

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.02.21	(73) Titular(es): WYETH
(30) Prioridade(s): 2002.02.26 US 360088 P	FIVE GIRALDA FARMS, MADISON NEW JERSEY
(43) Data de publicação do pedido: 2004.11.17	07940 US
(45) Data e BPI da concessão: 2008.08.20 224/2008	(72) Inventor(es): FRANS GERRIT DAVELAAR NL
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **SELECÇÃO DAS ESTIRPES EIMERIA DAS AVES DE CAPOEIRA ATRAVÉS DE ESPOROZOITOS EXTRA-INTESTINAIS**

(57) Resumo:

RESUMO**"SELECÇÃO DAS ESTIRPES *EIMERIA* DAS AVES DE CAPOEIRA ATRAVÉS
DE ESPOROZOITOS EXTRA-INTESTINAIS"**

Um método para a obtenção de uma estirpe imunogenética útil para a produção de uma vacina contra a Coccidiose compreendendo o ciclo de infecção de pelo menos um primeiro grupo de aves dadoras livres de um patógeno específico com oócitos de uma espécie *Eimeria*. O sangue é de seguida recolhido destas aves dadoras, e então utilizado para infectar um segundo grupo de aves livres de patógeno específico. Os oócitos são recolhidos do segundo grupo de aves. Estes oócitos são então multiplicados para completar o ciclo. O ciclo é então repetido utilizando os oócitos multiplicados. Após um total de cerca de três ciclos, um imunógeno final pode ser colhido e utilizado como uma fonte para gerar uma vacina contra a Coccidiose.

DESCRIÇÃO

"SELECÇÃO DAS ESTIRPES *EIMERIA* DAS AVES DE CAPOEIRA ATRAVÉS DE ESPOROZOITOS EXTRA-INTESTINAIS"

ÁREA DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se com estirpes recentemente desenvolvidas de espécies *Eimeria* com fortes propriedades imunogenéticas e baixa patogenicidade que são úteis para a produção de oócitos para vacinas anti-coccidia. Adicionalmente, a invenção relaciona-se com novos métodos de obtenção de estirpes atenuadas de espécies *Eimeria* que são úteis na formulação de vacinas contra a coccidiose.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A Coccidiose é uma doença aviária causada por uma infecção com uma ou mais de muitas espécies de coccidia, que são parasitas protozoários intracelulares do sub-filo Apicomplexa e do género *Eimeria*. A Coccidiose é conhecida por ser causada por várias espécies diferentes de *Eimeria*, nomeadamente *Eimeria acervulina*, *E. máxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. mitis*., *E. praecox*, e possivelmente *E. mivati* e *E. hagani*. As espécies diferem no seu efeito patogénico nas aves, com o tipo de aves também a

desempenhar um papel. Logo, uma galinha de aviário irá ser sujeita a muitos danos causados por um parasita tais como *E. Acervulina* uma vez que infecta largas porções do intestino delgado, onde a digestão alimentar representa um maior papel.

Durante o seu ciclo de vida, o parasita *Eimeria* passa através de um número de estágios. O ciclo de vida começa quando a galinha ingere o estágio infeccioso, conhecido como oócito esporulante, durante a alimentação no chão ou por inalação do pó. A parede do oócito esporulado é rompida por acção mecânica na moela e no trato intestinal, resultando numa libertação de quatro esporócitos. Os esporócitos passam para o duodeno onde são expostos à biliar e às enzimas digestivas resultando numa libertação de uma média de dois esporozoitos por esporócito.

Os esporozoitos são móveis e procuram as células epiteliais apropriadas do hospedeiro de modo a penetrar e nelas se reproduzirem. A seguir à infecção de uma célula do epitélio, o parasita entra na fase do esquizonte do seu ciclo de vida, produzindo de 8 a 16 até mais que 200 merozoítos por esquizonte. Uma vez libertado do esquizonte, os merozoítos são livres de infectar mais epitélio. Após desde dois a cinco destes ciclos de reprodução assexuada, os merozoítos intracelulares evoluem para formas sexuais conhecidas como fêmeas ou macrogametócito e macho ou microgametócito. Seguindo-se a fertilização do macrogametócito pelos microgâmetos libertados do microgametócito,

é formado um zigoto que cria uma parede de quisto sobre si próprio. O oócito recentemente formado passa da galinha infectada com os excrementos.

Com as correctas condições ambientais de temperatura e humidade e oxigénio suficiente no ar, o oócito irá esporular no estágio infeccioso, pronto a infectar um novo hospedeiro e assim disseminar a doença. Logo, não é necessário nenhum hospedeiro intermediário para transferir o parasita de ave para ave.

O resultado de um parasita *Eimeria* infectar o trato digestivo de uma ave pode ser a redução no ganho de peso, a diminuição da conversão alimentar, a paragem da produção de ovos e, em alguns casos, a morte. O aumento na produção intensiva de aves de capoeira tem sido acompanhado por diversas perdas devido a este parasita. É estimado que as perdas nos Estados Unidos e na Europa excedam várias centenas de milhões de dólares anualmente.

Diversas tentativas têm sido agora feitas para controlar a Coccidiose. Antes do advento dos agentes quimioterapêuticos, a higiene sanitária melhorada utilizando desinfectantes, em conjunto com a remoção mecânica da cama, eram os principais métodos utilizados. Adicionalmente, a introdução de agentes coccidio-estáticos na alimentação ou na água potável, em conjunto com boas práticas de gestão, resultaram em algum sucesso no controlo da doença. No entanto, verificou-se que tais agentes sofriam de uma

pequena ineficácia ao longo dos anos, devido parcialmente ao desenvolvimento de estirpes de *Coccidia* resistentes aos fármacos. Além disso, verificou-se que diversos agentes quimioterapêuticos deixavam resíduos na carne das aves comerciais, fazendo por isso muitas vezes a sua não adequabilidade para consumo.

Outras tentativas para controlar a doença têm sido realizadas imunologicamente. Estas têm incluído o desenvolvimento de vacinas vivas e a utilização de engenharia genética para formular vacinas. Muitos destes esforços focaram-se na utilização de proteínas *Eimeria* como o princípio activo da vacina. Por exemplo, Tomley *et al* na patente dos E.U. Nº 5885568 e 6001363 propõe uma proteína *Eimeria* com propriedades imunogénicas, bem como sequências de ADN que codificam estas proteínas. Uma abordagem semelhante é apresentada em Kok *et al*, patente dos E.U., 6100241. Uma molécula de ADN contendo uma sequência de ácido nucleico particular é apresentada em Andrews *et al*, patente dos E.U., n.ºs 4874705 e 5187 080, enquanto que Mewman *et al*, a patente dos E.U. n.º 5028694, descreve uma proteína antigénica purificada que é capaz de induzir uma resposta imunitária na galinha contra a *Eimeria necatrix* ou a *Eimeria tenella*. Uma vacina contra a Coccidiose é também descrita em Brown *et al*, na patente dos E.U., n.º 6019985.

