



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

(11) PI 0921843-2 B1



(22) Data do Depósito: 11/11/2009

(45) Data de Concessão: 24/11/2020

(54) Título: COMPOSIÇÃO DE VACINA, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA

(51) Int.Cl.: A61K 39/012; C12Q 1/04; C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 13/11/2008 US 61/114,208.

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

(72) Inventor(es): STEVE HEWART FITZ-COY; GAMINI SAMAN KUMARA WITHANAGE; ALEXANDRIA LOUISE MCGOWAN; STEPHANIE M. COOK.

(86) Pedido PCT: PCT US2009063977 de 11/11/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/056709 de 20/05/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/05/2011

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO DE VACINA, USO DE UMA VACINA, PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, KIT DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR, E, MÉTODOS DE IDENTIFICAR UM ISOLADO DE EIMERIA COMO E. MELEAGRIMITIS 2, MELEAGRIMITIS 2 EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, E AS ESPÉCIES DE EIMERIA PATOGÊNICA NO PERU PRESENTE EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA A presente invenção revela uma vacina que fornece proteção à perus contra coccidiose, e métodos de preparar e usar a vacina sozinha, ou em combinações com outros agentes protetores. Além do mais, a presente invenção revela conjuntos de oligonucleotídeo iniciador para PCR que são usados para identificar as espécies de Eimeria em uma amostra biológica.

COMPOSIÇÃO DE VACINA, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica a prioridade em 35 U.S.C. § 119(e) do pedido provisório US número de série 61/114.208, depositado em 13 de novembro de 2008.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção diz respeito a uma vacina para perus que fornece proteção contra coccidiose. Os métodos de preparar e usar a vacina sozinha, ou em combinações com outros agentes protetores, também são fornecidos. Além do mais, a presente invenção fornece conjuntos de oligonucleotídeo iniciador para PCR que são usados para identificar espécies patogênicas de *Eimeria* em peru.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0003] A coccidiose é uma doença entérica de animais que aflige aves domésticas e gado em todo o mundo. Os negócios que dependem da produção animal encaram frequentemente custos significativos em decorrência da coccidiose, incluindo perdas financeiras em virtude do gado doente, bem como os gastos com os tratamentos profiláticos cujo objetivo é reduzir e/ou prevenir a doença. Tais custos são especialmente relevantes nas indústrias intensivas comerciais e de animal, tal como a indústria de aves, onde o alojamento intensivo de pássaros favorece a dispersão da coccidiose.

[0004] Elementos da subclasse de esporozoários intracelulares obrigatórios, *Coccidia*, são o agente etiológico da coccidiose. Um gênero de *Coccidia*, *Eimeria*, apresenta um impacto significativo na produção animal. Assim como para os gêneros muito relacionados *Isospora*, *Cyclospora* (*Cystoisospora*) e *Cryptosporidium*, *Eimeria* exige apenas um único hospedeiro para completar seu ciclo de vida. Em condições naturais, este ciclo de vida começa com a ingestão de oocistos esporulados a partir do ambiente.

[0005] *Eimeria* são parasitas unicelulares com um ciclo de vida complexo monoxeno, que exibem um alto grau tanto de espécies hospedeiras quanto da especificidade tecidual. Espécies de *Eimeria* incluem aquelas que são observadas em galinhas: *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. mivati*, *E. hageni* e *E. brunetti*, e aquelas observadas em perus: *E. meleagridis* 1 (até o momento conhecida simplesmente como *E. meleagridis*), *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. dispersa*, *E. meleagridis*, *E. innocua* e *E. subrotunda*.

[0006] No campo da coccidiose aviária, o número de pesquisa de *Coccidia* em peru não é amplo em decorrência do número de pesquisa realizada em galinhas. De fato, em todo o mundo, ao passo que existem apenas duas vacinas contra *Coccidia* em peru disponíveis comercialmente (Coccivac-T[®], usada pela primeira vez nos anos 60 e Immucox[®], usada pela primeira vez nos anos 80), existem aproximadamente uma dúzia de vacinas contra *Coccidia* em galinha. Portanto, existe uma necessidade particularmente acentuada de vacinas adicionais e melhores que podem fornecer proteção para perus contra a coccidiose aviária.

[0007] Várias espécies de *Eimeria* podem infectar um único hospedeiro por meio da via oral, via nasal e/ou pela entrada das partículas infecciosas no duto lacrimal. Uma vez ingeridos, os parasitas penetram nas células da mucosa intestinal e passam por estágios assexuais e sexuais do ciclo de vida. O dano intestinal resultante pode levar por fim ao retardo do crescimento (nanismo), menor utilização do alimento, perda de pigmentação e aumento da mortalidade. Além do mais, o dano ao revestimento intestinal pode predispor perus a outros agentes infecciosos.

[0008] Os estágios do ciclo de vida de *Eimeria* são essencialmente os mesmos para todas as espécies *Eimeria*, embora cada espécie apresente um sítio preferido no intestino para o desenvolvimento e o tempo exigido para completar o ciclo de vida varia de espécie para espécie. A infecção começa

com ingestão por um hospedeiro de oocistos esporulados de *Eimeria*. Os oocistos ingeridos liberam então esporocistos no intestino do hospedeiro. Os esporocistos liberam esporozoítas que entram nas células epiteliais intestinais e transformam-se então em trofozoítas. Os trofozoítas, ao contrário, passam por um processo conhecido como merogônia para formar a primeira geração de esquizontes. Em virtude dos esquizontes relativamente grandes, tais como no caso de *E. necatrix* ou *E. tenella*, ou do número excessivo do esquizontes, tal como *E. mivati*, ou dos grandes gamontes como no caso de *E. maxima*, estes são os estágios que causam o principal efeito patogênico da infecção, isto é, o dano tecidual no hospedeiro.

[0009] Os esquizontes de primeira geração maduros produzem vários merozoítas que são liberados e invadem novas células epiteliais, e então crescem e formam os esquizontes da próxima geração. Estas fases assexuais continuam por inúmeras gerações antes do começo da fase sexual. A fase sexual começa quando os esquizontes se desenvolvem nos gamontes; microgamontes e macrogamontes. Os microgamontes desenvolvem-se subsequentemente em microgametas que fertilizam os macrogamontes para produzir progênie de oocisto não esporulado. Os oocistos não esporulados são então liberados no lúmen intestinal e excretados com as fezes do hospedeiro. A conclusão do ciclo de vida endógeno, anunciado pelo aparecimento de oocistos não esporulados nas fezes do hospedeiro, é conhecido como patência.

[0010] A esporulação dos oocistos ocorre fora do hospedeiro, quando as condições ambientais são favoráveis. A ingestão inevitável por um hospedeiro dos oocistos esporulados começa no próximo ciclo de infecção. O período da ingestão pelo hospedeiro dos oocistos esporulados até o aparecimento dos oocistos não esporulados nas fezes é denominado o período pré-patente. O período pré-patente difere entre as várias espécies de *Eimeria*.

[0011] Aves que são repetidamente expostas a infecções por *Eimeria* podem adquirir imunidade à coccidiose. De fato, dependendo da

imunogenicidade de cada espécie de *Eimeria*, a infecção diária de perus com poucos oocistos esporulados pode resultar nos pássaros que adquirem imunidade total após apenas duas infecções repetidas. Conseqüentemente, os protocolos atuais que empregam vacinas com *Eimeria* viva baseiam-se no princípio da imunidade adquirida, isto é, infecções repetidas com um pequeno número de oocistos infectivos.

[0012] A vacinação é realizada em geral no viveiro no dia do nascimento da ave administrando a vacina contra *Eimeria* viva por meio de uma aplicação por aspersão (diretamente nos pássaros). A ingestão dos oocistos esporulados durante o alisamento normal das penas resulta então em uma inoculação oral da vacina. Alternativamente, ou em conjunto, as vacinas podem ser aplicadas em uma data posterior na ração e/ou água. Os oocistos infectivos completam seu ciclo de vida dentro do trato intestinal do pássaro, da maneira descrita anteriormente, culminando com a liberação de uma nova geração de oocistos não esporulados em 5 a 11 dias, dependendo das espécies de *Eimeria*. Os oocistos não esporulados excretados com as fezes se tornam então infectivos, isto é, esporulam fora do hospedeiro, e re-infectam os pássaros por meio da ingestão do hospedeiro. Após dois ou três tais ciclos, os pássaros se tornam imunizados contra as espécies de *Coccidia*, as quais eles foram previamente expostos. Esta imunidade é caracterizada por proteção contra a doença ou agentes infecciosos da maneira determinada por: (i) uma diminuição e/ou ausência de parasitas observados microscopicamente no intestino, (ii) uma redução da mudança dos oocistos, (iii) uma redução das lesões intestinais, (iv) uma redução da doença clínica, (v) uma redução ou prevenção da perda de peso, e/ou (vi) uma redução no enfraquecimento da eficiência da utilização da ração. A imunidade adquirida diminui com o tempo na ausência da exposição subsequente aos oocistos infectivos.

[0013] *Eimeria* tipo selvagem é em geral isolada de epidemias de doença clínica em grupos de aves e pode ser propagada para uso as cepas de

desafio patogênico. As vacinas não atenuadas típicas são compostas de oocistos infectivos a partir de cepas pouco a moderadamente patogênicas de diferentes espécies de *Eimeria* que foram mantidas em laboratório. Estas espécies de *Eimeria* não atenuadas são capazes de causar coccidiose quando ingeridas em números muito elevados. Os comerciantes e usuários da vacina devem ter cuidado para assegurar que a vacinação forneça apenas oocistos infectivos suficientes para obter imunidade, mas não a doença no hospedeiro natural. Após a dose inicial, o processo de vacinação conta apenas com a re-infecção por meio da ingestão do hospedeiro dos oocistos esporulados nos detritos.

