas para coccidiose são bem similares. Brevemente, protozoários coccídeos são produzidos por infecção de animais hospedeiros com uma única espécie de protozoários coccídeos. Estas “cargas de semente” são com frequência de natureza clonal, isto é, derivadas de um único organismo, a fim de assegurar a presença de apenas a espécie de interesse. As cargas de sementes podem ser de tipo selvagem, isto é, isoladas do campo, ou elas podem ser cepas precoces ou atenuadas. Os protozoários são, então, deixados sofrer replicação no hospedeiro, após o que, protozoários são coletados dos animais, geralmente a partir de excreções. O uso de cepas atenuadas tipicamente resulta em menos oocistos lançados do animal hospedeiro. Em uma primeira etapa do processo de purificação, se necessário, uma fração grosseira compreendendo material particulado macroscópico é separada das excreções diluídas. Os protozoários são, então, separados das excreções diluídas através de técnicas bem conhecidas, como a flotação em sal e centrifugação (para garantir que nenhum material particulado, tendo uma densidade que seja maior do que 10% diferente da densidade dos oocistos, seja purificado com os oocistos). No momento da coleta, os protozoários estão no estágio de oocisto não infeccioso do ciclo de vida. A fim de se

tornarem contagiosos, e, portanto, úteis para vacinas, os oocistos devem ser induzidos a sofrer esporulação. Em membros do gênero Eimeria, esporulação tipicamente envolve a incubação dos oocistos em uma solução aquosa a 1% a 4% de dicromato de potássio a 19°C a 37°C, preferivelmente em torno de 28°C, com aeração constante. A esporulação está geralmente completa dentro de 12 a 48 horas, dependendo da temperatura usada. O monitoramento do processo de esporulação é realizado por exame microscópico dos protozoários. Composições de armazenamento encontradas na técnica anterior incluem, tipicamente, uma solução aquosa de dicromato de potássio. Os oocistos esporulados são geralmente armazenados em solução aquosa a 1 a 4% de dicromato de potássio, para impedir crescimento bacteriano, no entanto, outros meios de armazenamento foram usados.

[009] Vacinas atuais disponíveis para a prevenção de coccidiose contêm tipicamente uma solução com 2,5% em peso para volume e contêm aproximadamente 1.600 oocistos por dose (400 oocistos esporulados representando quatro espécies diferentes). Uma desvantagem importante dos métodos atuais para obter oocistos esporulados é que eles dependem tipicamente da flotação em sal e centrifugação para purificação. Isto não é apenas consumidor de muito tempo (em particular, a centrifugação precisa ocorrer em batelada), mas também leva os oocistos a estarem em contato com uma solução de sal concentrada durante muitas horas. A quantidade de água em relação à quantidade de oocistos precisa ser mantida baixa uma vez que, de outro modo, a etapa de centrifugação em batelada estaria longe de ser econômica. O efeito claro de tudo isto, em particular o longo tempo de processo e o contato dos oocistos com sal concentrado, é que até 80% dos oocistos viáveis são perdidos durante este processo de purificação conhecido. Também, os oocistos purificados contêm resíduos dos sais usados para a técnica de flotação, cujo sal é desvantajoso em outras etapas do processo ou que pode mesmo ser incorporado na vacina final e interferir com os

constituintes da vacina ou animal hospedeiro. Além disso, os oocistos se tornam contaminados com os solutos tipicamente usados na técnica de centrifugação para criar um gradiente de densidade. Esta é uma outra desvantagem dos métodos da técnica anterior.

OBJETO DA INVENÇÃO

[0010] É um objeto da presente invenção conceber um método que reduz as desvantagens dos métodos da técnica anterior de purificação de oocistos, em particular conceber um método em que uma grande parte dos oocistos é purificada enquanto ainda sendo viável e capaz de esporular. É também um objeto da invenção conceber um sistema para aplicar esse método e os oocistos purificados com o mesmo, preferivelmente não tendo a desvantagem da presença de sal ou outros resíduos de soluto.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0011] A fim de atender ao primeiro objeto da presente invenção, um método de acordo com o CAMPO GERAL DA INVENÇÃO foi previsto, em que, a fim de recuperar os oocistos a partir da fração aquosa, o método compreende as etapas de peneiramento da fração aquosa sobre um primeiro estrado de peneiramento tendo aberturas de malha para permitir a passagem dos oocistos, para obter um filtrado aquoso compreendendo os oocistos e um primeiro resíduo compreendendo partículas maiores do que os oocistos, e, subsequentemente, peneirar o filtrado aquoso sobre um segundo estrado de peneiramento tendo aberturas de malha para obstruir a passagem dos oocistos através deste estrado de peneiramento, para obter um segundo resíduo compreendendo os oocistos purificados e um filtrado de resíduos compreendendo partículas menores do que os oocistos.

[0012] O Requerente verificou que por aplicação de um processo simples de peneiramento de duas etapas, oocistos podem ser purificados até um nível apropriado a partir da fração aquosa das fezes. Na primeira etapa de peneiramento, as partículas mais grosseiras do que os oocistos (tipicamente

grãos de areia, cascalho e restos de plantas) podem ser removidas, enquanto que, na segunda etapa de peneiramento, as partículas menores do que os oocistos (tipicamente bactérias, vírus, restos digeridos de plantas, grupos de proteínas, gotículas de óleo, etc.) podem ser removidas. Desta forma, pode ser obtida uma fração de oocistos que tem uma carga muito baixa (ou até virtualmente nenhuma) de micróbios contaminantes, enquanto que, usando os métodos de flotação da técnica anterior, a fração de oocistos ainda contém uma carga considerável de micróbios. Peneiramento pode ser aplicado de modo (semi) contínuo e a quantidade de água presente na fração aquosa em relação à quantidade de oocistos não está ligada a qualquer máxima econômica: por fim, a água passa no segundo estrado de peneiramento enquanto os oocistos purificados permanecem como um resíduo de camada fina sobre este estrado. Desta forma, água pode ser eficazmente usada para obter uma boa ação de limpeza e peneiramento.