O que é necessário agora na técnica é uma nova vacina contra a Coccidiose que seja eficaz, fácil de administrar e de custo eficiente. Também é necessário

estirpes novas e inventivas da espécie *Eimeria* que possam ser utilizadas para desencadear uma resposta imunitária nas aves de capoeira, de modo a proporcionar oócitos apropriados para uma vacina. Adicionalmente é ainda necessário novos métodos de estirpes atenuantes de *Eimeria* de modo a que estas possam ser utilizadas para o desenvolvimento de vacinas. A técnica necessita adicionalmente do desenvolvimento de estirpes de *Eimeria* cujos oócitos, quando incorporados numa vacina, estejam bem protegidos contra uma vasta amostragem de espécies *Eimeria*.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num primeiro objectivo a presente invenção proporciona portanto uma estirpe isolada de um protozoário, em que a referida estirpe foi atenuada para produzir oócitos não-patogénicos que induzam uma resposta imunitária contra a Coccidiose em aves de capoeira.

Verificou-se que as espécies de protozoário que têm um ciclo de vida Coccidial e que portanto geram esporozoitos extra-intestinais são muito apropriadas para a utilização no desenvolvimento de vacinas. Uma primeira forma de realização da invenção relaciona-se portanto com uma estirpe isolada de protozoário, como descrita anteriormente, em que a referida estirpe é uma espécie Coccidial atenuada.

Verificou-se que as espécies do género *Eimeria*

são particularmente vantajosas no desenvolvimento de novas vacinas virais atenuadas contra Coccidiose. Verificou-se surpreendentemente que a espécie *Eimeria* pode ser atenuada pela passagem em série para produzir oócitos não-patogénicos que mantêm uma capacidade de induzir uma resposta imunitária contra a Coccidiose nas aves de capoeira. É portanto um objectivo da invenção proporcionar uma estirpe isolada não-patogénica de uma espécie seleccionada do género *Eimeria*, em que a referida estirpe tenha sido atenuada para produzir oócitos não-patogénicos que induzem uma resposta imunitária contra a Coccidiose nas aves de capoeira.

Em particular, verificou-se que através de passagens sucessivas de uma estirpe de uma espécie *Eimeria* através de pelo menos nove aves livres de patogéneo específico (SPF), pode ser produzida uma estirpe não-patogénica atenuada de *Eimeria* que retenha uma capacidade de induzir uma resposta imunitária que é protectora contra a Coccidiose nas aves de capoeira. Uma forma de realização preferida da invenção relaciona-se portanto com uma estirpe isolada de uma espécie seleccionada do género *Eimeria*, em que a referida estirpe foi atenuada por pelo menos nove passagens em série através de aves SPF, para produzir oócitos não-patogénicos que induzem uma resposta imunitária protectora a Coccidiose nas aves de capoeira.

Uma excessiva passagem em série das espécies *Eimeria* através de aves SPF pode conduzir a uma redução na

capacidade da estirpe atenuada resultante para induzir uma resposta imunitária que seja protectora contra a Coccidiose. Ao desenvolver uma estirpe atenuada com esta finalidade é necessário ponderar entre ser suficientemente não-patogénico enquanto retendo a capacidade da estirpe atenuada induzir uma resposta imunitária que proporciona uma protecção eficaz contra a Coccidiose. O número de passagens em série utilizadas no desenvolvimento de estirpes apropriadamente eficazes é portanto também preferencialmente menos que ou igual a vinte e cinco, mais preferencialmente menos que ou igual a vinte, ainda mais preferido entre nove e quinze passagens em série. Na forma de realização mais preferida, a atenuação apropriada é atingida através da realização de nove a doze passagens em série em aves SPF numa estirpe de uma espécie *Eimeria*.

Para o propósito da presente invenção as estirpes de uma espécie *Eimeria* são preferencialmente seleccionadas do grupo constituído de *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria mitis*, *Eimeria praecox*, *Eimeria mivati*, *Eimeria Hagani*, *Eimeria adenoeides*, *Eimeria gallopavonis*, *Eimeria meleagridis* e *Eimeria meleagrimitis*.

Verificou-se que as estirpes da espécie *Eimeria acervulina* são particularmente bem apropriadas para a atenuação de acordo com a presente invenção especialmente onde a imunidade é requerida nas galinhas. Portanto uma forma de realização particularmente preferida da invenção

relaciona-se com uma estirpe que foi atenuada para produzir oócitos não-patogénicos que induzem uma resposta imunitária contra a Coccidiose, em que a referida estirpe é da espécie *Eimeria acervulina*. Numa forma de realização mais preferida da invenção, é proporcionada uma estirpe de *Eimeria* contendo características imunogenéticas da estirpe *E. acervulina* depositada com a colecção europeia de culturas celulares sob o número de acento 02010911 (também identificada como a estirpe A3C2A2).

Um terceiro objectivo da presente invenção proporciona uma estirpe isolada como descrita anteriormente para utilização na produção de imunidade à Coccidiose nas aves de capoeira.

Um quarto objectivo da invenção proporciona uma vacina às aves de capoeira compreendendo oócitos não-patogénicos de uma estirpe atenuada de uma espécie seleccionada a partir do género *Eimeria* e veículo farmacêuticamente aceitável, em que os referidos oócitos induzem uma resposta imunitária à Coccidiose. Os oócitos para o propósito desta vacina são preferencialmente oócitos extra-intestinais.

Verificou-se também que uma resposta imunitária protectora à Coccidiose pode ser induzida nas aves por inoculação com uma vacina que compreende pelo menos aproximadamente 10^4 oócitos de uma espécie *Eimeria* apropriadamente atenuada por dose. Numa forma de realização

preferida a vacina da presente invenção compreende pelo menos aproximadamente 10_4 oócitos de *Eimeria* por dose, em que a referida *Eimeria* foi atenuada por pelo menos nove passagens em série através de aves SPF. A espécie *Eimeria* para este propósito é preferencialmente *Eimeria acervulina*.

Um quinto objectivo da invenção é proporcionar um processo de preparação de oócitos não-patogénicos de uma espécie *Eimeria*, em que os referidos oócitos são capazes de induzir uma resposta imunitária contra a Coccidiose nas aves de capoeira, o referido processo compreende a atenuação de uma estirpe de uma espécie *Eimeria* através da passagem em série da referida estirpe a pelo menos nove vezes em aves SPF. Numa forma de realização preferida uma estirpe de uma espécie *Eimeria* é atenuada por um processo que compreende as etapas:

- (i) Inoculação de pelo menos uma ave SPF com oócitos *Eimeria*;
- (ii) Recolha de sangue da ave da etapa (i);
- (iii) Inoculação de pelo menos uma segunda ave SPF com sangue da etapa (ii);
- (iv) Recolha dos oócitos de *Eimeria* da ave da etapa (iii);
- (v) Multiplicação dos oócitos recolhidos na etapa (iv) em pelo menos uma ave SPF adicional e recolha dos seus oócitos;

em que as etapas (i) a (v) representam um ciclo que é repetido pelo menos três vezes e em que os oócitos recolhidos na etapa (v) de cada ciclo são utilizados na inoculação do passo (i) do ciclo seguinte.