[0014] A patogenicidade, patologia e sinais clínicos para coccidiose nos perus podem ser características para cada espécie de *Eimeria*. As espécies de *Eimeria* isoladas em geral de perus comerciais de fazenda são *E. adenoides*, *E. meleagritidis* 1, *E. dispersa*, e *E. gallopavonis*; as quatro espécies de *Coccidia* que, até o momento, foram consideradas patogênicas apenas em espécies de *Eimeria* em peru. *E. adenoides* e *E. gallopavonis* parasitam principalmente o ceco e reto e, em muitos casos, a menor porção do íleo. Ao contrário, *E. dispersa* e *E. meleagritidis* 1 parasitam o intestino delgado com o parasitismo que se aloja principalmente no intestino delgado superior e médio. Mudanças fisiopatológicas, tais como maior perda de água por meio das fezes, maior produção de muco e/ou perda sanguínea em virtude de dano vascular, resultam em menor desempenho, tais como menor taxa de crescimento, de utilização de ração e ainda de mortalidade.

[0015] As epidemias recentes da coccidiose em grupos comerciais de peru demonstram que a existência de métodos controle não pode impedir sozinho as infecções de *Eimeria*. De fato, em vista da necessidade do bom controle dos produtos farmacêuticos e ou vacinas para neutralizar tais infecções por *Eimeria*, permanece uma necessidade de longa data com relação a novas e/ou melhores vacinas que podem proteger melhor perus desta doença

entérica dispendiosa.

[0016] A citação de qualquer referência aqui não pode ser interpretada como uma admissão, de maneira tal que a referência é disponível como "técnica anterior" ao presente pedido.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0017] Dessa maneira, a presente invenção fornece novas composições imunogênicas que compreendem uma ou mais espécies de *Eimeria* que podem ajudar na proteção de perus contra a coccidiose. Em um aspecto da presente invenção, é fornecida uma vacina que compreende *E. meleagriditis* 2 (também referida como *E. edgar*) e *E. meleagriditis* 1. Em uma modalidade particular deste tipo, a vacina compreende adicionalmente uma ou mais espécies adicionais de *Eimeria* selecionadas do grupo que consiste em *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. dispersa*, *E. innocua* e *E. subrotunda*. Em uma modalidade particular, a espécie adicional de *Eimeria* é *E. adenoides*. Em uma outra modalidade, a espécie adicional de *Eimeria* é *E. gallopavonis*. Ainda em uma outra modalidade, a espécie adicional de *Eimeria* é *E. dispersa*. Mesmo em uma outra modalidade, a espécie adicional de *Eimeria* é *E. innocua*. Ainda em uma outra modalidade, a espécie adicional de *Eimeria* é *E. subrotunda*. São também fornecidas vacinas que compreendem qualquer e todas as combinações de tais espécies de *Eimeria*. Além do mais, são fornecidas vacinas que compreendem duas ou mais cepas de duas ou mais de tais espécies individuais. Em uma modalidade deste tipo, a vacina compreende pares de cepas de múltiplas espécies de *Eimeria*, em que múltiplos pares de cepas de espécies únicas de *Eimeria* possuem períodos pré-patentes assíncronos. Em uma modalidade particular deste tipo, todos os pares de cepas de espécie única de *Eimeria* na vacina possuem períodos pré-patentes assíncronos.

[0018] Em um outro aspecto da invenção, são fornecidos métodos de imunizar um peru contra a coccidiose. Em uma tal modalidade, o método de

imunizar um peru contra a coccidiose compreende administrar ao peru uma vacina contra *E. meleagritidis* 2 que compreende uma quantidade imunologicamente efetiva de *E. meleagritidis* 2. Em uma outra modalidade, o método compreende adicionalmente administrar ao peru uma ou mais vacinas adicionais contra uma espécie de *Eimeria* sem ser *E. meleagritidis* 2. Em uma modalidade particular deste tipo, cada vacina adicional compreende uma quantidade imunologicamente efetiva de uma ou mais espécies de *Eimeria* selecionadas do grupo que consiste em *E. meleagritidis* 1, *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. dispersa*, *E. meleagridis*, *E. innocua* e *E. subrotunda*. A administração da vacina contra *E. meleagritidis* 2 e a administração de uma ou mais vacinas adicionais contra uma espécie de *Eimeria*, sem ser *E. meleagritidis* 2, podem ser realizadas em qualquer ordem, incluindo simultaneamente em uma administração multivalente combinada.

[0019] Assim, a presente invenção fornece métodos que compreendem administrar a um peru uma quantidade imunologicamente efetiva de uma ou mais espécies de *Eimeria* no peru em uma vacina da presente invenção. Em uma modalidade particular, uma vacina como esta é administrada por aplicação por aspersão no peru. Em uma outra modalidade, a vacina é administrada na água de beber do peru. Ainda em uma outra modalidade, a vacina é administrada na ração do peru. Mesmo em uma outra modalidade, a vacina é administrada tanto na ração quanto na água de beber do peru. Ainda em uma outra modalidade, a vacina é administrada por aplicação por aspersão no peru, na ração do peru e/ou na água de beber.

[0020] Além do mais, quaisquer das vacinas da presente invenção que compreendam cepas de *Eimeria*, também podem incluir uma ou mais espécies e/ou cepas de *Isospora*, de *Cyclospora* (*Cystoisospora*) e/ou de *Cryptosporidium*. Em uma modalidade particular deste tipo, a(s) cepa(s) das espécies de *Isospora*, de *Cyclospora* (*Cystoisospora*) e/ou de *Cryptosporidium* também pode(m) possuir um período pré-patente

assíncrono.

[0021] A presente invenção fornece adicionalmente métodos de identificar um isolado de *Eimeria*, tal como *E. meleagriditis* 2. Uma tal modalidade compreende comparar a sequência de nucleotídeos da região ITS-1 do genoma do isolado de *Eimeria* com a sequência de nucleotídeos da região ITS-1 em SEQ ID NO: 44. O isolado de *Eimeria* é identificado como *E. meleagriditis* 2 quando a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 do genoma do isolado de *Eimeria* exibe mais de 87 % de homologia com a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 em SEQ ID NO: 44. Em uma modalidade particular deste método, o isolado de *Eimeria* é identificado como *E. meleagriditis* 2 quando a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 do genoma do isolado de *Eimeria* exibe mais de 95 % de homologia com a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 em SEQ ID NO: 44. Em uma outra modalidade deste método, o isolado de *Eimeria* é identificado como um *E. meleagriditis* 2 quando a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 do genoma do isolado de *Eimeria* exibe 100 % de identidade com a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 em SEQ ID NO: 44.

[0022] Em modalidades particulares, a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 de SEQ ID NO: 44 contém entre 394 e 409 nucleotídeos. Em outras tais modalidades, a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 de SEQ ID NO: 44 contém entre 400 e 409 nucleotídeos. Ainda em outras modalidades, a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 de SEQ ID NO: 44 contém entre 395 e 400 nucleotídeos. Mesmo em outras modalidades, a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 de SEQ ID NO: 44 contém entre 394 e 398 nucleotídeos. Ainda em outras modalidades, a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 de SEQ ID NO: 44 contém entre 405 e 409 nucleotídeos. Mesmo em outras modalidades, a sequência completa de

nucleotídeos da região ITS-1 de SEQ ID NO: 44 contém 409 nucleotídeos.

[0023] Em modalidades relacionadas, os métodos compreendem comparar a sequência de ácidos nucleicos da região ITS-1 do genoma de um isolado de *Eimeria* com aquelas identificadas aqui especificamente. Em uma tal modalidade, o método compreende comparar a sequência de ácidos nucleicos da região ITS-1 do genoma de um isolado de *Eimeria* com a sequência de ácidos nucleicos da região ITS-1 em uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, e/ou SEQ ID NO: 43. O isolado de *Eimeria* é identificado como *E. meleagriditis* 2 quando a sequência completa de ácidos nucleicos da região ITS-1 do genoma do isolado de *Eimeria* exibe mais de 87 % de homologia com a sequência completa de ácidos nucleicos da região ITS-1 na sequência ou sequências de nucleotídeos que estão sendo comparadas. Em uma outra tal modalidade, o isolado de *Eimeria* é identificado como *E. meleagriditis* 2 quando a sequência completa de ácidos nucleicos da região ITS-1 do genoma do isolado de *Eimeria* exibe mais de 95 % de homologia com a sequência completa de ácidos nucleicos da região ITS-1, que está na sequência ou sequências de nucleotídeos que estão sendo comparadas. Ainda em uma outra modalidade deste método, o isolado de *Eimeria* é identificado como *E. meleagriditis* 2 quando a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 do genoma do isolado de *Eimeria* exibe 100 % de identidade com a sequência completa de nucleotídeos da região ITS-1 na sequência de nucleotídeos que está sendo comparada. Os alinhamentos da sequência de nucleotídeos podem ser realizados com a metodologia de Clustal W da maneira descrita a seguir.

[0024] A presente invenção também fornece ácidos nucleicos que compreendem respectivamente a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 13, ou SEQ ID NO: 14, ou SEQ ID NO: 15, ou SEQ ID NO: 16, ou SEQ ID NO: 17, ou SEQ ID NO: 18, ou SEQ ID NO: 19, ou SEQ ID NO: 20, ou SEQ ID NO: 21, ou SEQ ID NO: 22, ou SEQ ID NO: 23, ou SEQ ID NO: 24, ou

SEQ ID NO: 25, ou SEQ ID NO: 26, ou SEQ ID NO: 27, ou SEQ ID NO: 28, ou SEQ ID NO: 29, ou SEQ ID NO: 30, ou SEQ ID NO: 31, ou SEQ ID NO: 32, ou SEQ ID NO: 33, ou SEQ ID NO: 34, ou SEQ ID NO: 35, ou SEQ ID NO: 36, ou SEQ ID NO: 37, ou SEQ ID NO: 38, ou SEQ ID NO: 39, ou SEQ ID NO: 40, ou SEQ ID NO: 41, ou SEQ ID NO: 42, ou SEQ ID NO: 43 ou SEQ ID NO: 44. Em uma modalidade particular, um ácido nucléico como este compreende não mais que 800 pares de bases. Em uma outra modalidade, um ácido nucléico como este compreende não mais que 600 pares de bases. Mesmo em uma outra modalidade, um ácido nucléico como este compreende não mais que 500 pares de base. Em uma modalidade relacionada, o ácido nucléico pode compreender adicionalmente uma sequência heteróloga de nucleotídeos.