[0013] Na técnica, peneiramento nunca tinha sido usado, ou mesmo sugerido como um método para purificar oocistos de coccídeos a partir de fezes. Apesar de peneiramento ter sido usado para remover uma fração grosseira das fezes, ele nunca foi usado para obter oocistos purificados. Sem ser limitado pela teoria, parece haver várias razões para isso. Em primeiro lugar, os métodos comuns usados para purificar oocistos são, todos, baseados sobre o uso de densidade particular dos oocistos, uma vez que é entendido que, nas fezes, não estão presentes outras frações principais tendo a mesma densidade (isto é, tendo uma densidade dentro de uma faixa de densidade sendo de, no máximo, 10%, ou mesmo no máximo 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou mesmo tão pouco quanto 1% diferente da densidade dos oocistos) como os oocistos. Assim, tais métodos podem levar a uma composição contendo oocistos apropriadamente puros. Com peneiramento, não se pode discriminar entre partículas tendo densidades diferentes, mas apenas entre partículas tendo diferentes tamanhos (diferentes propriedades de peneiramento). Isto leva,

inerentemente, ao fato de que, com peneiramento, outras partículas na mesma faixa de tamanho como os oocistos, mas tendo outra densidade, são incorporadas como uma contaminação adicional na fração de oocistos. Portanto, espera-se, geralmente, que com o peneiramento, os oocistos não podem ser purificados até um nível apropriado. Também, oocistos não são perfeitamente esféricos, mas geralmente com formato ovoide a elipsoidal. O peneiramento de partículas não esféricas tem o problema inerente de que a ação de peneiramento depende da orientação que as partículas tomam com relação ao estrado de peneiramento. Uma vez que esta orientação não pode ser controlada, peneiramento não é frequentemente considerado como uma opção viável para fracionar precisamente partículas não esféricas. Por último, peneiramento leva, com frequência, a uma elevada carga mecânica sobre as partículas sendo peneiradas, em particular, quando o tamanho da malha está na mesma faixa do tamanho da partícula. Para material biológico, tal carga mecânica elevada é, com frequência, prejudicial para sua viabilidade (confere, o método de prensa francesa comumente usado para matar bactérias). Para surpresa do requerente, nada do apresentado acima impede que o peneiramento seja um bom método para purificar oocistos de coccídeos a partir de fezes e obter uma pureza que seja apropriada para usar os oocistos em uma vacina eficaz.

[0014] Como qualquer versado na técnica do peneiramento sabe, deve-se notar que “tendo aberturas de malha para deixar oocistos passar” não simplesmente equivale a “tendo aberturas de malha maiores do que a maior dimensão dos oocistos”, nem que “tendo aberturas de malha para obstruir a passagem dos oocistos “simplesmente equivale a ter “aberturas de malha menores que a menor dimensão dos oocistos”. Como comumente conhecido, se ou não uma partícula tendo dimensões particulares passa no estrado de peneiramento (assim, se ou não as aberturas da malha deixam as partículas passar) não somente depende das dimensões das partículas com relação ao

tamanho das aberturas, mas também depende do material de fio do estrado de peneiramento, espessura do fio, tipo de malha (tecido, tipo de tecelagem, pulverizado, moído, abladido por laser, perfurado, etc), a forma das aberturas de malha, se ou não o estrado de peneiramento é levado a vibrar, a amplitude de vibração, se ou não fluido adicional é usado para ajudar as partículas a passarem no estrado de peneiramento, o formato de partículas, etc. Por exemplo, um estrado de peneiramento tendo aberturas de malha de 150 µm, sob circunstâncias que o estrado não é levado a vibrar, pode ser capaz de deixar passar apenas partículas tendo um diâmetro inferior a 50 µm (uma vez que tipicamente "pontes" de 2-3 partículas podem se formar em uma abertura de malha). Outras circunstâncias podem também desempenhar um papel. Por exemplo, uma peneira com aberturas de malha de 100 µm pode ser capaz de deixar passar partículas com um limite superior de tamanho de 30 µm, ou, por exemplo, 60 µm ou mesmo por exemplo 99 µm, dependendo da quantidade de lubrificante (tipicamente água) usada e a quantidade de vibração do estrado. Correspondentemente, isto é verdadeiro para a situação em que as aberturas da malha são de tal modo que elas devem obstruir a passagem da partícula. Usando conhecimento geral comum da técnica de peneiramento, o versado na técnica pode prever uma configuração de peneiramento que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

[0015] Outra vantagem da presente invenção é que os oocistos purificados não precisam mais conter (substancialmente) todos os oocistos presentes nas fezes. Com o presente método, pode-se escolher uma faixa de tamanho de oocistos que se deseja purificar. Com os processos da técnica anterior, todos oocistos de uma certa densidade são purificados como uma fração. Com o método atual, é possível, por exemplo, deixar de lado os oocistos menores, ou escolher, por exemplo, apenas a fração que representa determinada espécie de coccídeos (cada espécie tendo faixas de tamanhos típicas para seus oocistos).