Numa forma de realização preferida adicional a estirpe seleccionada para a atenuação pelo processo da invenção é uma estirpe da espécie *Eimeria* acervulina.

É um sexto objectivo da invenção proporcionar oócitos não-patogénicos, obtidos por um processo de acordo com a descrição anterior, em que os referidos oócitos são capazes de induzir uma resposta imunitária à Coccidiose nas aves de capoeira.

É um objectivo final da invenção proporcionar um método de inoculação de aves de capoeira contra a Coccidiose, que compreende a administração às referidas aves de capoeira de pelo menos aproximadamente 10^4 oócitos de *Eimeria* acervulina atenuada, em que a referida *Eimeria* foi atenuada pelo menos com nove passagens em série através de aves SPF.

Os antecedentes e outras características e vantagens da invenção irão ser mais aparentes na descrição pormenorizada das formas de realização preferidas da invenção proporcionadas seguidamente.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

A invenção em todas suas formas de realização daqui em diante descritas é contemplada para utilização com todas as aves de capoeira. Como termo aqui utilizado, "aves de capoeira" devem referir as aves domesticas que servem como uma fonte de ovos ou de carne e devem incluir, sem limitação, espécies comercialmente importantes tais como galinhas, perus, patos, gansos, galinha da Guiné, faisões, pombos, pavões, galinhas pequena e outros semelhantes. Numa forma de realização preferida a expressão "aves de capoeira" deve ser considerada como referir-se a espécies de galinha e peru domésticos, mais preferencialmente a invenção relaciona-se aves de capoeira que são espécies da galinha.

Deve ser reconhecido que todo o oócito de uma estirpe atenuada proporcionada de acordo com a presente invenção não necessita de ser requerido para induzir uma resposta imunitária contra a Coccidiose. A este respeito a invenção relaciona-se portanto com todos os seus organismo (s) ou fragmento(s), incluindo proteína(s), polipéptido(s), ou sequência(s) de amino ácidos, que é/são úteis na indução ou desencadeamento de uma resposta imunitária num animal tal como aves de capoeira.

A expressão "não-patogénico" deve ser interpretada de acordo com o conhecimento da pessoa especialista na técnica que qualquer programa de vacinação pode causar uma

reação adversa numa percentagem pequena das aves inoculadas e mortalidades consequentes em alguns casos. Não-patogénicos devem ser considerados como relacionados com programas de vacinação nos quais estes exemplos podem ocorrer.

O resultado médio da lesão pode ser um indicador particularmente útil da patogenicidade de uma estirpe atenuada de acordo com a presente invenção. Adequadamente isto pode ser conseguido através da monitorização do desenvolvimento de lesões em aves SPF após-inoculação (p. i.). Aos seis dias p.i. as aves são eutanasiadas e autopsiadas. As lesões dos intestinos podem de seguida ser determinadas de acordo com JOHNSON & REID.; "Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor pen experiments with chickens". *Exp. Parasitol.*, 1970, vol. 28, 30-36. Para este propósito da presente invenção uma estirpe atenuada não-patogénica pode ser mais particularmente definida como uma estirpe atenuada que realça um resultado de lesão média de menos de 2,0 para aves de um conjunto que recebeu uma inoculação de 10^4 oócitos atenuados, mais preferencialmente o referido resultado de lesão médio é menor ou igual a 1,8, mais preferencialmente menor ou igual a 1,5.

Para o propósito da presente invenção uma "resposta imunitária" deve ser considerada como referir-se quer a uma resposta celular moderada ou uma resposta humoral que induza um certo nível de imunidade contra a

Coccidiose, de modo a que no caso de um desafio subsequente com uma estirpe protozoária virulenta tenha sido conferido algum grau de protecção nas aves vacinadas contra a morte, doença ou desempenho diminuído. O grau de protecção induzido por inoculação com uma estirpe atenuada da invenção pode ser definida em termos de desenvolvimento de lesão nas aves quando são subsequentemente re-infectadas com a estirpe original ou uma semelhante não atenuada. A este respeito, uma resposta imunitária protectora pode ser definida como uma resposta que na re-infecção com uma dose de 10^4 de oócitos da estirpe original ou semelhante não atenuada resulta num resultado de lesão média menor ou igual a 1,50, mais preferencialmente menor ou igual a 1,00, mais preferencialmente menor ou igual a 0,50, ainda mais preferido menor ou igual a 0,25. De acordo com a metodologia referida anteriormente e numa forma de realização ainda mais preferida irá registar-se um resultado de lesão médio de 0,00 para as estirpes atenuadas capazes de induzir uma maior resposta imunitária protectora contra a Coccidiose em aves de capoeira. "Imunogénico" deve ser interpretado como a capacidade de induzir uma resposta imunitária de acordo com esta definição.

Para o propósito da presente invenção a expressão "inoculação" é considerada como referência a qualquer meio de introdução de agentes de infecção nas aves.

Numa forma de realização, a invenção relaciona-se com um método para a obtenção de uma estirpe imunogénica

apropriada para gerar oócitos para utilização numa vacina contra a Coccidiose. O método envolve pelo menos cerca de três ciclos de uma espécie de *Eimeria* através de espécimes de aves de capoeira dadoras para obter uma estirpe atenuada possuindo um imunogéneo apropriado. Logo, o método pode ser utilizado para atenuar a estirpe de *Eimeria*, de modo a que seja realizado tanto não-patogénico como eficaz para produzir oócitos que produzam uma resposta imunitária no desenvolvimento da vacina.

Num aspecto adicional da invenção existe um método de atenuação de uma ou mais estirpes de *Eimeria*, que compreende a passagem sucessivamente da estirpe através de pelo menos três conjuntos de aves de capoeira livres de um patogéneo específico, em que cada um dos ciclos compreende pelo menos dois conjuntos sucessivos de inoculações. A invenção também proporciona outro método para atenuar a *Eimeria acervulina*, que compreende o ciclo de:

- a) inoculação de pelo menos um primeiro grupo de aves dadoras livres de patogénio específico com oócitos gerados a partir de *E. acervulina* virulenta;
- b) Recolha de sangue deste primeiro grupo de aves dadoras através de sangramento a cerca de 3 a cerca de 6 horas após inoculação;
- c) Inoculação de pelo menos um segundo grupo de aves dadoras livres de patogénio específico com sangue derivado;
- d) Recolha de oócitos do segundo grupo de aves;
- e

- e) multiplicação dos oócitos para conseqüentemente completar substancialmente o ciclo; e de seguida repetir o ciclo utilizando os oócitos multiplicados a partir do sub-método e),

até cerca de três ciclos estarem completos.