[0025] A presente invenção fornece adicionalmente ácidos nucléicos que compreendem respectivamente a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 51, ou SEQ ID NO: 52, ou SEQ ID NO: 53, ou SEQ ID NO: 54, ou SEQ ID NO: 55, ou SEQ ID NO: 56, ou SEQ ID NO: 57, ou SEQ ID NO: 58, ou SEQ ID NO: 59, ou SEQ ID NO: 60, ou SEQ ID NO: 61, ou SEQ ID NO: 62, ou SEQ ID NO: 63, ou SEQ ID NO: 64, ou SEQ ID NO: 65, ou SEQ ID NO: 66, ou SEQ ID NO: 67, ou SEQ ID NO: 68, ou SEQ ID NO: 69, ou SEQ ID NO: 70, ou SEQ ID NO: 71, ou SEQ ID NO: 72, ou SEQ ID NO: 73, ou SEQ ID NO: 74, ou SEQ ID NO: 75, ou SEQ ID NO: 76, ou SEQ ID NO: 77, ou SEQ ID NO: 78, ou SEQ ID NO: 79, ou SEQ ID NO: 80 ou SEQ ID NO: 81. Em uma modalidade particular, um ácido nucléico como este compreende não mais que 800 pares de base. Em uma outra modalidade, um ácido nucléico como este compreende não mais que 600 pares de base. Mesmo em uma outra modalidade, um ácido nucléico como este compreende não mais que 500 pares de base. Em uma modalidade relacionada, o ácido nucléico pode compreender adicionalmente uma sequência heteróloga de nucleotídeos.

[0026] A presente invenção também fornece um ácido nucléico que

compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 3. Em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 4. Mesmo em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 5. Ainda em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 6. Mesmo em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 7. Ainda em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 8. Mesmo em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 9. Ainda em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 10. Mesmo em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 11. Ainda em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 12. Mesmo em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 45. Ainda em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 46. Mesmo em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 47. Ainda em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 48. Mesmo em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 49. Ainda em uma outra modalidade, o ácido nucléico compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 50.

[0027] Tais ácidos nucléicos podem ser usados, *inter alia*, como sondas de hibridização ou, alternativamente, como oligonucleotídeos iniciadores em ampliações da reação em cadeia da polimerase (PCR) para sintetizar produtos de PCR que correspondem às porções e/ou todas as regiões de ITS-1 dos respectivos genomas das espécies patogênicas de *Eimeria* em peru, *E.*

adenoides, *E. meleagridis* 1, *E. dispersa*, *E. gallopavonis* e *E. meleagridis* 2, também conhecida aqui como *E. edgari*. Em uma modalidade particular, um ou mais dos ácidos nucléicos anteriormente mencionados compreendem 50 nucleotídeos ou menos. Mesmo em uma outra modalidade, um ou mais dos ácidos nucléicos anteriormente mencionados compreendem 30 nucleotídeos ou menos. Mesmo em uma outra modalidade, um ou mais dos ácidos nucléicos anteriormente mencionados compreendem apenas o número de nucleotídeos incluídos explicitamente na sequência identificada pelo número de identificação da sequência.

[0028] Quaisquer dos ácidos nucléicos da presente invenção também podem incluir uma sequência heteróloga de nucleotídeos. Além do mais, a presente invenção fornece adicionalmente ácidos nucléicos que consistem nas sequências de nucleotídeos que são complementares a quaisquer dos ácidos nucléicos aqui fornecidos.

[0029] A presente invenção fornece adicionalmente pares de oligonucleotídeo iniciador de PCR para amplificar uma região ITS-1 do genoma de uma espécie de *Eimeria* em peru. Em uma tal modalidade, o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR compreende um primeiro oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 3, e um segundo oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 4. Em uma outra modalidade, o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR compreende um primeiro oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 5, e um segundo oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 6. Ainda em uma outra modalidade, o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR compreende um primeiro oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 7, e um segundo oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 8. Mesmo em

uma outra modalidade, o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR compreende um primeiro oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 9, e um segundo oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 10. Ainda em uma outra modalidade, o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR compreende um primeiro oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 11, e um segundo oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 12. Mesmo em uma outra modalidade, o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR compreende um primeiro oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 45, e um segundo oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 46. Ainda em uma outra modalidade, o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR compreende um primeiro oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 47, e um segundo oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 48. Mesmo em uma outra modalidade, o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR compreende um primeiro oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 49, e um segundo oligonucleotídeo iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 50.

[0030] A presente invenção fornece adicionalmente estojos de amplificação de PCR que compreendem um, dois ou mais pares de oligonucleotídeo iniciador de PCR da presente invenção. Tais estojos podem incluir quaisquer tais combinações/permutas. Assim, os estojos alternativos da presente invenção podem compreender um, dois, três, quatro, cinco ou mais de tais pares de oligonucleotídeo iniciador de PCR.

[0031] Por exemplo, em um tal estojo, as respectivas sequências de nucleotídeos do primeiro e segundo oligonucleotídeo iniciador de um par

compreendem SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12. Em um outro estojo, as respectivas sequências de nucleotídeos do primeiro e segundo oligonucleotídeo iniciador de um par compreendem SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, e as respectivas sequências de nucleotídeos do primeiro e segundo oligonucleotídeo iniciador de um outro par compreendem SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12. Ainda em um outro estojo, as respectivas sequências de nucleotídeos do primeiro e segundo oligonucleotídeo iniciador de um par compreendem SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6, e as respectivas sequências de nucleotídeos do primeiro e segundo oligonucleotídeo iniciador de um outro par compreendem SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12.

[0032] Ainda em um outro estojo como este, as respectivas sequências de nucleotídeos do primeiro e segundo oligonucleotídeo iniciador de um par compreendem SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6, as respectivas sequências de nucleotídeos do primeiro e segundo oligonucleotídeo iniciador de um outro par compreendem SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10, e as respectivas sequências de nucleotídeos do primeiro e segundo oligonucleotídeo iniciador ainda de um par adicional compreendem SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12.

[0033] Em uma modalidade particular, o estojo compreende pares de oligonucleotídeo iniciador de PCR que apresentam respectivamente pares de oligonucleotídeo iniciador que compreendem a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10, e SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12. Alternativamente, em certos estojos, SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 46 podem ser substituídos por SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8; e/ou SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48 substituídos por SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6; e/ou SEQ ID NO: 49 e SEQ ID NO: 50 substituídos por SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10.

[0034] Mesmo em uma outra modalidade, um estojo da presente invenção compreende pares de oligonucleotídeo iniciador de PCR que

apresentam respectivamente pares de oligonucleotídeo iniciador que compreendem a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48, e SEQ ID NO: 49 e SEQ ID NO: 50.

[0035] A presente invenção fornece adicionalmente métodos de empregar um ou mais pares de oligonucleotídeos iniciadores de PCR para identificar uma ou mais espécies patogênicas de *Eimeria* em peru em uma amostra biológica. Um método como este pode ser usado para identificar *E. meleagriditis* 2 em uma amostra biológica. Uma modalidade particular deste método compreende determinar ácidos nucleicos contidos em uma amostra biológica e amplificá-los por PCR na presença de um par de oligonucleotídeo iniciador de PCR específico para *E. meleagriditis* 2 em condições que produzirão um produto de PCR quando os ácidos nucleicos de *E. meleagriditis* 2 estiverem contidos na amostra biológica. A síntese do produto de PCR é monitorada e, quando o produto de PCR é deletado, *E. meleagriditis* 2 é identificado como presente na amostra biológica. Em uma modalidade particular deste tipo, as respectivas sequências de nucleotídeos do primeiro e segundo oligonucleotídeo iniciador do par de oligonucleotídeo iniciador de PCR empregado compreendem SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, respectivamente. Ainda em uma outra modalidade, o(s) produto(s) de PCR sintetizado(s) é(são) sequenciado(s), e quando observa-se que apresentam mais de 87 % de homologia com a sequência de nucleotídeos correspondente contida em SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34, 43, e/ou 44, *E. meleagriditis* 2 é identificado como presente na amostra.

[0036] Mesmo em uma outra modalidade, o(s) produto(s) de PCR sintetizado(s) é(são) sequenciado(s) e quando observa-se que apresentam mais de 95 % de homologia com a sequência de nucleotídeos correspondente contida em SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34, 43, e/ou 44, *E. meleagriditis* 2 é identificado como presente na amostra. Ainda em uma outra modalidade, o(s)

produto(s) de PCR sintetizado(s) é(são) sequenciado(s) e quando observa-se que apresentam 100 % de identidade com a sequência de nucleotídeos correspondente contida em SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34, 43, e/ou 44, *E. meleagridis* 2 é identificado como presente na amostra.

[0037] Em uma outra modalidade, um método de identificar *Eimeria* patogênica no peru presente em uma amostra biológica compreende determinar ácidos nucleicos contidos na amostra biológica e amplificar os ácidos nucleicos determinados por PCR na presença de um conjunto completo de oligonucleotídeos iniciadores para as cinco novas espécies patogênicas conhecidas de *Eimeria* em peru, em condições que produzirão o(s) produto(s) correspondente(s) de PCR quando os ácidos nucleicos correspondentes da *Eimeria* patogênica no peru estiverem contidos na amostra biológica. O(s) produto(s) de PCR é(são) monitorado(s), e quando qualquer do(s) produto(s) de PCR é(são) deletado(s) durante o monitoramento, *Eimeria* patogênica no peru é identificada como presente na amostra biológica.

[0038] Em uma modalidade relacionada, um método de identificar as espécies de *Eimeria* patogênica no peru presentes em uma amostra biológica compreende determinar ácidos nucleicos contidos em uma amostra biológica e amplificar os ácidos nucleicos determinados por PCR na presença de um conjunto completo de oligonucleotídeos iniciadores para as espécies patogênicas de *Eimeria* em peru, em condições que produzirão o(s) produto(s) correspondente(s) de PCR quando os ácidos nucleicos correspondentes da *Eimeria* patogênica no peru estiverem contidos na amostra biológica. O(s) produto(s) de PCR é(são) detectado(s) e as espécies da *Eimeria* patogênica no peru são associadas a cada produto de PCR detectado é determinado. A determinação pode identificar assim cada espécie de *Eimeria* patogênica no peru presente na amostra biológica.