[0016] A fim de atender ao segundo objeto da invenção, foi previsto um sistema apropriado para purificar oocistos de coccídeos tendo dimensões entre Dmin e Dmax a partir de fezes ou de uma fração de finos das mesmas, o sistema compreendendo um primeiro estrado de peneiramento de formato sem fim, tendo aberturas de malha apropriadas para deixar os oocistos passar pelo estrado de peneiramento em um filtrado e obstruir as partículas maiores do que os oocistos, meios para carregar automaticamente o filtrado para o interior do segundo estrado de peneiramento de formato sem fim, em que o segundo estrado de peneiramento tem aberturas de malha para obstruir a passagem dos oocistos através deste estrado de peneiramento e deixar passar as partículas menores que os oocistos.

[0017] A fim de atender ao terceiro objeto da invenção, a invenção fornece uma composição de oocistos de coccídeos purificados, obtidos usando o método ou sistema acima descrito, em que a composição contém partículas com dimensões entre Dmin e Dmax e tendo uma densidade diferente da densidade dos oocistos.

DEFINIÇÕES

[0018] Uma composição de oocistos *purificados a partir de fezes* significa que pelo menos 90%, em particular 91, 92, 93, 94, 95% ou mais do material não de oocistos são removidos das fezes em que os oocistos foram excretados.

[0019] *Dmin* de uma partícula é uma dimensão mínima (comprimento, largura ou altura) dessa partícula.

[0020] *Dmax* de uma partícula é a dimensão máxima (comprimento, largura ou altura) dessa partícula.

[0021] Um objeto *macroscópico* é um objeto que pode ser visto a olho nu humano. Tipicamente, isto significa que o objeto tem uma dimensão de, pelo menos, cerca de 0,1 mm.

[0022] Uma *partícula* é um objeto microscópico ou macroscópico

localizado ao qual podem ser atribuídas propriedades físicas, como volume e massa. As partículas típicas presentes em fezes de animais são grãos de areia, partículas de lodo, partículas de argila, restos de plantas (digeridos e não digeridos), gotículas de óleo, bactérias, vírus, areia, pedrinhas etc.

[0023] Uma *abertura de malha* de um estrado de peneiramento é igual ao diâmetro de um círculo imaginário que se encaixa na abertura real no estrado. A abertura da malha é inerentemente “em torno de” um tamanho predeterminado porque uma superfície com múltiplas aberturas de malha não pode ser obtida com exatamente a mesma dimensão para todas as aberturas, e também está sujeita a variações sob carga mecânica (massa sobre o estrado de peneiramento, vibração, etc.). Uma abertura da malha é tipicamente uma média eficaz em torno de um tamanho predeterminado. A este respeito, “em torno do valor de X” para um tamanho de malha significa que, na prática, o tamanho real de uma abertura pode variar entre 0,9 e 1,1 vezes X, em particular entre 0,95 e 1,05 vezes X e, preferivelmente, entre 0,98 e 1,02 vezes X.

[0024] *Automaticamente* significa sem intervenção do operador. Automaticamente não exclui que uma operação é iniciada ou interrompida pelo operador.

MODALIDADES

[0025] Em uma primeira modalidade, o primeiro estrado de peneiramento tem aberturas de malha maiores do que Dmin e até Dmax e o segundo estrado de peneiramento tem aberturas de malha em torno de Dmin. Com relação à segundo estrado de peneiramento, verificou-se que, se as aberturas da malha são em torno de Dmin, que quaisquer oocistos tendo uma dimensão menor do que Dmin são obstruídos na passagem pelo estrado, enquanto que bactérias, vírus, grupos de proteínas e outras partículas tendo uma dimensão típica menor que Dmin podem passar pelo estrado. Desta forma, uma fração de oocistos pode ser obtida, que é virtualmente estéril.

Uma situação crítica pode ser alcançada se a fração aquosa a ser filtrada tiver muitas partículas não de oocistos tendo uma dimensão um pouco abaixo de Dmin, uma vez que tais partículas tipicamente também poderiam ser um pouco obstruídas pelo estrado e poderiam, assim, permanecer como uma contaminação no resíduo de oocistos. No entanto, estas partículas críticas parecem não estar presentes (razoavelmente perceptíveis) nas fezes de animais de várias espécies e, assim, usando um tamanho de malha em torno de Dmin parece ser perfeitamente apropriado para manter os oocistos no resíduo, enquanto as partículas contaminantes menores irão passar este estrado de peneiramento. Com relação à primeiro estrado de peneiramento, é óbvio que as aberturas da malha, preferivelmente, têm pelo menos o tamanho de Dmin. No entanto, o tamanho máximo preferível não é óbvio per se. Um tamanho acima de Dmin, mas substancialmente abaixo de *Dmax,* poderia ser apropriado se, por exemplo, uma quantidade suficiente de água adicional fosse usada para tentar e obter a passagem dos oocistos pelo estrado de peneiramento, a água funcionando como um lubrificante e de rearranjando a orientação dos oocistos (não esféricos) com relação ao estrado. Qualquer tamanho maior das aberturas permitiria uma passagem mais fácil dos oocistos. O Requerente verificou que o tamanho máximo preferido das aberturas do primeiro estrado de peneiramento é em torno de Dmax. Ter aberturas ainda maiores, pode levar a muitas partículas contaminantes passando através do estrado de peneiramento junto com os oocistos.

[0026] Em outra modalidade, o primeiro estrado de peneiramento tem aberturas de malha em torno Dmax e o segundo estrado de peneiramento tem aberturas de malha em torno de Dmin. O Requerente verificou que desta forma uma fração de oocistos apropriadamente purificados pode ser obtida no segundo estrado de peneiramento, apesar do fato de que qualquer partícula contaminante tendo uma faixa de tamanho entre Dmin e Dmax também seria susceptível de ser capturada no resíduo no segundo estrado de peneiramento.