No primeiro ciclo, o método envolve a inoculação de espécimes de aves de capoeira dadoras livres de patogénico específico (SPF), preferencialmente uma ou mais galinhas dadoras, com uma quantidade de oócitos de uma espécie de *Eimeria*. Preferencialmente, a espécie é uma espécie virulenta de *Eimeria* que produz esporozoítos de circulação em aves de capoeira hospedeiras, e mais preferencialmente *E. acervulina*. A dosagem de exposição por unidade de ave de capoeira, e.g. uma ave, está dentro da gama de aproximadamente 10^6 até aproximadamente 10^8 oócitos, e é preferencialmente aproximadamente 1×10^7 oócitos. Os oócitos são preferencialmente esporulados antes da inoculação utilizando métodos disponíveis na técnica. O número de espécimes de aves de capoeira dadoras pode de algum modo variar, mas está normalmente dentro da gama de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 galinhas, preferencialmente aproximadamente 3 a aproximadamente 12 galinhas, com galinhas após-inoculadas jovens ou pintainhos são preferidos. De seguida, pelo menos alguns dos pintainhos dadores são sangrados, preferencialmente a aproximadamente 3 horas até aproximadamente 6 horas após-inoculação (p.i.), mais preferencialmente a aproximadamente 3 horas p.i.,. O

sangue recolhido destes pintainhos dadores é de seguida utilizado para inocular preferencialmente oralmente, para a goela, outro grupo de espécimes de aves de capoeira SPF. Os oócitos são de seguida recolhidos deste grupo de aves que foi inoculado com as amostras de sangue. Estes oócitos são preferencialmente recolhidos das fezes das aves infectadas. Estes oócitos recolhidos são de seguida multiplicados num conjunto adicional de espécimes de aves de capoeira SPF. (multiplicação, como o termo é utilizado na técnica, aumenta a quantidade e/ou concentração dos oócitos disponíveis). De seguida, as fezes são reunidas destes espécimes infectados e os oócitos são isolados das fezes. Este procedimento deve completar o primeiro ciclo. Estes oócitos, por sua vez, são de seguida preferencialmente utilizado para passagens adicionais do parasita num ciclo subsequente.

Um ciclo deve então compreender os seguintes sub-métodos:

- 1) Inoculação do sangue das aves dadoras com oócitos esporulados;
- 2) Recolha das amostras de sangue das aves dadoras;
- 3) Inoculação de novas aves com o sangue obtido das aves dadoras;
- 4) Recolha dos oócitos das aves inoculadas com as amostras de sangue;
- 5) Multiplicação dos oócitos, e sua recolha, para utilização em ciclos posteriores.

No segundo ciclo, os oócitos encontrados nas fezes após multiplicação e recolha a partir do primeiro ciclo anterior são de seguida utilizados para inocular um conjunto adicional de espécimes de aves de capoeira SPF. Os oócitos são esporulados preferencialmente. Numa forma de realização preferida, o nível da dosagem é maior que para o primeiro ciclo anterior. É portanto pretendido que aproximadamente 1×10^7 até aproximadamente 3×10^7 de oócitos obtidos no primeiro ciclo sejam utilizados para inocular inicialmente as aves dadoras de sangue no segundo ciclo. Preferencialmente, aproximadamente 2×10^7 oócitos por dose são utilizados ou aproximadamente duas vezes o número de oócitos por dose utilizados no primeiro ciclo. Após isto, os sub-métodos 2) até 5) descritos anteriormente são repetidos em espécimes de aves de capoeira SPF no segundo ciclo.

No terceiro ciclo, os oócitos reunidos das fezes dos espécimes das aves de capoeira infectadas seguindo o segundo ciclo são utilizadas para inocular pelo menos um terceiro conjunto de aves de capoeira SPF, para um total de três (3X) ciclos da estirpe particular de *Eimeria*. No início do terceiro ciclo, é pretendido que aproximadamente 1×10^7 até aproximadamente 3×10^7 de oócitos obtidos no segundo ciclo sejam utilizados para inocular inicialmente as aves dadoras de sangue no terceiro ciclo. Preferencialmente, aproximadamente 2×10^7 oócitos por dose são utilizados ou aproximadamente duas vezes o número de oócitos por

dose utilizados no primeiro ciclo. Após isto, os submétodos 2) até 5) descritos anteriormente são de novo repetidos como parte do terceiro ciclo.

Os especialistas na técnica podem contemplar ciclos adicionais de oócitos da estirpe de *Eimeria* através de conjuntos adicionais de aves de capoeira SPF, mas este é menos preferido aqui por razões tanto de custo como de tempo. Os proponentes descobriram que é preferível utilizar um total de cerca de três ciclos como descritos anteriormente. Uma estirpe final de *E. acervulina* é de seguida isolada após o método anterior dos três ciclos, que foi atenuada como resultado disso. A estirpe é obtida de uns ou mais membros de aves inoculados no final do terceiro ciclo. A estirpe é obtida utilizando métodos de isolamento disponíveis na técnica. Esta estirpe pode de seguida ser utilizada como um imunogéneo. A estirpe é inoculada num conjunto adicional de aves de capoeira SPF para gerar oócitos para uma vacina. Os oócitos são preferencialmente obtidos através da sua recolha das fezes das aves de capoeira expostas à estirpe. Eles podem também ser recolhidos a partir do sangue, se pretendido.

Uma estirpe preferida de *E. acervulina* foi agora isolada e identificada como a estirpe A3C2A2. Foi depositada na colecção europeia de culturas de células em Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido, em 19 de Dezembro de 2001 sob o número de acento provisório 02010911 (e está disponível desde daí), e irá funcionar como uma estirpe imunogénica apropriada.

Verificou-se que os oócitos gerados a partir da estirpe de *Eimeria* que foi obtida de acordo com a metodologia aqui descrita produzem elevados graus de imunogenicidade quando incorporados numa vacina. Verificou-se ainda que estes oócitos são também muito menos patogénicos que os gerados a partir da estirpe original (ciclo pré-inoculação) de *Eimeria*. Os oócitos gerados de acordo com o processo aqui descrito são também tipicamente mais elevadamente bem protegidos, o que significa que eles oferecem uma protecção contra uma gama mais vasta de espécie de *Eimeria*. Logo, uma vacina da invenção utilizando oócitos a partir de *Eimeria*, preferencialmente *E. acervulina*, deve preferencialmente proporcionar protecção contra pelo menos três, e preferencialmente pelo menos quatro outras espécies de *Eimeria*, incluindo sem limitação, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix* e *E. brunetti*.

A invenção pretende portanto também cobrir outras estirpes imunogénicas, bem como os seus produtos derivados, e.g. oócitos e vacinas contendo tais oócitos, contendo as características da estirpe de *E. acervulina* e os produtos concomitantes obtidos de acordo com a metodologia aqui descrita.

A vacina final da invenção deve conter pelo menos aproximadamente 10^4 oócitos, preferencialmente oócitos esporulados, por dose de modo a induzir uma resposta imunogénica suficiente num animal. A vacina pode também

conter uma elevada quantidade de oócitos por dosagem, tais como pelo menos aproximadamente 10^5 oócitos por dosagem, e uma gama de aproximadamente 10^4 até aproximadamente 10^6 oócitos por dose é portanto pretendida.