[0039] Em modalidades particulares, a(s) sequência(s) de nucleotídeos do(s) produto(s) de PCR produzido(s) é(são) determinada(s). Quando uma

sequência de nucleotídeos como esta apresenta mais de 87 % de homologia com a sequência de nucleotídeos correspondente contida em SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34, 43, e/ou 44, *E. meleagrimitis* 2 é identificado como presente na amostra. De maneira similar, quando a sequência de nucleotídeos de um produto de PCR sintetizado apresenta mais de 90 % de homologia com a sequência de nucleotídeos correspondente contida em SEQ ID NOs: 24, 25, 26, 27, 28, 29 e/ou 30, *E. meleagrimits* 1 é identificado como presente na amostra. Quando a sequência de nucleotídeos de um produto de PCR sintetizado apresenta mais de 90 % de homologia com a sequência de nucleotídeos correspondente contida em SEQ ID NOs: 18, 19, 20, e/ou 21, *E. adenoides* é identificado como presente na amostra. Quando a sequência de nucleotídeos de um produto de PCR sintetizado apresenta mais de 90 % de homologia com a sequência de nucleotídeos correspondente contida em SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17, 36, 39, 40, e/ou 41, *E. gallopavonis* é identificado como presente na amostra. Finalmente, quando a sequência de nucleotídeos de um produto de PCR sintetizado apresenta mais de 90 % de homologia com a sequência de nucleotídeos correspondente contida em SEQ ID NOs: 22, 23, e/ou 42, *E. dispersa* é identificado como presente na amostra. Em modalidades relacionadas, o percentual de homologia exigido pode ser ajustado para mais de 95 %, e ainda para 100 % de identidade para as espécies selecionadas quando desejado.

[0040] Em uma modalidade particular, o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR específico para *E. meleagrimitis* 2 compreende as sequências de nucleotídeos de SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, respectivamente; o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR específico para *E. meleagrimitis* 1 compreende as sequências de nucleotídeos de SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, respectivamente; o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR específico para *E. adenoides* compreende as sequências de nucleotídeos de SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6 respectivamente; o par de

oligonucleotídeo iniciador de PCR específico para *E. gallopavonis* compreende as sequências de nucleotídeos de SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente; e o par de oligonucleotídeo iniciador de PCR específico para *E. dispersa* compreende as sequências de nucleotídeos de SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10, respectivamente.

[0041] Em uma outra modalidade relacionada, um método de identificar as espécies de *Eimeria* patogênica no peru presentes em uma amostra biológica compreende isolar um ou mais isolados de *Eimeria* em peru da amostra biológica e verificar uma ou mais propriedades da *Eimeria* patogênica no peru isolada. Estas propriedades incluem, mas sem limitação, a patologia, a patogenicidade, a imunidade cruzada e/ou a morfometria dos isolados de *Eimeria* em peru. Em uma modalidade particular deste tipo, o método inclui adicionalmente empregar uma ou mais análises genéticas (por exemplo, PCR) junto com a verificação de uma ou mais propriedades da *Eimeria* patogênica no peru. Quando mais de um método de identificar as espécies de *Eimeria* patogênica no peru presentes em uma amostra biológica é realizado, tais métodos pode ser ocorrer em qualquer ordem, incluindo simultaneamente, se viável.

[0042] Estes e outros aspectos da presente invenção serão melhor interpretados por referência à descrição detalhada, figuras e exemplos.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

[0043] A figura 1 mostra lesões espessas típicas observadas com *E. meleagrimitis* 1 ou *E. meleagrimitis* 2 no duodeno.

[0044] A figura 2 mostra lesões espessas típicas observadas com *E. meleagrimitis* 1 ou *E. meleagrimitis* 2 no jejuno. As fezes dos animais infectados são aquosas, mucóides e sanguinolentas. Os parasitas invadem as células epiteliais do duodeno até o reto e ocasionalmente são observados no ceco.

[0045] A figura 3A mostra a localização dos oligonucleotídeos

iniciadores de PCR ITS-1. A figura 3B mostra a localização dos oligonucleotídeos iniciadores internos espécie-específicos.

[0046] A figura 4 mostra uma árvore filogenética construída nos termos da presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0047] Em um aspecto, a presente invenção fornece uma espécie patogênica de *Eimeria* recentemente identificada, que foi denominada *E. meleagritidis* 2 (ou, alternativamente, *E. edgari*). Da maneira aqui fornecida adicionalmente, *E. meleagritidis* 2 foi caracterizada suficientemente para permitir sua identificação inequívoca. Em um aspecto relacionado, a presente invenção fornece novas vacinas que protegem contra estas espécies patogênicas de *Eimeria* recentemente identificadas. Ainda em um outro aspecto, a presente invenção fornece estojos que podem ser usados para identificar e distinguir facilmente as cinco espécies patogênicas de *Eimeria* em peru agora conhecidas.

[0048] *E. meleagritidis* 2 foi isolada de epidemias de coccidiose clínica em operações de peru comercial a partir de vários estados em todos dos Estados Unidos, e de perus selvagens que vivem na região de Delmarva. *E. meleagritidis* 2 (Eme2) afeta a mesma região do intestino assim como *E. meleagritidis* 1, entretanto, Eme2 pode ser diferenciada por morfologia de oocistos, imunidade conferida (estudos de proteção cruzada) e por sequência de DNA.

[0049] Até o momento, não existem vacinas que fornecem proteção tanto contra *E. meleagritidis* 2 quanto contra *E. meleagritidis* 1. Portanto, em um aspecto chave, a presente invenção fornece vacinas que protegem tanto contra *E. meleagritidis* 2 quanto contra *E. meleagritidis* 1. Em uma tal modalidade, a vacina compreende tanto *E. meleagritidis* 2 quanto *E. meleagritidis* 7. Em um aspecto relacionado, são fornecidos métodos de administrar as vacinas da presente invenção.

[0050] Além do mais, a presente invenção fornece análise de sequências da região espaçadora transcrita interna um (ITS-1) localizadas entre os genes de RNA ribossomal 18S e 5,8S no genoma de *Eimeria* para cada uma das espécies patogênicas de *Eimeria*: *E. meleagridis* 1, *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. dispersa*, e *E. meleagridis* 2. Portanto, ainda em um outro aspecto chave, a presente invenção fornece ácidos nucléicos que compreendem sequências de nucleotídeos que identificam exclusivamente estas cinco espécies patogênicas de *Eimeria*.

[0051] A presente invenção fornece adicionalmente estojos diagnósticos e métodos relacionados que empregam conjuntos de oligonucleotídeo iniciador da reação em cadeia da polimerase (PCR) capazes de identificar cada uma destas cinco espécies patogênicas de *Eimeria*. Em uma modalidade particular, tais oligonucleotídeos iniciadores, e/ou conjuntos de oligonucleotídeo iniciador sets e/ou sequências exclusivas de nucleotídeos aqui fornecidos, podem ser usados para distinguir *E. meleagridis*, *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. dispersa*, e/ou *E. meleagridis* 2 umas das outras.

[0052] Não pretende-se de maneira alguma que o uso de termos singulares para conveniência na descrição seja assim limitante. Assim, por exemplo, a referência a uma composição que compreende "uma quantidade" inclui referência a uma ou mais de tais quantidades. Além do mais, a referência a um "oocisto" inclui referência a uma pluralidade de tais oocistos, a menos que de outra forma indicada.

[0053] Todas as sequências de ácidos nucléicos aqui fornecidas, a menos que de outra forma indicada, são escritas 5' a 3'.

[0054] Da maneira aqui usada, os termos a seguir podem ter as definições apresentadas a seguir:

[0055] A palavra "peru", da maneira aqui usada, e a menos que de outra forma indicada, inclui todos os elementos do gênero *Meleagris*, incluindo as

espécies *gallopavo* e *ocellata*. Quase todos os perus pertencem à espécie *gallopavo*.

[0056] O termo "amostra biológica", da maneira aqui usada, é qualquer amostra obtida de um animal, por exemplo, peru, ou dos ambientes do animal (por exemplo, detrito, e/ou área geográfica e/ou campo onde os animais residem) que contêm e/ou são suspeitos de conter *Eimeria*, e/ou ácidos nucléicos de *Eimeria* e/ou derivados destes. Exemplos de amostras biológicas incluem, mas sem limitação: amostras fecais, amostras de detrito e amostras gastrointestinais.

[0057] Da maneira aqui usada, o termo "ácidos nucléicos acessíveis" contido em uma amostra biológica significa assegurar que os ácidos nucléicos da amostra biológica estão disponíveis para funcionar como um molde durante PCR. No caso mais, acessar os ácidos nucléicos implica em colocar uma amostra biológica no tubo de reação de PCR. Entretanto, este termo também pode incluir uma ou mais manipulações de uma amostra biológica, por exemplo, rompimento/lise celular, etapas de purificação, etc., que auxiliam no preparo dos ácidos nucléicos contidos na amostra biológica disponíveis para funcionar como um molde durante PCR.

[0058] O termo "*Eimeria*", da maneira aqui usada, a menos que de outra forma indicada, significa uma ou mais espécies do gênero *Eimeria* que infectam pássaros domésticos. As espécies de *Eimeria* incluem aquelas que são observadas em galinhas e incluem, por exemplo, *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. mivati*, *E. hagani* e *E. brunetti*, e também aquelas que são observadas em perus, incluindo *E. meleagrimitis* 1, *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. dispersa*, *E. meleagridis*, *E. innocua*, e *E. subrotunda*. Da maneira aqui usada, uma "*Eimeria* em peru" refere-se a *Eimeria* que infecta perus. O termo "*Eimeria*" também inclui todas as cepas das espécies anteriormente mencionadas de *Eimeria*, incluindo, mas sem limitação, cepas precoces e cepas atenuadas, que também incluem cepas que

foram irradiadas, ou tratadas de outra maneira, de maneira tal que não consigam completar o desenvolvimento. O termo *Eimeria* inclui adicionalmente quaisquer cepas ou espécies recém descobertas de *Eimeria* que infecta pássaros domésticos da maneira definida anteriormente, tal como *E. meleagritis* 2, da maneira aqui revelada.