[0027] Em ainda outra modalidade, o primeiro estrado de peneiramento tem aberturas de malha em torno de 50 µm e o segundo estrado de peneiramento tem aberturas de malha em torno de 10 µm. Aberturas de malha destes tamanhos parecem idealmente apropriadas para obter um resíduo de oocistos altamente purificados de qualquer tamanho, mesmo se, por exemplo, os oócitos a serem purificados estiverem em uma faixa de tamanho entre 20-35 µm de comprimento e 20-30 µm de largura. O tamanho das aberturas do primeiro estrado de peneiramento, 50 µm, parece ser apropriado para não deixar entrar qualquer partícula contaminante no lado "grosseiro", enquanto que o tamanho das aberturas do segundo estrado, 10 µm, parece ser apropriado para não deixar entrar qualquer partícula contaminante no lado "fino". Aparentemente, na região de 10 µm a 50 µm, a quantidade de partículas contaminantes é tão baixa que essas partículas não levam a oocistos purificados de modo inadequado.

[0028] Em uma segunda modalidade, o segundo estrado de peneiramento tem o formato de um tambor, o filtrado aquoso é carregado no interior deste tambor e o tambor é girado enquanto peneirando o filtrado aquoso. Nesta modalidade, o resíduo pode se acumular como uma camada fina no interior deste tambor. Isto é vantajoso no processamento posterior dos oocistos. Preferivelmente, o tambor é girado em rpm de modo que a camada passa a uma velocidade de 10 metros/minuto (m/min) até 40 m/min, sendo a velocidade circunferencial do tambor. Abaixo desta velocidade, pode ocorrer que os oocistos na camada, em particular em baixa umidade relativa do meio gasoso no tambor, se tornem muito secos, enquanto acima de 40 m/min, os oocistos podem enfrentar muitas forças mecânicas e se tornarem danificados.

[0029] Em outra modalidade, o primeiro estrado de peneiramento está sob o formato de um tambor, a fração aquosa é carregada no interior deste tambor e o tambor é girado enquanto peneirando a fração aquosa. Nesta modalidade, a fração aquosa pode ser mais ou menos continuamente

adicionada ao primeiro estrado de peneiramento porque ele pode ter uma superfície relativamente elaborada e ser girado continuamente para permitir ao filtrado (contendo os oocistos) passar prontamente pelo estrado de peneiramento.

[0030] Em ainda outra modalidade, durante o peneiramento, meio aquoso adicional é adicionado aos estrados de peneiramento. Esta água adicional pode ser, vantajosamente, como um lubrificante e, opcionalmente, como um meio para rearranjar a orientação que os oocistos têm com relação aos estrados de peneiramento para permitir um peneiramento fácil, mesmo com dimensões das aberturas próximas de Dmin. Em uma outra modalidade, o meio aquoso adicional tem uma temperatura entre 19°C e 37°C. Desta forma, os oocistos já podem iniciar o processo de esporulação enquanto sendo purificados a partir das fezes, usando o processo de peneiramento atual. Isto pode beneficiar o rendimento final do método. Preferivelmente, o meio aquoso adicional tem uma temperatura em torno de 28°C.

[0031] O sistema de acordo com a invenção pode incorporar características para permitir que uma ou mais destas modalidades do método de acordo com a invenção seja aplicada. As reivindicações dependentes de sistema descrevem tais características.

[0032] A invenção será agora explicada em maiores detalhes usando as seguintes figuras e exemplos.

EXEMPLOS

[0033] Figura 1 mostra diagramaticamente um sistema de coleta de oocistos para purificação.

[0034] Figura 2 mostra esquematicamente uma modalidade de um sistema de acordo com a invenção.

[0035] Figura 3 mostra esquematicamente uma modalidade de um estrado de peneiramento para uso em um método ou sistema de acordo com a invenção.

[0036] Figura 4 mostra esquematicamente outra modalidade de um sistema de acordo com a invenção.

[0037] Figura 5 mostra esquematicamente um estrado de peneiramento para uso como um suporte para deixar oocistos purificados esporular.

[0038] Exemplo 1 descreve dados de processo relativos a um método de acordo com a invenção.

Figura 1

[0039] Figura 1 mostra diagramaticamente um sistema para coleta de fezes de animais contendo oocistos de coccídeos de animais hospedeiros, e separação de uma fração grosseira compreendendo material particulado macroscópico das fezes e coleta de uma fração contendo os oocistos para outra purificação. Em geral, vários diferentes métodos de preparação de oocistos para outra purificação são conhecidos na técnica. Qualquer um ou uma combinação de tais métodos pode ser usado antes da purificação adicional. Um método preferido é especificado a seguir.

[0040] Para começar, uma vez que os animais hospedeiros (tipicamente galinhas) começam lançando o organismo, os oocistos podem ser coletados. Mais comumente, os frangos são mantidos em gaiolas (1), e são alimentados com comida sólida (2) e água (3). Fezes 5 são coletadas a partir das gaiolas e uma corrente de resíduos contendo outros materiais (penas, palha, etc.) é descartada. Uma vez coletadas, as fezes são levadas para um tanque de pasta fluida 6 e misturadas com água adicionada (7). O material fecal diluído resultante é fornecido para uma peneira 9 para remoção do material grosseiro nas fezes, como pedras, restos de aparas, cascalho, restos de ração animal, etc. Para isso, a peneira compreende duas peneiras de placa consecutivas, a peneira a montante tendo aberturas de malha de 2 mm, e a peneira a jusante tendo aberturas de malha de 125 µm. Os resíduos resultantes (11) são descartados, e o filtrado é coletado como uma fração aquosa 10

contendo os oocistos.