A vacina aqui descrita pode ser administrada oralmente, subcutaneamente, intradermicamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intravenosamente ou intranasalmente, bem como outras vias de administração conhecidas na técnica. Das anteriores, uma via de administração oral é geralmente preferida. Logo, a vacina pode ser administrada a jovens aves de capoeira através da sua água potável, ou através de alimentação maciça, por exemplo. A vacina pode ser dada no ovo, mas é geralmente dada a jovens animais após-ovo, com aqueles que têm desde poucas horas até poucas semanas sendo geralmente os melhores candidatos. Geralmente, uma dose por animal está contemplada, mas os impulsos de continuação estão também dentro do âmbito da invenção.

A vacina da invenção é formulada com um veículo farmacêuticamente aceitável que pode incluir meio aquoso, bem como suspensões ou emulsões e outros semelhantes. O veículo pode também incluir sais, conservantes, tampões de pH, estabilizadores, e emulsificantes disponíveis na técnica. Adicionalmente, a vacina pode também conter um ou mais adjuvantes para melhorar o desempenho ou aumentar a actividade, tal como a resposta imunitária, e pode portanto incluir materiais tais como óleos, dipéptidos muramilo,

hidróxido de alumínio, saponina, polianióes, substâncias anfipáticas e outros semelhantes. Uma quantidade preferida de veículo farmacêuticamente aceitável por dose (incluindo qualquer adjuvante(s)) está portanto dentro da gama de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mL, com aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mL a serem preferidos, e aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 mL a ser ainda mais preferido.

A vacina aqui descrita pode também conter outros agentes imunogénicos de aves de capoeira. Portanto, imunogénicos relacionados com os patogénicos responsáveis por tais doenças como o vírus da doença de Newcastle (NDV), por exemplo, pode também ser formulados como parte da vacina da invenção. Logo, a vacina aqui descrita pode ser monovalente, ou pode também ser di-, tri-, tetra- ou penta-valente, etc.

Os exemplos seguintes são proporcionados para ilustrar diversos aspectos preferidos da invenção, mas não devem constituir-se como limitativos do seu âmbito.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são proporcionados somente por via de ilustração, e não devem constituir-se como limitativos do âmbito da invenção.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Materiais

1.1.1 Pintainhos e criação

Os aviários masculinos Arbor Acres livres de Coccidiose obtidos da exploração comercial Arbor Acres, Putten, Países Baixos, foram colocados em gaiolas em condições isoladas com um dia de idade. Parte dos pintainhos foi utilizada como pintainhos dadores e estes pintainhos dadores foram inoculados com oócitos esporulados *E. acervulina* com 14 dias de idade. Todas as aves dadoras para uma passagem foram colocadas numa gaiola. Os pintainhos dadores foram sangrados, três de cada vez, em 3 ou 6 horas após-inoculação (p.i.), e cada amostra de sangue separada foi utilizada para inocular três outros pintainhos. As aves que receberam o sangue de um pintainho dador foram colocadas numa gaiola. As fezes foram examinados para oócitos e os oócitos das amostras positivas seleccionadas foram utilizados para a próxima passagem. Três ciclos em série foram realizados para obter a estirpe imunogénica final.

Os oócitos das amostras positivas seleccionadas foram multiplicados em quatro pintainhos SPF por amostra antes do ciclo seguinte. Os pintainhos SPF foram obtidos através do serviço de saúde animal, Deventer, Países Baixos, e foram colocados em grupo nos isoladores.

A patogenicidade dos oócitos recolhidos após os ciclos 1 e 3 foi determinada e comparada com a patogenicidade da estirpe original utilizando 10 machos do aviário Arbor Acres livres de Coccidiose por dose e quatro doses por estirpe, 80 aves por ciclo no total. Parte dos pintainhos utilizados para a determinação da patogenicidade dos oócitos recolhidos após o ciclo 3 foram também utilizados para determinar a imunogenicidade destes oócitos após re-inoculação com a estirpe original em comparação com a imunogenicidade da estirpe original. Os pintainhos foram colocados em grupo em gaiolas em condições isoladas.

Todas as aves foram colocadas em instalações animais do serviço de saúde animal, Deventer, Países Baixos, na casa 3 de Het Spelderholt situada em Beekbergen, Países Baixos, e foram alimentados com alimentação sem aditivos anti-coccidiaais.

Primeiro ciclo

Para o ciclo, foram utilizados 26 aviários. Oito pintainhos dadores foram inoculados com oócitos esporulados de *E. acervulina* e seis pintainhos dadores foram sangrados, três de cada vez, a 3 e 6 horas p.i.. Cada uma das seis amostras de sangue em separado foi utilizada para inocular três outros pintainhos e os oócitos foram purificados a partir de duas amostras de fezes positivas e foram

multiplicados em pintainhos SPF. A patogenicidade de um isolado multiplicado foi determinada. Os grupos e número de pintainhos são apresentados seguidamente.

Grupo	N.º pintainhos	Utilização
D	8	Pintainho dador
A1, A2, A3	3 x 3	Pintainhos inoculados com sangue retirado 3 horas p.i.
B1, B2, B3	3 x 3	Pintainhos inoculados com sangue retirado 6 horas p.i.
11, 12	2 x 4	Multiplicação de oócitos de duas amostras positivas (A2 e A3)
Patogenicidade	2 x 40	Patogenicidade do primeiro ciclo e estirpe original

Ciclos Seguintes

Para cada um dos dois ciclos seguintes, utilizou-se 15 aviários. Seis pintainhos dadores foram inoculados com oócitos esporulados de *E. Acervulina* e três pintainhos dadores foram sangrados a 3 horas p.i.. Cada uma das amostras de sangue em separado foi utilizada para inocular três outros pintainhos e os oócitos foram purificados a partir de todas as amostras de fezes positivas e foram multiplicados em pintainhos SPF. A patogenicidade e imunogenicidade de um isolado multiplicado após o ciclo três foi determinada. Os grupos e número de pintainhos são apresentados seguidamente.

Grupo	N.º pintainhos	Utilização
D	6	Pintainho dador
A, B, C	3 x 3	Pintainhos inoculados com sangue retirado 3 horas p.i.
I	2 x 4	Multiplicação (2x) de oócitos de amostras positivas
Patogenicidade	2 x 40	Patogenicidade/imunogenicidade do ciclo 3 e estirpe original

1.1.2. Inoculação

A *E. acervulina* foi originalmente obtida através do laboratório veterinário central, Weybridge, Reino Unido, e passou pelo serviço de saúde animal, Deventer, Países Baixos. Para o primeiro ciclo de esporozoítos extra-intestinais, foi preparada uma suspensão salina contendo 10^7 de oócitos esporulados *E. acervulina* por mL. Para os dois ciclos seguintes, foram preparadas suspensões salinas contendo 2×10^7 de oócitos esporulados de *E. acervulina* por mL obtidos por multiplicação do ciclo anterior.