[0059] Da maneira aqui usada, o termo "E. MAD" significa uma mistura de *E. meleagritis* 1, *E. adenoides* e *E. dispersa*.

[0060] Da maneira aqui usada, uma cepa "atenuada" de uma espécie de um gênero *Coccidia* (tal como uma "*Eimeria* atenuada") é uma cepa que foi selecionada por sua patogenicidade reduzida no hospedeiro. Uma atenuação como esta pode ser atingida por inúmeros meios, incluindo métodos de passagem seriada (tal como passagem embrionária seriada), mutagênese química ou de irradiação.

[0061] Da maneira aqui usada, uma cepa "precoce" de uma espécie do gênero *Coccidia* (tal como uma "*Eimeria* precoce") é uma cepa que apresenta um menor período pré-patente com relação à cepa não atenuada da mesma espécie. Uma cepa precoce também pode ser uma cepa atenuada.

[0062] Da maneira aqui usada, uma cepa "tipo selvagem" de uma espécie do gênero *Coccidia* (tal como uma "*Eimeria* tipo selvagem") é um isolado de campo que não foi alterado por passagem de atenuação ou qualquer outro tratamento incluindo seleção de: isolamento de oocisto simples, tolerância imune ou outro processo segregativo.

[0063] Da maneira aqui usada, uma cepa "não atenuada" de uma espécie do gênero *Coccidia* (tal como "*Eimeria não atenuada*") é uma cepa que não apresenta nem um menor período pré-patente nem patogenicidade reduzida no hospedeiro com relação à cepa tipo selvagem da mesma espécie, mas foi mantida no laboratório por um período maior.

[0064] Da maneira aqui usada, uma "cepa" de uma espécie do gênero *Coccidia* (por exemplo, uma espécie de *Eimeria*) é uma sub-população das

espécies do gênero *Coccidia* que pode ser diferenciada da população geral destas espécies por uma ou mais das características a seguir: morfometria, patogenicidade, imunogenicidade, período pré-patente, e/ou uma população resultante da expansão de um oocisto simples.

[0065] Da maneira declarada anteriormente, o tempo a partir da ingestão pelo hospedeiro dos oocistos esporulados até o surgimento dos oocistos não esporulados nas fezes é denominado o período pré-patente. O termo "período pré-patente assíncrono" refere-se a períodos pré-patentes de duas ou mais espécies do gênero *Coccidia* e/ou duas ou mais cepas de uma espécie do gênero *Coccidia* que diferem em 10 % ou mais. Em uma modalidade particular, duas ou mais espécies do gênero *Coccidia* e/ou duas ou mais cepas de uma única espécie do gênero *Coccidia* apresentam períodos pré-patentes assíncronos que diferem em 20 % ou mais. Mesmo em uma outra modalidade, duas ou mais espécies do gênero *Coccidia* e/ou duas ou mais cepas de uma única espécie do gênero *Coccidia* apresentam períodos pré-patentes assíncronos que diferem em 25 % ou mais.

[0066] Com relação aos períodos pré-patentes assíncronos para cepas precoces e/ou atenuadas com cepas não atenuadas que diferem em um percentual (%) de tempo, o percentual baseia-se no período de tempo pré-patente da cepa não atenuada. Assim, quando uma cepa não atenuada do gênero *Coccidia* apresenta um período pré-patente de 120 horas e uma cepa precoce da mesma espécie do gênero *Coccidia* apresenta um período pré-patente de 108 horas, as duas cepas apresentam períodos pré-patentes assíncronos que diferem em 10 %.

[0067] Da maneira aqui usada, um "material homólogo" é uma composição e/ou alíquota de: organismos que apresentam propriedades biológicas uniformes, e/ou são derivados de organismos da mesma espécie, e/ou mostram um grau de similaridade de propriedades que indica uma origem comum.

[0068] Da maneira aqui usada, um "material heterólogo" é uma composição e/ou alíquota de: organismos que apresentam diferentes propriedades biológicas, e/ou são derivados de organismos de espécies diferentes, e/ou mostram um grau de dissimilaridade de propriedades que indicam diferentes origens.

[0069] As palavras "oocistos", "merozoítas" e "esporozoítas", da maneira aqui usada, e a menos que de outra forma indicada, significam oocistos, merozoítas e esporozoítas de *Eimeria* em peru que podem ser tanto mortas, atenuadas quanto não atenuadas.

[0070] A palavra "esporocisto" refere-se à cápsula que retém os esporozoítas no oocisto.

[0071] A palavra "encistado" significa o estágio de oocisto do parasita protozoário.

[0072] Da maneira aqui usada, as palavras "imunizar" e "vacinar" são sinônimos e são usadas indiferentemente. O termo "dose de imunização efetiva", da maneira aqui usada, a menos que de outra forma indicada, significa o número de esporozoários em qualquer estágio em seu ciclo de vida incluindo misturas de um ou mais, ou ainda todos os estágios de seus ciclos de vida, por exemplo, esporozoítas, oocistos e/ou merozoítas ou, quando misturados, por exemplo, o número de esporozoítas, oocistos e merozoítas, suficiente para obter uma reação imune em animais assim vacinados, por exemplo, obter um aumento nos títulos do anticorpo correspondente e/ou uma ativação de imunidade mediada por célula. Preferivelmente, a reação imune que é obtida fornece imunidade protetora que limita ou reduz os sinais de doença clínica, perda de peso, morbidade, menos utilização do alimento, e/ou mortalidade nos animais vacinados (por exemplo, aves) quando desafiados com uma dose virulenta do esporozoário (por exemplo, *Eimeria* ou *Cryptosporidia*).

[0073] O termo "imunidade sólida" é aqui usado indiferentemente com o

termo "imunidade total" e o termo "hiper-imunidade" e denota um grau de imunidade outorgado em um grupo de animais vacinados (por exemplo, um grupo de pássaros vacinados) que fornece proteção contra um desafio homólogo de maneira tal que os animais vacinados são estatisticamente similares aos controles não desafiados (e/ou estatisticamente dissimilares aos controles desafiados não vacinados) na saúde e desempenho, da maneira medida em, por exemplo, conversão da ração, ganho de peso e/ou lesões (grandes ou microscópicas) da coccidiose.

[0074] Os termos "adjuvante" e "estimulante imune" são aqui usados indiferentemente, e são definidos como uma ou mais substâncias que causam estímulo do sistema imune. Os adjuvantes são agentes que aumentam de maneira não específica uma resposta imune a um antígeno particular, reduzindo assim a quantidade de antígeno necessário em qualquer vacina fornecida, e/ou a frequência de injeção necessária a fim de gerar uma resposta imune adequada ao antígeno de interesse. Neste contexto, um adjuvante é usado para melhorar uma resposta imune em uma ou mais antígenos/isolados da vacina. Um adjuvante pode ser administrado ao animal alvo antes, em combinação com, ou após a administração da vacina.

[0075] Da maneira aqui usada uma "sequência heteróloga de nucleotídeos" é uma sequência de nucleotídeos que é adicionada a uma sequência de nucleotídeos da presente invenção por métodos recombinantes para formar um ácido nucléico que não é naturalmente sintetizado na natureza. Tais ácidos nucléicos podem codificar os ácidos nucléicos de fusão (por exemplo, quiméricos). Em uma modalidade particular, a sequência heteróloga de nucleotídeos pode funcionar como um meio de detectar uma sequência de nucleotídeos da presente invenção. Em uma outra modalidade, uma sequência heteróloga de nucleotídeos com esta pode funcionar para facilitar o uso do ácido nucléico em uma reação de PCR.

[0076] Da maneira aqui usada o termo "aproximadamente" é usado

indiferentemente com o termo "cerca de" e significa que um valor é cinquenta por cento do valor indicado, isto é, uma composição que contém "aproximadamente" 100 oocistos, contém de 50 a 150 oocistos.

[0077] O termo "estatisticamente similar", da maneira aqui usada, denota que uma comparação estatística de dois grupos ou populações de animais resultaria na aceitação da hipótese nula (ou hipótese de nenhuma diferença) em um nível de significância de $< 0,1$.

[0078] O termo "estatisticamente dissimilar", da maneira aqui usada, denota que uma comparação estatística de dois grupos ou populações de animais resultaria na rejeição da hipótese nula (ou hipótese de nenhuma diferença) em um nível de significância de $< 0,1$.

[0079] Da maneira aqui usada, quando uma série de sequências de nucleotídeos são fornecidas em uma lista de SEQ ID NOs., por exemplo, SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34, e/ou 43 (ou SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, e/ou SEQ ID NO:43), pretende-se que o "e/ou" modifique a relação entre todas as SEQ ID NOs. listadas na série. Portanto, uma comparação/identificação que baseia-se em uma série de sequências de nucleotídeos como esta pode ser realizada com referência a qualquer uma das sequências individuais de nucleotídeos listadas sozinhas, ou a qualquer combinação das sequências individuais de nucleotídeos listadas, incluindo todas as sequências de nucleotídeos listadas na série.

[0080] Os alinhamento de sequência de nucleotídeos são realizados usando a metodologia de Clustal W J. D. Thompson et al., [Nucleic Acid Research 22:4673-4680 (1994)], no programa de alinhamento Megalign™ do software de análise de dados DNASTAR (Windows 32 Megalign 5.06. 1993-2203 DNASTAR Inc.) usando ajustes padrões em todos.

Caracterização de *E. meleagriditis* 2

[0081] *E. meleagriditis* 2 invade as mesmas regiões intestinais como *E. meleagriditis* 1 e *E. dispersa*, mas os oocistos de *E. meleagriditis* 2 são

relativamente menores que aqueles destas duas espécies. Observou-se que os oocistos esporulados examinados são subesféricos, medindo 17,824 x 16,444 microns (16,915-19,549 x 14,585-18,314 microns) com um índice de forma de 1,0839.