Figura 2

[0041] A Figura 2 mostra esquematicamente uma modalidade de um sistema 20 de acordo com a invenção. Nesta modalidade o sistema compreende um alojamento do tipo tubo longitudinal 23 tendo dois estrados de peneiramento internos, ou seja, um estrado de peneiramento a montante 21 e um estrado de peneiramento a jusante 22. Nesta modalidade, os estrados de peneiramento são feitos de fios de aço inoxidável tecidos, de acordo com um padrão de tecelagem simples. A fração aquosa 10 (ver Figura 1) é colocada no topo do estrado de peneiramento 21, a fim de peneirar esta fração. Este estrado tem aberturas de malha de tal modo que os oocistos passam para obter um filtrado aquoso 32 compreendendo os oocistos, e um primeiro resíduo 31 compreendendo partículas maiores do que os oocistos. O filtrado aquoso 32 é colocado no topo do segundo estrado de peneiramento 22, cujo estrado de peneiramento tem aberturas de malha para obstruir passagem dos oocistos através deste estrado de peneiramento. Desde modo, é obtido um segundo resíduo 40 compreendendo os oocistos purificados e um filtrado de resíduos 42, compreendendo partículas menores do que os oocistos.

[0042] O tamanho das aberturas de malha deve ser escolhido para coletar de modo eficaz os oocistos do formato desejado. Por exemplo, para coletar oocistos de uma faixa de tamanho entre 15 e 25 µm, o primeiro estrado de peneiramento pode ter aberturas de malha de 25 µm, e o segundo estrado de peneiramento pode ter aberturas de malha de cerca de 14 µm Neste caso, uma vez que as aberturas de malha correspondem quase que exatamente com o tamanho de oocistos, pode ser necessária uma grande quantidade de água adicional (fornecida como uma alimentação separada para o topo do estrado de peneiramento 21) para deixar, realmente, os oocistos passar pelo primeiro estrado de peneiramento. Em outra configuração, por exemplo, para coletar oocistos de uma faixa de tamanho entre 20 e 30 µm, o primeiro

estrado de peneiramento pode ter aberturas de malha de 40 µm, e o segundo estrado de peneiramento pode ter aberturas de malha de cerca de 15 µm. Em ainda outra configuração, por exemplo, para coletar oocistos de uma faixa de tamanho entre 10 e 40 µm, o primeiro estrado de peneiramento pode ter aberturas de malha de 42 µm, e o segundo estrado de peneiramento pode ter aberturas de malha em torno de 10 µm. Em ainda outra modalidade, por exemplo, para coletar oocistos de uma faixa de tamanho entre 12 e 48 µm, o primeiro estrado de peneiramento pode ter aberturas de malha de 50 µm, e o segundo estrado de peneiramento pode ter aberturas de malha em torno de 10 µm.

Figura 3

[0043] Figura 3 mostra esquematicamente uma modalidade de um estrado de peneiramento 21 (aberturas de malha de 50 µm), para uso em um método ou sistema de acordo com a invenção. Nesta modalidade, o estrado de peneiramento é um estrado sem fim no formato de um tambor. O tambor é suportado giratoriamente no eixo geométrico 25 e internamente previsto com um recipiente estacionário 26. Em uso, a fração aquosa é carregada no interior deste tambor, abaixo do recipiente 26, e o tambor é girado enquanto peneirando a fração aquosa. Também, durante esta ação de peneiramento, meio aquoso adicional tendo uma temperatura de cerca de 28°C é adicionado ao interior do tambor 21. O filtrado aquoso é coletado no recipiente 27. Acima do tambor está situada uma fileira de cabeçotes de pulverização 28. Estes cabeçotes podem ser usados para adicionar água no tambor, para servir como um lubrificante enquanto peneirando, ou, depois do peneiramento ter terminado, liberar o resíduo do tambor e coletar o mesmo no recipiente 26. Este recipiente pode ser removido deslizando o mesmo sobre o eixo geométrico 25.

Figura 4

[0044] Figura 4 mostra esquematicamente outra modalidade de um

sistema 20 de acordo com a invenção, em cuja modalidade um processo semicontínuo de aplicação do método de acordo com a invenção pode ser realizado. Este sistema compreende uma peneira giratória 91 (tendo aberturas de malha de 150 µm), que é circundado pelo alojamento 9. Esta peneira e alojamento correspondem ao item 9 na Figura 1. Para esta peneira 91, uma fração aquosa 8, compreendendo fezes diluídas de galinhas (ver Figura 1, embora esta fração seja, opcionalmente, pré-peneirada através de uma peneira de 2 mm), é alimentada para separar a fração grosseira compreendendo material particulado macroscópico das fezes diluídas. A fração aquosa 10 contendo os oocistos é coletada e alimentadas para a peneira girando em forma de tambor 21' (ver também figura 3) como presente no alojamento 23'. Como descrito junto com Figura 3, este estrado de peneiramento tem aberturas de malha de 50 µm e separa a fração aquosa em um filtrado aquoso 11 compreendendo os oocistos e um primeiro resíduo (não mostrado) compreendendo partículas maiores do que os oocistos. Este resíduo pode ser removido como descrito aqui acima. O filtrado aquoso 11 é alimentado para a peneira giratória 22', cuja peneira está alojada no alojamento 23. Esta peneira 22' tem aberturas de malha de 10 µm para obstruir a passagem dos oocistos através deste estrado de peneiramento, de tal modo que um resíduo compreendendo os oocistos purificados é acumulado sobre o lado interno deste estrado de peneiramento em forma de tambor 22'. O filtrado de resíduos 12 compreende partículas menores do que os oocistos, como quaisquer bactérias.