1.2. Métodos

1.2.1. Inoculações

Os pintainhos dadores foram inoculados oralmente para a goela com 10^7 (1º ciclo) ou 2×10^7 (ciclos seguintes) de oócitos esporulados de *E. acervulina* em 1 mL de solução salina por pintainho aos 14 dias de idade. Os pintainhos foram privados de alimento durante 12 horas antes da inoculação. Parte dos pintainhos dadores foram

sangrados por punção do coração, três de cada vez, em 3 ou 6 horas p.i.. O sangue foi recolhido em tubos heparinizados de 10 mL, contendo 15 IE lítio-heparina por mL de sangue (Sarstedt, Etten-Leur). Os pintainhos foram anestesiados através de injeção intramuscular de xilazina (Rompun, 5 mg/kg de peso corporal) e de cetamina (25 mg/kg de peso corporal), obtidos a partir de AUV, Cuijck, Países Baixos.

Cada amostra de sangue separada foi utilizada para inocular três outros pintainhos oralmente na goela com 3 mL de sangue heparinizada por pintainho com 14 dias de idade. Dez minutos antes da inoculação, as aves receberam oralmente 1 mL de uma suspensão alcalina composta de 10 comprimidos Rennie obtidos através de uma para-farmácia contendo 680 mg de carbonato de cálcio 80 mg de carbonato de magnésio por comprimido, suspensos em 20 mL de água da torneira.

1.2.2. Isolamento dos oócitos

As fezes das aves dadoras restantes e das aves inoculadas com sangue foram recolhidas por gaiola e durante 24 horas aos dias 3 até 6 ou 7 p.i. e contaram-se os oócitos como descrito seguidamente. Os oócitos foram purificados das fezes recolhidas se as contagens de oócito foram positivas utilizando uma técnica de flutuação de sal. Após purificação, os oócitos isolados foram suspensos numa solução de bicromato de potássio 2% (p/v) e as suspensões foram ventiladas por bolhas de ar utilizando técnicas

comuns de aquário durante 48 horas a 29°C para induzir a esporulação dos oócitos. Após isto, os oócitos em suspensão foram contados.

Os oócitos esporulados foram multiplicados em quatro aves SPF por amostra. Aos seis dias da idade, as aves SPF foram inoculadas oralmente na goela com 3 mL de oócitos esporulados obtidos das amostras de fezes. As fezes das aves SPF foram recolhidas por gaiola aos dias 4 até 6 p.i. e os oócitos foram purificados a partir das fezes e contados.

Para multiplicação após o ciclo 1, as aves nos grupos 11 e 12 receberam oócitos isolados das amostras de fezes A2 e A3, contendo 10.000 e 45.000 oócitos no total, respectivamente. Os isolados obtidos após os ciclos seguintes foram multiplicados duas vezes devido ao baixo número de oócitos nos isolados.

1.2.3. Contagem dos oócitos nas fezes

Cerca de 25 excrementos frescos foram recolhidos por gaiola e um máximo de 100 g de fezes foi pesado, suspendeu-se numa solução de cloreto de sódio 10% (p/v) (densidade = 1,1) e misturou-se até ficar homogêneo. Foram misturadas alíquotas de 1 mL de fezes suspensas em 9 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio. Os oócitos foram contados em amostras em triplicado das fezes suspendidas

diluídas utilizando uma câmara de contagem de acordo com Hawkley e foi calculado o número de oócitos por grama de fezes.

1.2.4. Patogenicidade

A patogenicidade dos oócitos após os ciclos 1 e 3 foi determinada e comparada com a patogenicidade da estirpe original utilizando 10 aviários por dose e quatro doses por amostra. As dosagens de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 de oócitos esporulados por ave foram inoculadas oralmente aos 8 dias de idade. Os pintainhos foram colocados em grupo em gaiolas. As fezes foram recolhidas por gaiola aos dias 4 até 6 ou 7 p.i. e foram contados os oócitos nas fezes como descritos anteriormente. Aos 6 dias p.i., as aves foram eutanasiadas por electrocussão. Todas as aves eutanasiadas foram autopsiadas e foram registadas as lesões dos intestinos de acordo com Johnson e Reid (citados anteriormente).

Para a determinação da patogenicidade dos oócitos recolhidos após o ciclo 1, todas as aves foram eutanasiadas 6 dias p.i. e pesadas. Para determinação da patogenicidade de oócitos recolhidos após a passagem 3, cinco aves de cada grupo foram eutanasiadas 6 dias p.i. e as restantes aves foram utilizadas para determinar a imunogenicidade. As fezes foram recolhidas por gaiola de 10 aves por gaiola aos dias 4 até 6 e de 5 aves por gaiola ao dia 7 p.i.

1.2.5. Imunogenicidade

A imunogenicidade dos oócitos recolhidos após o ciclo 3 foi determinada e comparada com a imunogenicidade da estirpe original utilizando cinco aviários de cada grupo utilizado para a determinação da patogenicidade. Todas as aves foram pesadas e re-inoculadas oralmente com 10^5 oócitos esporulados da estirpe original por ave aos 9 dias p.i.. As fezes foram recolhidas por gaiola aos dias 4 até 6 p.i. e foram contados os oócitos nas fezes como descrito anteriormente. Aos 6 dias após a re-inoculação, todas as aves foram eutanasiadas por electrocussão e pesadas. Todas as aves foram autopsiadas e registaram-se as lesões dos intestinos como descrito anteriormente.

2. RESULTADOS

2.1 Isolamento dos oócitos

Primeiro ciclo

Não foram encontrados nenhuns oócitos nas fezes dos pintainhos inoculados aos 3 dias p.i. Foram encontrados oócitos nas fezes das aves inoculadas com o sangue obtido das aves dadoras às 3 horas p.i. em vez de nas fezes das aves inoculadas com o sangue obtido às 6 horas de p.i. Todas as amostras de fezes dos grupos A2 e A3 foram positivas para oócitos aos 5 dias p.i. e os oócitos foram purificados das fezes destes grupos. Após a esporulação, as seguintes amostras foram obtidas:

Grupo	Oócitos/mL	Volume total (mL)
A2	3000	25
A3	15000	25

Os oócitos recolhidos dos grupos A2 e A3 foram multiplicados em aves SPF. Após a multiplicação, os oócitos nas fezes das aves que receberam oócitos isolados do grupo que A2 tinham encolhido e a viabilidade destes oócitos não foi clara. Das aves do grupo 12 que receberam os oócitos isolados do grupo que A3, foram recolhidos 500 mL que continham 290000 oócitos por mL e determinou-se a patogenicidade destes oócitos.

Segundo ciclo

Uma amostra de fezes do grupo C foi positiva para oócitos aos 5 e 6 dias p.i. e os oócitos foram purificados das fezes recolhidas nesses dias. O isolado denominado A3C2 continha um baixo número de oócitos e os oócitos foram multiplicados em aves SPF. Após a multiplicação, 24×10^6 oócitos foram recolhidos e estes oócitos foram multiplicados mais uma vez em aves SPF.