[0082] O parasitismo com *E. meleagrimitis* 2 é acompanhado por grave hiperemia e produção excessiva de muco na metade superior do intestino delgado, com hemorragia de mucosa moderada a grave que se estende do duodeno para o íleo a medida que a infecção progride (ver, figuras 1 e 2).

[0083] A espécie de *Eimeria* recém identificada, *E. meleagrimitis* 2, pode ser identificada inequivocamente por sua sequência exclusiva de nucleotídeos na região espaçadora transcrita interna um (região ITS-1, ver, figura 3B), localizada entre os genes ribossomais 18S e 5,8S no genoma de *Eimeria*. Dessa maneira, a presente invenção fornece sequências individuais de nucleotídeos da região ITS-1 de quatro isolados de *E. meleagrimitis* 2, SEQ ID NOs: 31, 32, 33 e 39. Estas sequências compartilham mais de 96 % (e até 100 %) de homologia uma com a outra. A presente invenção fornece adicionalmente uma sequência consensual para a região ITS-1 de *E. meleagrimitis* 2 com uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 44.

[0084] Além do mais, conjuntos de oligonucleotídeo iniciador de PCR, com base na sequência da região ITS-1 de cada espécie, foram desenhados para uso em ensaios de identidade a base de PCR. Um conjunto completo de tais oligonucleotídeos iniciadores está presente no grupo de pares de sequências de nucleotídeos de SEQ ID NOs: 3 e 4, para *E. meleagrimitis* 1; SEQ ID NOs: 5 e 6, para *E. adenoides*; SEQ ID NOs: 7 e 8, para *E. gallopavonis*; SEQ ID NOs: 9 e 10, para *E. dispersa*; SEQ ID NOs: 11 e 12, para *E. meleagrimitis* 2.

Sujeitos animais

[0085] O animal a ser tratado é preferivelmente um elemento do gênero *Meleagris*, isto é, um peru. Em uma modalidade particular, o peru é do gênero

gallopavo, isto é, um peru doméstico. Em uma outra modalidade, o peru é do gênero *ocellata*. Em geral, a administração da vacina é realizada em perus jovens, muitas vezes, no dia do nascimento do peru jovem.

Antígenos

[0086] Os oocistos tipo selvagem são obtidos das fezes ou tecido dos animais infectados; ração ou água contaminados; solo; detritos das penas ou de local de repouso ou uma variedade de outras fontes. Os métodos para o isolamento de esporocistos e oocistos são conhecidos. Os procedimentos exatos usados para separar os oocistos variarão com o material dos quais os oocistos são obtidos e serão facilmente interpretados pelos versados na técnica. Os merozoítas podem crescer na cultura pelos métodos revelados em U.S. 7.250.286 B2, cujos conteúdos são aqui incorporados pela referência na sua íntegra.

[0087] Uma abordagem disponível para isolar organismos de amostras ambientais brutas é da maneira a seguir: A etapa inicial é a separação dos esporocistos e/ou oocistos a partir de material estranho. O solo, ou excreções, é em geral processado formando uma lama com solução de salina saturada e separando os esporocistos e/ou oocistos da lama. Por exemplo, o material a ser processado é misturado com um mínimo de 2 volumes (p/v) de NaCl aquoso saturado para formar uma lama. Se necessário, a lama pode ser processada em um misturador ou liquidificador até que uma consistência homogênea foi atingida. A lama é centrifugada em cerca de 800 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante é coletado vertendo através de uma camada dupla de gaze ondulada 24 x 24. Outros métodos para purificar oocistos das amostras que são comumente usados incluem a flotação de sacarose do tipo Sheather e flotação de zinco-sulfato, [por exemplo, ver LR Ash e TC Orihel, Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. ASCP Press © 1991, aqui incorporado pela referência].

[0088] O sobrenadante filtrado é diluído com dois volumes de água

potável e centrifugado a cerca de 1.600 x g por 10 minutos a 4 °C. Os oocistos precipitados são lavados com água e precipitados por centrifugação, da maneira descrita, por mais três vezes. Os oocistos são então lavados três vezes em dicromato de potássio 2,5 % usando o mesmo procedimento usado para as lavagens em água. Após a lavagem final, os oocistos podem ser armazenados em dicromato de potássio 2,5 % a 4 °C ou transferidos para um recipiente para esporulação.

[0089] Alternativamente, a filtração sequencial pode ser usada para isolar os oocistos com base no peso. Se a filtração for usada, os oocistos são lavados com água e dicromato de potássio 2,5 %, da maneira previamente descrita.

[0090] Linhagens não atenuadas que originaram dos isolados de campo tipo selvagem foram mantidas em ajustes de laboratório por passagem seriada por muitos anos e são bem caracterizadas como baixas a moderadas em patogenicidade, com moderada a alta fecundidade, períodos pré-patentes definidos e padrões de mudança conhecidos a partir do hospedeiro.

[0091] À parte das linhagens precoces existentes de *Eimeria*, as linhagens precoces também podem ser obtidas a partir das cepas mães tipo selvagem virulentas ou cepas não atenuadas após a passagem seriada em perus. Em cada um destes casos, os oocistos são coletados das fezes apenas durante as primeiras poucas horas após a patência. Desta maneira, o período de tempo pré-patente pode ser progressivamente reduzido. Este tipo de passagem é denominado uma passagem de seleção. Alternativamente, a fim de aumentar os números de oocistos disponíveis para a coleta, pode ser vantajoso coletar oocistos em um período entre o início da patência e o período de tempo pré-patente aproximado da cepa mãe. Este tipo de passagem é denominado uma passagem neutra. Finalmente, no processo conhecido como passagem relaxada, virtualmente todos os oocistos são coletados, incluindo aqueles produzidos posteriormente ao período de tempo pré-patente

da cepa mãe.

Vacinas

[0092] As vacinas da presente invenção podem ser preparadas por muitos procedimentos, um dos quais é fornecido apenas como um exemplo.

Composição do produto

[0093] Seis espécies de *Eimeria* em peru foram isoladas e então propagadas por passagem através dos perus.

Proporções (Oocisto viável ou unidade por 1.000 doses).

Espécies	Oocistos
<i>E. adenoides</i>	1 x10 ⁴ - 1 x10 ⁶
<i>E. dispersa</i>	1x10 ⁴ - 1x10 ⁶
<i>E. gallops vonis</i>	1 x10 ⁴ - 1 x 10 ⁶
<i>E. meleagridis</i>	1 x10 ⁴ - 1 x10 ⁶
<i>E meleagrimitis</i>	1 x10 ⁴ - 1 x10 ⁶
<i>E. meleagrimitis</i>	1 x10 ⁴ - 1 x10 ⁶

Culturas

[0094] • Método de Identificação: Os *Coccidia* são identificados por exame microscópico e medições de comprimento e largura. A área de infecção (mudanças patológicas) é também um critério para distinguir espécies de *Eimeria*. Como cada espécie é antígenicamente distinta, os estudos imunológicos cruzados em pássaros susceptíveis e não imunizados também podem ser usados como um meio de identificação de culturas.

[0095] • Os artigos de vidro e utensílios usados em laboratórios de produção são lavados cuidadosamente após o uso e permanecem em sua sala espécie-específica. Se tais itens forem usados para crescer uma espécie diferente de *Eimeria* no mesmo hospedeiro, eles são submetidos à autoclavação a 121 °C por 30 minutos e/ou tratamento térmico em mais de 37,78 °C (100 °F) por 72 horas ou mais de 65,55 °C (150 °F) por 48 horas.

[0096] • Virulência e pureza das culturas: a pureza de culturas semeadas

pode ser obtida por isolamento da célula única. Um oocisto viável, medido com um micrômetro ocular, é fornecido oralmente a pássaros de 3 a 10 dias sem *Coccidios*. Como o período pré-patente é conhecido para cada espécie, o pássaro é sacrificado durante a produção de oocisto e os intestinos e/ou bolsas cecais são lavados com água estéril, dicromato de potássio 2,5 % é adicionado e aerado por 24-72 horas a fim de permitir que os oocistos contidos na suspensão se tornem esporulados e por meio disso, infectivos. Estes são passados por um outro pássaro sem *Coccidia* e o processo é repetido até que números suficientes de oocistos fossem obtidos, os quais serão usados como semente para a produção.

Composição dos meios:

[0097] Todos os oocistos, obtidos em culturas puras da maneira descrita anteriormente, são reproduzidos em animais nascidos vivos, quarentenados e mantidos sem infecção coccidial. Os pássaros variam em idade de 3-28 dias para a produção da semente e de 3-8 semanas para a produção da vacina. Os pássaros são conferidos quanto a ausência de infecção pelo método de flotação do sugar açúcar semanalmente e exatamente antes de período de inoculação.

Culturas de semente/Oocistos:

[0098] As culturas de semente são armazenadas em temperatura de refrigeração. Os oocistos para inoculação são suspensos em água de torneira fria.

Inoculações:

[0099] Os pássaros individuais são inoculados com 1,0 mL da suspensão inserindo uma pipeta ou seringa calibradas contendo a suspensão de oocisto no cultivo. O número de oocistos por 1,0 mL varia com cada espécie:

Espécie	Oocistos viáveis/mL
<i>E. adenoides</i>	1 x10 ³ - 5x10 ⁵
<i>E. disperse</i>	1 x10 ³ - 5x10 ⁵

<i>E. gallopavonis</i>	1	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^5$
<i>E. meleagridis</i>	2	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^5$
<i>E. meleagrimitis</i>	1	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^5$
<i>E. meleagrimitis</i>	2	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^5$

Propagação e coleta de oocistos:

[00100] • Cada espécie é propagada no intestino de perus vivos. Após um período pré-patente apropriado, ver anteriormente, oocistos não esporulados são depositados nos excrementos. Os excrementos podem ser coletados diariamente a partir do quarto ao décimo primeiro dia após a inoculação. Os oocistos são examinados microscopicamente e podem obedecer ao tamanho e forma dos oocistos usados na inoculação. Outros tipos não podem estar presentes, que de outra forma indicam que uma espécie contaminante foi introduzida de maneira inadequada. Pássaros aleatórios podem ser sacrificados e observados quanto às lesões características nas seções apropriadas do intestino. Nenhuma coleta é realizada se existir qualquer evidência de lesões causadas por doença estranha ou outra espécie de

Coccidia.