Figura 5

[0045] A Figura 5 mostra esquematicamente um estrado de peneiramento para uso como um suporte para deixar os oocistos purificados esporular. Nesta modalidade, o resíduo 40 é acumulado como uma camada de 2,5 - 3,5 mm no interior de estrado de peneiramento 22 (tendo aberturas de malha de 10 µm). O estrado de peneiramento em formato de tambor 22 é

colocada, parcialmente, em um volume de água (50; mantido a uma temperatura de 28°C) e, parcialmente, no ambiente gasoso 60, de tal modo que cerca de 20% da circunferência total do tambor está abaixo do nível do volume de água. O tambor é montado com o seu eixo geométrico longitudinal 25 se estendendo em paralelo com a superfície deste volume de água. Durante a esporulação, o tambor é girado para manter a camada 40 de modo intermitente no ambiente gasoso contendo oxigênio 60. O tambor é girado a 10-12 rpm através da água 50'. A umidade relativa do meio gasoso dentro do tambor é de 100%. Verificou-se que, deste modo, os oocistos podem esporular (quase sua totalidade) no prazo de 48 horas.

Exemplo 1

[0046] Exemplo 1 descreve dados de processo com relação a um método de acordo com a invenção, usando o sistema da Figura 4. Neste sistema, estrados no formato de tambor pequeno são usados com um comprimento de 40 cm e um diâmetro do tambor de 80 cm (tambores com um comprimento de até 2,80 metros e um diâmetro de até 2,0 metros podem ser usados com vantagem na configuração da Figura 4). Os estrados têm malhas de fios de aço inoxidável tecidos de acordo com uma tecelagem simples, com aberturas de malha, como descrito em conjunto com a Figura 4. Os tambores giram a 10-12 revoluções por minuto.

[0047] As fezes de 60 galinhas *leghorn* brancas (infectadas com Eimeria), com idades entre 26-31 dias, foram coletadas (aproximadamente 25 gramas de fezes por galinha por dia), misturadas com 200 litros de água, e a fração grosseira foi separada usando uma peneira de 2 mm. Aproximadamente 50 litros desta mistura (contendo cerca de 2,25 kg de fezes) foram carregados no sistema, em que durante o peneiramento cerca de 5-10 litros de água por minuto foram adicionados nos estrados de peneiramento 21 e 22. Isto resultou em cerca de 120 gramas de oocistos purificados (uma composição contendo uma quantidade estimada de cerca de

85 gramas de partículas fecais não oocistos, tipicamente grãos de areia fina, partículas de argila e lodo, e cerca de 35 gramas de oocistos) no estrado de peneiramento 22 após 35 minutos de peneiramento, com um rendimento calculado de aproximadamente 81% para *Eimeria acervulina* e cerca de 100% para *Eimeria maxima*. Usando o método tradicional de flotação e centrifugação, que leva cerca de 6 horas, foram obtidos rendimentos típicos de cerca de 50-60% para ambas as espécies.

[0048] Opcionalmente, dependendo da quantidade de contaminação ainda presente, uma etapa de lavagem adicional pode ser realizada misturando o resíduo em uma solução de hipoclorito a 6% (anti-infeccioso) e carregando o mesmo dentro do tambor 22. Água é continuamente adicionada em cerca de 5-10 litros por minutos para remover o hipoclorito e, após 15 minutos, o resíduo está pronto para outro processamento.

[0049] Após esporulação, como descrito em conjunto com Figura 5, taxas de esporulação típicas são de 85% para *Eimeria acervulina* e 90% para *Eimeria maxima* (confere, valores típicos de 40% para um máximo de 80% para o processo tradicional usando dicromato de potássio). Estes oocistos esporulados podem servir como antígeno em uma vacina para a coccidiose como é conhecido na técnica anterior.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para purificar oocistos de coccídeos tendo dimensões entre Dmin e Dmax de fezes, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de coletar as fezes (5) contendo os oocistos de coccídeos de animais hospedeiros, diluindo as fezes em um meio aquoso (7), opcionalmente separando uma fração grosseira (11) compreendendo material particulado macroscópico das fezes diluídas, e coletando uma fração aquosa (10) contendo os oocistos, o método compreendendo ainda

- peneirar a fração aquosa sobre um primeiro estrado de peneiramento (21) tendo aberturas de malha para deixar passar os oocistos, para obter um filtrado aquoso (11, 32) compreendendo os oocistos e um primeiro resíduo (31) compreendendo partículas maiores do que os oocistos,

- peneirar o filtrado aquoso sobre um segundo estrado de peneiramento (22) tendo aberturas de malha para obstruir a passagem dos oocistos através deste estrado de peneiramento, para obter um segundo resíduo (40) compreendendo os oocistos purificados e um filtrado de resíduos (12, 42) compreendendo partículas menores do que os oocistos.

- em que o segundo resíduo é adequado para ser usado em uma vacina.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o primeiro estrado de peneiramento tem aberturas de malha maiores do que Dmin e até Dmax e o segundo estrado de peneiramento tem aberturas de malha em torno de Dmin.