Terceiro ciclo

Uma amostra de fezes do grupo A foi positiva para oócitos aos 5 dias p.i. e os oócitos foram purificados das

fezes. O isolado denominado A3C2A2 continha um baixo número de oócitos e os oócitos foram multiplicados duas vezes em aves SPF. Após a multiplicação, os oócitos foram recolhidos e a patogenicidade e a imunogenicidade destes oócitos foram determinadas.

2.2. Patogenicidade

A patogenicidade dos oócitos recolhidos após os ciclos 1 e 3 foi determinada. Os resultados estão resumidos nas tabelas 1 e 2. Após o ciclo 1, não se evidenciou nenhuma diferença no peso corporal médio, os resultados médios da lesão ou o número de oócitos por grama de fezes foram observados.

Tabela 1. Patogenicidade após o primeiro ciclo

Dose: (oócitos por ave) n=10	Patogenicidade de estirpes de <i>E. acervulina</i>					
	Isolado A3			Estirpe original		
	Peso corporal médio (g)	Resultado médio da lesão	n.º de oócitos por g de fezes (x10 ³) *	Peso corporal médio (g)	Resultado médio da lesão	n.º de oócitos por g de fezes (x10 ³) *
10 ³	428	1,0	480	425	0,9	150
10 ⁴	414	2,1	1400	426	2,2	1500
10 ⁵	391	2,9	2100	378	2,5	1300
10 ⁶	332	3,1	528	350	3,1	920
*: recolhido nos dias 4 até 6						

Após o ciclo 3, os resultados médios da lesão

foram mais baixos com oócitos do ciclo 3 do que com oócitos da estirpe original após dosagens de 10^4 oócitos ou mais por ave. No entanto, nenhuma diferença foi observada com evidência no número de oócitos por grama de fezes comparados com a estirpe original. O número de oócitos estava de acordo com a dose inoculada em ambos os casos. O número de oócitos nas fezes das aves que receberam as dosagens mais elevadas da estirpe isolada indica que estas aves estiveram severamente contaminadas mas que os resultados da lesão não aumentaram com a dose inoculada.

Tabela 2. Patogenicidade após o terceiro ciclo

Dose: (oócitos por ave) n=5	Patogenicidade de estirpes de <i>E. acervulina</i>					
	Isolado A3C2A2			Estirpe original		
	Peso corporal médio (g)	Resultado médio da lesão	n.º de oócitos por g de fezes ($\times 10^3$) *	Peso corporal médio (g)	Resultado médio da lesão	n.º de oócitos por g de fezes ($\times 10^3$) *
10^3	Não realizado	1,0	270	Não realizado	1,2	110
10^4	Não realizado	1,6	710	Não realizado	2,6	1800
10^5	Não realizado	1,0	510	Não realizado	3,2	650
10^6	Não realizado	1,2	960	Não realizado	3,5	910
*: recolhido nos dias 4 até 7						

2.3 Imunogenicidade

A imunogenicidade dos oócitos recolhidos após o ciclo 3 foi determinada. Os resultados estão resumidos na Tabela 3. No grupo inoculado com 10^3 oócitos por ave poucas

lesões foram observadas. Os oócitos foram encontrados igualmente nas fezes deste grupo. Nos grupos inoculados com as dosagens mais elevadas da estirpe isolada, não se observou nenhuma lesão nem nenhum oócito nas fezes. Todos os grupos inoculados com dosagens de 10^4 oócitos ou mais elevadas por ave da estirpe isolada foram protegidos contra re-inoculação com a estirpe original. Estes resultados devem ser comparados com os de controlo (lado direito) que foram re-inoculados com a estirpe original após terem sobrevivido à exposição da estirpe original.

Tabela 3. Imunogenicidade após o terceiro ciclo

Dose: (oócitos por ave) n=5	Imunogenicidade de estirpes de <i>E. acervulina</i> após re-inoculação					
	Isolado A3C2A2			Estirpe original		
	Peso corporal médio (g)*	Resultado médio da lesão	n.º de oócitos por g de fezes ($\times 10^3$)**	Peso corporal médio (g)*	Resultado médio da lesão	n.º de oócitos por g de fezes ($\times 10^3$)**
10^3	356	0,25	260	304	0	169
10^4	323	0	0	314	0	0
10^5	335	0	0	342	0	0
10^6	304	0	0	325	0	0
*: após re-inoculação; **: recolhido nos dias 4 até 6						

3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Após a multiplicação, os oócitos nas fezes das aves que receberam oócitos que foram isolados após o primeiro ciclo do grupo que A2 encolheram e a viabilidade

destes oócitos não foi clara. Isto pode ser devido ao tempo que estes oócitos tiveram expostos à solução de sal saturada durante a purificação. Nenhum desvio dos oócitos foi observado antes da multiplicação.

O primeiro ciclo de oócitos extra-intestinais de *E. acervulina* foi bem sucedido com o grupo A3 mas a reprodutibilidade e a patogenicidade dos oócitos isolados não foram diferentes da estirpe original da *E. acervulina*.

O número de oócitos nas fezes das aves que receberam as dosagens mais elevadas do ciclo 3 da estirpe isolada indicou que estas aves estiveram gravemente contaminadas. No entanto, o resultado da lesão não aumentou com a dose inoculada. Se o resultado da lesão é um bom parâmetro para a patogenicidade da estirpe, então a estirpe isolada A3C2A2 é consideravelmente menos patogênica do que a estirpe original *E. acervulina*.

Após a re-inoculação com a estirpe original, as aves inoculadas com 10^3 oócitos da estirpe isolada A3C2A2 por ave mostraram poucas lesões e foram encontrados oócitos nas fezes deste grupo. As aves inoculadas com dosagens de 10^4 oócitos ou mais elevadas por ave da estirpe isolada A3C2A2 foram protegidos contra a re-inoculação com a estirpe original.

Tabela A1. Oócito nas fezes das aves dadoras e nas aves inoculadas com sangue após o ciclo 1.

grupo	N.º de oócitos por câmara de resultado nas fezes no dia indicado p.i.											
	Dia 3			Dia 4			Dia 5			Dia 6		
D	40	40	40	330	330	330	250	250	250	50	50	50
A1	neg	neg	neg	5	5	5	neg	neg	Pos	neg	neg	pos
A2	neg	neg	neg	pos	pos	Pos	pos	Pos	pos	neg	neg	Pos
A3	neg	neg	neg	Pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	Pos
B1	neg	neg	neg	Neg	1	1	neg	neg	neg	neg	neg	Neg
B2	neg	neg	neg	Pos	pos	pos	Neg	neg	Pos	neg	neg	neg
B3	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg

Tabela A2. Oócito nas fezes das aves dadoras e nas aves inoculadas com sangue após o ciclo 2.

grupo	N.º de oócitos por câmara de resultado nas fezes no dia indicado p.i.											
	Dia 3			Dia 4			Dia 5			Dia 6		
D	neg	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	Pos
A	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg
B	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
C	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	Pos	neg	neg	pos

Tabela A3. Oócito nas fezes das aves dadoras e nas aves inoculadas com sangue após o ciclo 3.