<u>ESPÉCIE</u>	<u>OOCISTOS</u> <u>VIÁVEIS PERÍODO POR ML</u>	<u>PRÉ-PATENTE</u>
<i>E. adenoides</i>	5.000 – 100.000	104 HORAS
<i>E. dispersa</i>	20.000 – 200.000	144 HORAS
<i>E. gallopavonis</i>	5.000 – 100.000	144 HORAS
<i>E. meleagrimitis</i>	1 5.000 – 100.000	144 HORAS

[00101] Os pássaros usados para a produção de cada espécie de *Coccidia* são criados em baterias e mantidos em quarentena até a necessidade de produção. Eles são transferidos em um quarto designado para a produção de uma espécie, e cada pássaro é infectado oralmente com uma suspensão de uma cultura de semente pura de oocistos. Os pássaros são cuidados por técnicos treinados durante o período pré-patente.

[00102] • O período pré-patente varia com cada espécie.

[00103] • Os excrementos de pássaros infectados são coletados em bandejas contendo papel que é trocado diariamente. Os excrementos são

transferidos para um béquer limpo e misturados com água de torneira para render uma consistência encharcada. Uma diluição 1 :10 desta suspensão é realizada em água de torneira e os oocistos são contados em um hemocítmetro. Se as contagens parecem suficientemente altas, os oocistos são lavados dos excrementos.

[00104] Se os excrementos forem ricos na contagem de oocistos, uma diluição 1:5 (aproximada) é realizada na suspensão encharcada em dicromato de potássio 2,5 % e a suspensão é vigorosamente agitada. As partículas estranhas mais pesadas assentam rapidamente e os oocistos permanecem suspensos no sobrenadante. Este sobrenadante passa por uma peneira de tela 100 para remover quaisquer partículas grandes de flotação grandes. Este procedimento é repetido lavando o sedimento várias vezes a fim de remover a maioria dos oocistos. O agrupamento de sobrenadante é transferido para frascos e aerado borbulhando ar através deste. A aeração continua por 24-72 horas até que a esporulação máxima fosse obtida.

[00105] Após a aeração, os oocistos são mantidos em temperatura ambiente até que eles tenham se sedimentado. O sedimento é lavado com dicromato 2,5 % até que nenhum oocisto possa ser observado no sedimento. A sedimentação e o descarte do sobrenadante é repetido até que os oocistos estejam contidos em um volume que seria aproximadamente a metade do sedimento e a metade do dicromato limpo. A suspensão é resfriada a aproximadamente 4 °C, e a seguir beta-propiolactona fria é adicionada em uma concentração final de 0,1-0,2 % e colocada no refrigerador. Alternativamente, os excrementos são diluídos com água de torneira e passados por uma peneira de malha 100. Este procedimento é repetido várias vezes para remover a maioria dos oocistos. O sobrenadante é concentrado permitindo-o assentar até que os oocistos sedimentem ou por centrifugação de fluxo contínuo a 2.000 RPM. O sedimento é então misturado com uma solução saturada de açúcar e centrifugada com o efluente retido.

[00106] O efluente é diluído com água de torneira fria e re-centrifugado com o sedimento contendo os oocistos que são retidos. Os oocistos são ressuspensos com dicromato de potássio 2,5 % e aerados por 24-72 horas. Beta-propiolactona é adicionada em concentrado final a 0,1-0,2 % e colocada em um refrigerador.

[00107] Cada suspensão de espécie é cultivada para esterilização. Um mL de cada suspensão é inoculada em cada um dos seguintes: ágar cérebro coração, desoxicolato, SS e de dextrose de Sabouraud. Nenhum patógeno pode estar presente.

[00108] As alíquotas de cada espécie com um número ideal de oocistos são inoculadas oralmente em um grupo de três pássaros de 2-8 semanas. Estes pássaros são sacrificados durante o período de infecção para verificar se as lesões produzidas foram causadas pelas espécies pretendidas. Cada lote tem que conter apenas a espécie pretendida.

[00109] Todo o material descartado é manipulado de acordo com V.S. Memo 800.56. Os materiais sólidos são colocados em sacolas de polietileno e queimados ou incinerados. Os líquidos são tratados com lixívia (50 mL por 1.000 mL de fluidos para fornecer aproximadamente cloro 600 ppm) e mantidos à temperatura ambiente por pelo menos 15 minutos antes da eliminação por meio do esgoto sanitário.

[00110] • As gaiolas ou baterias de pássaros são lavadas sob pressão e descontaminadas com calor seco (65,55 °C (150 °F) por 48 horas ou 37,78 °C (100 °F) por 72 horas).

Lotes

[00111] • Exemplo de conjunto de lote: (Lote médio 80.000 mL)

Número mínimo de oocistos esporulados em solução de dicromato de potássio 2,5 %

Species	DOSE 1.000	DOSE 5.000
<i>E. adenoides</i>	4 X 10 ⁹	8 X 10 ⁹

<i>E. dispersa</i>	8 X 10 ⁹	1,6 X 10 ¹⁰
<i>E. gallopavonis</i>	4 X 10 ⁹	8 X 10 ⁹
<i>E. meleagrimitis</i> 1	4 X 10 ⁹	8 X 10 ⁹
<i>E. meleagrimitis</i> 2	4 X 10 ⁹	8 X 10 ⁹

- Volume do lote médio: 80.000 mL
- Volume de lote máximo: 160.000 mL

Volume da carga: (O volume da carga é verificado periodicamente durante o carregamento.)

- [00112] • 4,2±0,2 mL em um frasco estéril de 10 mL para 1.000 doses
- [00113] • 10,5±0,5 ml em um frasco estéril de 20 mL para 5.000 doses
- [00114] • A vacina granulada é agitada durante o carregamento e dispensadas nos recipientes finais por meio de uma máquina de pipetagem. As seringas de carregamento e tubos são esterilizadas em uma autoclave antes do uso. Os recipientes finais são esterilizados em forno em panelas cobertas e resfriados naturalmente antes do carregamento. As rolhas de borracha, esterilizadas no autoclave, são colocadas nos frascos e um selo de alumínio é aplicado. Os frascos preenchidos são armazenados em um refrigerador a 3-7°C.

Adjuvantes

[00115] Em certas circunstâncias, as composições da vacina da presente invenção também podem incluir um adjuvante farmacologicamente aceitável. Os adjuvantes da presente invenção podem ser obtidos de quaisquer de inúmeras fontes, incluindo de fontes naturais, fontes recombinantes, e/ou serem quimicamente sintetizados, etc. Os adjuvantes adequados para a vacinação de animais incluem, mas sem limitação, Adjuvante 65 (contendo óleo de amendoim, mono-oleato de manida e monoestearato de alumínio); adjuvante completo ou incompleto de Freund; géis minerais, compostos de alumínio, tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio e alúmen; agentes tensoativos, tais como hexadecilamina, octadecilamina, lisolecitina,

brometo de dimetildioctadecilamônio, N,N-dioctadecil-N',N'-bis (2-hidroximetil) propanediamina, metoxi-hexadecilglicerol e polióis plurônicos; poliânions, tais como pirana, sulfato de dextrano, poli IC, ácido poliacrílico; peptídeos, tais como muramil dipeptídeo, dimetilglicina e tuftsina e emulsões oleosas. A informação relacionada aos adjuvantes é revelada, por exemplo, na série por P. Tijssen [Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, 3ª edição, Elsevier, Nova Iorque, (1987), aqui incorporado na sua íntegra pela referência].

[00116] Outros adjuvantes potenciais incluem, mas sem limitação, óleos metabolizáveis e não metabolizáveis, polímeros bloco, ISCOM's (complexos de imunoestimulação), vitaminas e minerais (incluindo, mas sem limitação: vitamina E, vitamina A, selênio e vitamina B12), Quil A (saponinas), polímeros de ácido acrílico reticulado com éteres de polialquenoila ou divinil glicol, vendido com o nome comercial CARBOPOL® (por exemplo, CARBOPOL® 941), e gotas de óleo de tamanho micro dispersos uniformemente em emulsão aquosa (por exemplo, da maneira vendida com o nome comercial Emulsigen®).

[00117] Exemplos adicionais de adjuvantes, que algumas vezes são referidos especificamente como estimulantes imunes, incluem componentes de parede celular bacteriana e fúngica (por exemplo, lipopolisacarídeos, lipoproteínas, glicoproteínas, muramilpeptídeos, beta-2,3/1,6-glucanas), vários carboidratos complexos derivados de plantas (por exemplo, glicanas, acemanana), várias proteínas e peptídeos derivados de animais (por exemplo, hormônios, citocinas, fatores co-estimulatórios) e ácidos nucleicos inéditos derivados de vírus e outras fontes (por exemplo, RNA de dupla fita, CpG). Além do mais, qualquer número de combinações das substâncias anteriormente mencionadas pode fornecer um efeito adjuvante e, portanto, pode formar um adjuvante da presente invenção.

[00118] Uma vacina da presente invenção é facilmente administrada por

qualquer via padrão, incluindo vacinação por aspersão, intravenosa, intramuscular, subcutânea, oral (incluindo na ração e/ou água de beber), intranasal, intradérmica e/ou intraperitoneal. Os versados na técnica entenderão que a composição da vacina é preferivelmente formulada de maneira apropriada para cada tipo de recipiente animal e via de administração.