3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o primeiro estrado de peneiramento tem aberturas de malha em torno de Dmax e o segundo estrado de peneiramento tem aberturas de malha em torno de Dmin.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o primeiro estrado de

peneiramento tem aberturas de malha em torno de 50 µm e o segundo estrado de peneiramento tem aberturas de malha em torno de 10 µm.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o segundo estrado de peneiramento está no formato de um tambor, o filtrado aquoso é carregado no interior deste tambor e o tambor é girado enquanto peneirando o filtrado aquoso.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o primeiro estrado de peneiramento está no formato de um tambor, a fração aquosa é carregada no interior deste tambor e o tambor é girado enquanto peneirando o filtrado aquoso.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que, durante o peneiramento, meio aquoso adicional é adicionado aos estrados de peneiramento.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o meio aquoso adicional tem uma temperatura entre 19°C e 37°C.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o meio aquoso adicional tem uma temperatura em torno de 28°C.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a purificação dos oocistos não compreende uma etapa de centrifugação.

11 Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o método ainda compreende esporular o oocisto purificado.

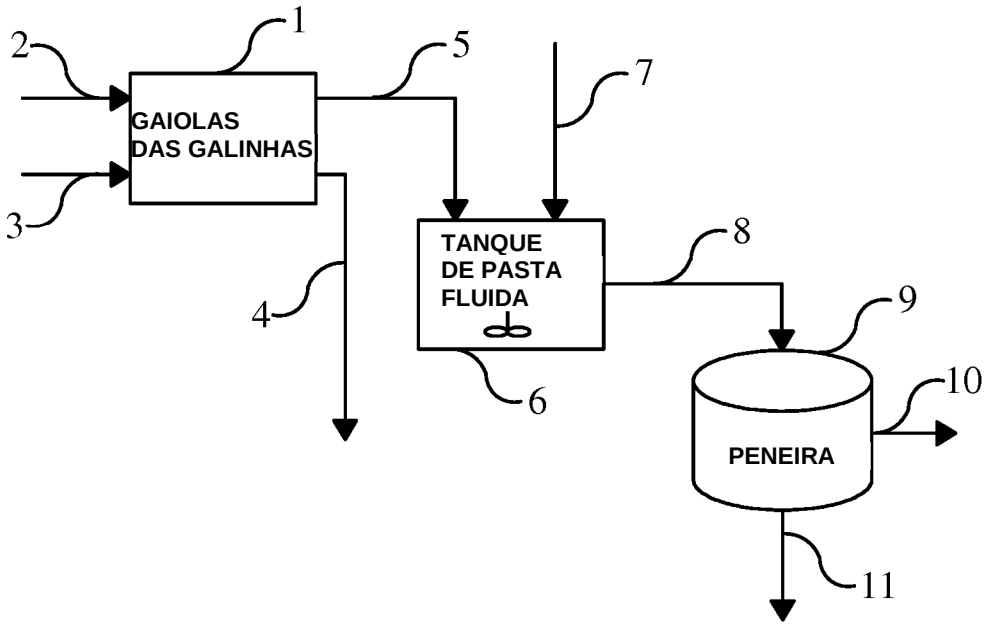

1
2
3
5
7
GAIOLAS
DAS GALINHAS
4
TANQUE
DE PASTA
FLUIDA
8
9
6
10
PENEIRA
11

FIG. 1

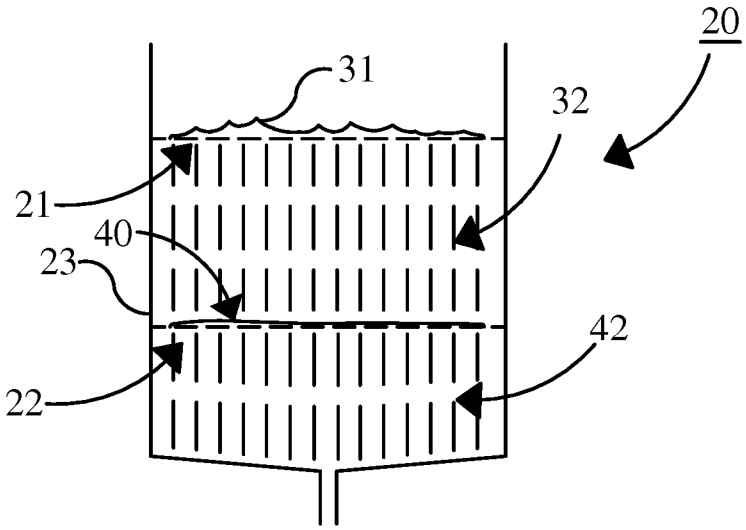


FIG. 2

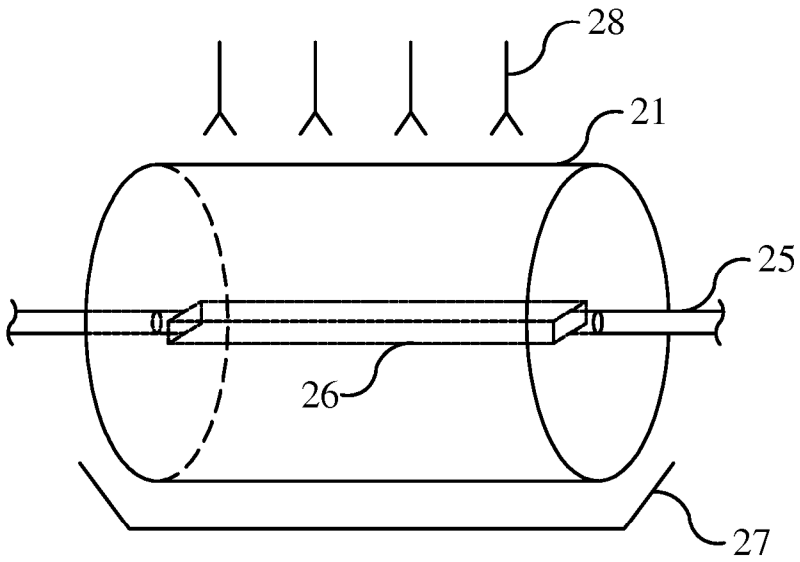


FIG. 3

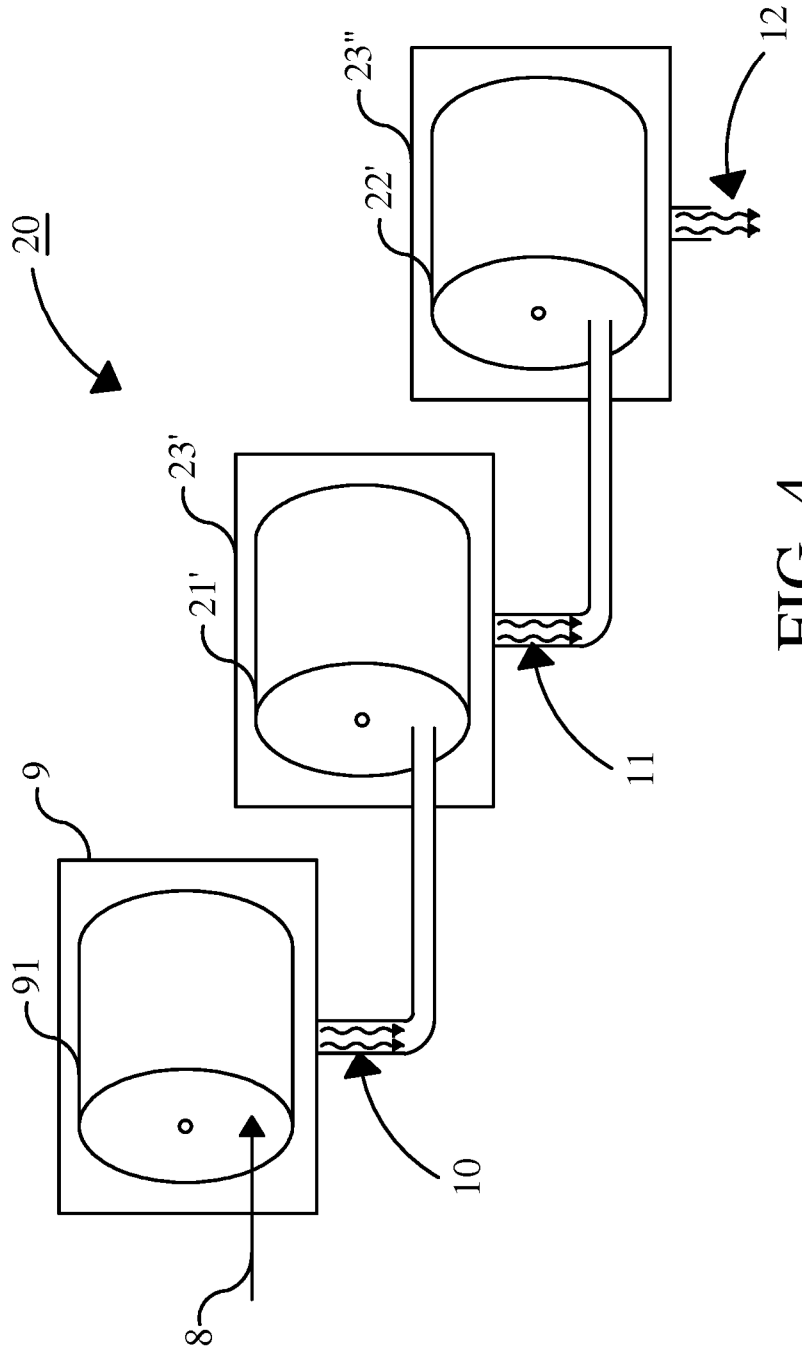


FIG. 4

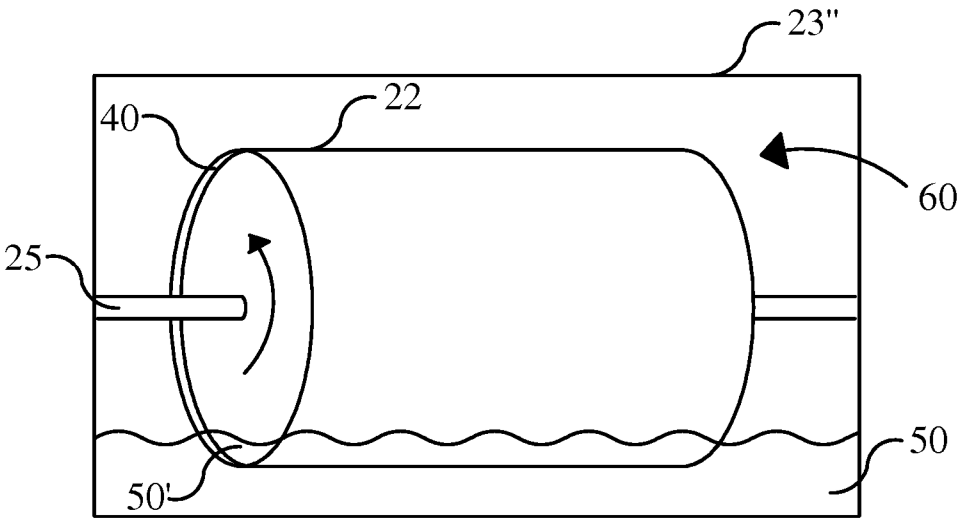


FIG. 5