grupo	N.º de oócitos por câmara de resultado nas fezes no dia indicado p.i.												
	Dia 3		Dia 4		Dia 5			Dia 6			Dia 7		
D	Não realizado	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A	Não realizado	neg	neg	neg	neg	neg	Pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
B	Não realizado	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
C	Não realizado	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Tabela A4. Resultados individuais na determinação de patogenicidade após o primeiro ciclo

Cres. p/ ave	Patogenicidade de estirpes de <i>E. acervulina</i>			
	Isolado do grupo A3		Estirpe original	
	Peso corporal (g)	Resultado lesão	Peso corporal (g)	Resultado lesão
10 ³				
1	429	1	432	1
2	413	1	417	1
3	424	1	416	1
4	424	1	411	1
5	450	1	463	1
6	441	1	451	0
7	393	1	385	1
8	432	1	416	1
9	422	1	457	1
10	450	1	406	1
10 ⁴				
1	426	2	424	1
2	448	2	453	2
3	442	2	441	2
4	428	2	413	2
5	456	3	434	3
6	395	3	437	1
7	364	2	407	2
8	360	1	436	3
9	409	2	35	3
10	408	2	461	3
10 ⁵				
1	393	2	397	2
2	388	3	378	2
3	389	3	432	2
4	419	3	393	3
5	410	2	390	2
6	328	3	333	3

(continuação)

Cres. p/ ave	Patogenicidade de estirpes de <i>E. acervulina</i>			
	Isolado do grupo A3		Estirpe original	
	Peso corporal (g)	Resultado lesão	Peso corporal (g)	Resultado lesão
10 ⁵				
7	438	3	379	3
8	354	3	308	3
9	439	4	392	3
10	352	3	378	2
10 ⁶				
1	333	3	420	3
2	348	2	345	3
3	323	3	338	3
4	351	3	336	3
5	355	4	394	3
6	282	3	312	3
7	354	4	271	4
8	346	3	412	3
9	293	3	349	3
10	332	3	326	3

Tabela A5. Resultados individuais na determinação de patogenicidade após o terceiro ciclo

Cres. p/ ave	Patogenicidade de estirpes de <i>E. acervulina</i>			
	Isolado do grupo A3C2A2		Estirpe original	
	Peso corporal (g)	Resultado lesão	Peso corporal (g)	Resultado lesão
10 ³				
1	Não realizado	1,00	Não realizado	1,00
2		1,00		1,00
3		1,00		2,00
4		1,00		1,00
5		1,00		1,00

(continuação)

Cres. p/ ave	Patogenicidade de estirpes de <i>E. acervulina</i>			
	Isolado do grupo A3C2A2		Estirpe original	
	Peso corporal (g)	Resultado lesão	Peso corporal (g)	Resultado lesão
10 ⁴				
1	Não realizado	2,00	Não realizado	4,00
2		2,00		3,00
3		1,00		2,00
4		2,00		2,00
5		1,00		2,00
10 ⁵				
1	Não realizado	1,00	Não realizado	4,00
2		1,00		3,00
3		1,00		4,00
4		1,00		3,00
5		1,00		2,00
10 ⁶				
1	Não realizado	1,00	Não realizado	4,00
2		1,00		4,00
3		1,00		3,00
4		2,00		3,00
5		1,00		Não realizado

Tabela A6. Resultados individuais na determinação de imunogenicidade após o terceiro ciclo

Cres. p/ ave	Imunogenicidade de estirpes de <i>E. acervulina</i>					
	Isolado do grupo A3			Estirpe original		
	Peso corporal (g)		Resultado	Peso corporal (g)		Resultado
	Antes da re- inoculação	6 dias após inoculação		Antes da re- inoculação	6 dias após inoculação	
10 ³						
1	594	912	0,00	644	953	0,00
2	620	1030	0,00	547	832	0,00
3	674	991	1,00	592	847	0,00
4	653	1031	0,00	635	970	0,00
5	não realizado	não realizado	não realizado	533	870	0,00

(continuação)

Imunogenicidade de estirpes de <i>E. acervulina</i>						
p/ ave		Isolado do grupo A3		Estirpe original		
Peso corporal (g)		Resultado lesão	Peso corporal (g)		Resultado lesão	
Antes da re- inoculação	6 dias após inoculação		Antes da re- inoculação	6 dias após inoculação		
10 ⁴						
1	503	839	0,00	555	871	0,00
2	609	953	0,00	610	969	0,00
3	551	859	0,00	579	852	0,00
4	513	798	0,00	624	942	0,00
5	550	890	0,00	480	782	0,00
10 ⁵						
1	588	1013	0,00	580	951	0,00
2	548	919	0,00	584	953	0,00
3	420	696	0,00	557	903	0,00
4	403	670	0,00	539	884	0,00
5	560	897	0,00	498	778	0,00
10 ⁶						
1	482	791	0,00	568	928	0,00
2	470	789	0,00	512	856	0,00
3	495	819	0,00	552	858	0,00
4	498	719	0,00	440	709	0,00
5	471	818	0,00	485	803	0,00

Lisboa, 3 de Novembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparar oócitos não-patogénicos de uma espécie de *Eimeria* capaz de induzir uma resposta imunitária à coccidiose nas aves de capoeira, em que o referido processo compreende a atenuação de uma estirpe de uma espécie de *Eimeria* pela passagem em série da referida estirpe pelo menos nove vezes em aves SPF e em que o referido processo que compreende as etapas:

- (i) Inoculação de pelo menos uma ave SPF com oócitos *Eimeria*;
- (ii) Recolha de sangue da ave da etapa (i);
- (iii) Inoculação de pelo menos uma segunda ave SPF com sangue da etapa (ii);
- (iv) Recolha dos oócitos de *Eimeria* da ave da etapa (iii);
- (v) multiplicação dos oócitos recolhidos na etapa (iv) em pelo menos uma ave SPF adicional e recolha dos seus oócitos;

em que as etapas (i) a (v) representam um ciclo que é repetido pelo menos três vezes e em que os oócitos recolhidos na etapa (v) de cada ciclo são utilizados na inoculação do passo (i) do ciclo seguinte.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida estirpe é seleccionada da espécie de *Eimeria acervulina*.

3. Processo para a preparação de uma vacina compreendendo a preparação de oócitos de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2 e formulação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

4. Estirpe A3C2A2 de *Eimeria acervulina* depositada com a colecção europeia de culturas celulares sob o número de acento 02010911.

5. Utilização de oócitos da estirpe de acordo com a reivindicação 4 no fabrico de uma vacina para a protecção de aves de capoeira contra a Coccidiose.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o método de protecção compreende a administração de pelo menos 10^4 oócitos da reivindicação 4.

Lisboa, 3 de Novembro de 2008

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 5885566 A, Tonley
- US 6001363 A
- US 6100243 A, Kok
- US 4874705 A, Andrews
- US 5187080 A
- US 5028694 A, Mewman
- US 6019985 A, Brown

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- JOHNSON ; REID. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.*, 1970, vol. 28, 30-36