EXEMPLO 1

UMA NOVA ESPÉCIE PATOGÊNICA DE *EIMERIA*

Sumário

[00119] Da maneira aqui demonstrada, *E. meleagrimitis* 2 (*E. edgari*) é uma nova espécie patogênica de *Coccidia* para perus. Os pássaros imunizados com uma combinação de *E. adenoeides*, *E. meleagrimitis* 1, *E. dispersa* e *E. gallopavonis* (Coccivac-T) ou *E. adenoeides* e *E. meleagrimitis* (Immucox) ou *E. meleagrimitis* 1, como entidades únicas, não foram protegidos contra *E. meleagrimitis* 2. *E. meleagrimitis* 2 foi isolada de operações de peru comercial de vários estados em todo os Estados Unidos e perus selvagens da região de Delmarva. Animais jovens hiper-imunizados por várias semanas com *E. meleagrimitis* 1, *E. adenoeides* e *E. dispersa* (E. MAD) e desafiados com os organismos suspeitos (*E. meleagrimitis* 2) exibiram sinais clínicos de parasitismo grave (depressão, falta de apetite e letargia) por 6,5 dias após o desafio. A imunidade desenvolvida em animal jovem após vários graus baixos de exposições, e imunidade, foi apenas com relação a *E. meleagrimitis* 2.

[00120] *E. meleagrimitis* 2 invade as mesmas regiões intestinais as *E. meleagrimitis* 1 e *E. dispersa*, mas os oocistos de *E. meleagrimitis* 2 são menores que aqueles destas duas outras espécies. Os pássaros imunizados com E. MAD não foram protegidos contra *E. meleagrimitis* 2 e os pássaros imunizados com *E. meleagrimitis* 2 não foram protegidos contra *E. meleagrimitis* 1, *E. adenoeides* ou *E. dispersa*. *E. meleagrimitis* 2 parece ser relativamente prevalente nos Estados Unidos, sendo presentes em muitas das

áreas de crescimento de peru nos Estados Unidos. De fato, estima-se que a prevalência de *E. meleagritidis* 2 seja mais de 40 %, com estes organismos que são identificados em amostras fecais da Califórnia, Iowa, Dakota do Norte e do Sul, Minnessota, Pensilvânia, Virgínia, Wisconsin, Delaware e Maryland.

Materiais e Métodos

[00121] Fonte de *Coccidia*: Amostras fecais, amostras de detrito e ou amostras gastrointestinais foram avaliadas em virtude das epidemias da coccidiose em grupos comerciais de peru. Os organismos recuperados foram originalmente caracterizados como *E. meleagritidis* tipo-1 com base na morfologia, região do trato gastrointestinal parasitado e sua patologia. As amostras foram obtidas de fazendas comercial de peru a partir dos seguintes estados: Califórnia, Iowa, Dakotas do Norte de do Sul, Pensilvânia, Minnessota e Virgínia. Amostras fecais também foram obtidas de perus selvagens de Delaware e Maryland.

[00122] Patogenicidade e Patologia. O parasitismo com *E. meleagritidis* 2 é acompanhado por produção grave de muco na metade superior dos intestinos delgados e hemorragia moderada a grave ocorrendo do duodeno ao íleo a medida que a infecção progride. As lesões grandes apresentam hiperemia, muco em excesso no duodeno e jejuno, seguido por hemorragia na mucosa nos intestinos delgados. As fezes dos animais infectados são aquosas, mucóides e sanguinolentas. Os parasitas invadem as células epiteliais do duodeno até o reto e são ocasionalmente observados no ceco.

[00123] Testes conduzidos: Teste de sensibilidade anticoccidial (AST): Amostras de *Coccidia* foram expandidas em perus jovens e os testes foram conduzidos para determinar a efetividade de anticoccidiais específicos contra vários dos isolados. Os isolados das fazendas comerciais mostraram tolerância ou resistência à CLINACOX[®] e AMPROL[®]. Nos casos de Iowa, Califórnia e Minnesota, foram relatadas falhas de CLINACOX[®] durante o período de uso.

Como é agora sabido, os organismos predominantes foram *E. meleagridis* tipo 1, que foram aqui revelados e identificados como *E. meleagridis* 2. Os isolados de peru selvagem de Delaware e Maryland foram testados contra anticoccidiais específicos, tais como CLINACOX® e AMPROL®. Os achados foram similares, os medicamentos demonstram pouca eficiência contra os isolados do peru selvagem, tabela 1. *E. meleagridis* 1 de Coccivac®-T demonstrou tolerância moderada à CLINACOX®, mas menos pronunciada do que a resposta de *meleagridis* 2.

Hiper-imunização:

[00124] Aos perus jovens crescidos em gaiolas foram dadas inoculações múltiplas por várias semanas tanto com Coccivac™-T, uma combinação de *E. adenoides*, *E. dispersa* e *E. meleagridis* 1 (Coccivac®-T) ou *E. meleagridis* 1, quanto com uma combinação de *E. adenoides* e *E. meleagridis* 2 (Immucox™), ou *E. meleagridis* 2.

Métodos de inoculação:

[00125] Os animais jovens foram inicialmente inoculados nos primeiros sete dias de idade, e então várias vezes nas próximas semanas. A inoculação inicial foi realizada por meio de gavagem e as inoculações subsequentes foram por meio de ração. Cada dose subsequente foi duas vezes a dose prévia.

Desafio/Inoculação de oocistos:

[00126] Em aproximadamente 28 dias, os pássaros saudáveis foram selecionados e separados aleatoriamente em gaiolas de desafio. A cada pássaro desafiado foi dado 1 mL de um material homólogo ou heterólogo.

Lesão grande e classificação microscópica.

[00127] Em 6 dias após o desafio, todos os pássaros foram eutanizados e os intestinos classificados por lesões usando um sistema de 0 a 4. Os esfregaços foram montados úmidos e preparados de seis áreas de cada intestino, 1) duodeno, 2) jejuno, 3) divertículo do saco vitelino (YSD), 4) íleo, 5) bolsa cecal (CP) e, 6) reto, para determinação da carga do parasita usando

um sistema 0 a 4+ (0 = sem parasitismo e 4 = parasitismo grave).

Resultados e Discussão

Imunização com E. MAD:

[00128] Os pássaros imunizados com E. MAD e desafiados com um de vários materiais heterólogos mostraram que os pássaros não foram protegidos contra o organismo desconhecido, aqui referido como *E. meleagriditis 2*. O nível de parasitismo variou de moderadamente grave a grave (ver, tabela 1).

TABELA 1

[00129] Níveis de parasitismo em animais jovens hiper-imunizados com E. MAD e desafiados com isolado de campos de *E. meleagriditis 2*^A

Desafio	Duodeno	Jejuno	YSD,	Íleo	CP	Reto
E. me2-1	+++	+++	++	++++	+	++++
E. me2-2				++	++	+
E. me2-3	+	+++	++	++	++	
E. me2-4	++++	++++	++++	++		

^AIsolados de campos foram caracterizados por PCR como contendo *E. meleagriditis 2*, bem como outra *Eimeria* em alguns casos.

YSD = divertículo do saco vitelino; CP = bolsa cecal;

E. me2 = *E. meleagriditis 2*

[00130] Imunização com *E. meleagriditis 1*: Os pássaros imunizados com *E. meleagriditis 1* e desafiados com um dos isolados de campo mostram que os pássaros não foram protegidos contra o organismo que é aqui revelado e definido como *E. meleagriditis 2*. O nível de parasitismo variou de moderadamente grave a grave (ver, tabela 2). Entretanto, os animais jovens desafiados com material homólogo não mostraram nenhuma lesões grandes ou carga de parasita, (ver, tabela 2).

TABELA 2

[00131] Níveis de parasitismo em animais jovens hiper-imunizados com *E. meleagriditis 1* desafiados com isolados de campo de *E. meleagriditis 2*^A

Chalienged	Duodeno	Jejuno	YSD	Íleo	CP	Reto
E. me2-A	+++	+++	+++	++	+	+
E. me2-B	+++	++++	++++	++++	++	+
E. me2-C	++	+++	+++	++	+	

E. me2-D	+++	+++	+++	+++	+++	
E. me2-E	+++	+++	++	+	++	
E. me2-F	+	+	++	++	+	+
E. me2-G	++	+++	++++	++++	+++	+

^AIsolados de campos foram caracterizados por PCR como contendo *E. meleagriditis 2*, bem como outra *Eimeria* em alguns casos.

YSD = divertículo do saco vitelino; CP = bolsa cecal;

E. me2 = *E. meleagriditis 2*

Imunização com IMMUCOX[®]:

[00132] Os pássaros imunizados com IMMUCOX[®] e desafiados com um dos vários materiais heterólogos, incluindo Coccivac[®]-T, ou materiais homólogos, mostraram que os pássaros não foram protegidos contra Coccivac[®]-T, mas forneceram resultados mistos contra os organismos desconhecidos, aqui definidos como *E. meleagriditis 2*. O nível de parasitismo variou de nenhuma a raras células parasitárias para *E. meleagriditis 2* até parasitismo grave para os organismos Coccivac[®]-T (ver, tabela 3).

TABELA 3

[00133] Níveis de Parasitismo em animais jovens hiper-imunizados com IMMUCOX[®] desafiados com isolados de campo de *E. meleagriditis 2*^A ou E.

MAD

Desafio	Duodeno	Jejuno	YSD	Íleo	CP	Reto
E.me2	+	R	+	+	-	-
E.me2	-	R	-	-	R	-
IMMUCOX [®]	-	-		R		-
E. MAD	+++	+++		+++	++	+

^AIsolados de campos foram caracterizados por PCR como contendo *E. meleagriditis 2*, bem como outra *Eimeria* em alguns casos.

YSD = divertículo do saco vitelino; CP = bolsa cecal;

E. me2 = *E. meleagriditis 2*

[00134] Imunização com *E. meleagriditis 2*. Os pássaros imunizados com *E. meleagriditis 2* e desafiados com um dos vários isolados de campo de *E. meleagriditis 2* mostraram que os pássaros foram protegidos. O nível de parasitismo variou de nenhum a parasitismo leve, mas os pássaros desafiados

com *E. meleagritidis* 1 não mostraram proteção medida pela carga do parasita no intestino delgado superior (ver, tabela 4).

TABELA 4

[00135] Níveis de parasitismo em animais jovens hiper-himunizados com *E. meleagritidis* 2 e desafiados com isolados de campos de *E. meleagritidis* 2^A

Desafio	Duodeno	Jejuno	YSD	Íleo	CP	Reto
E. me2 -1	-	-	-	-	-	-
E. me2 -2	-	-	-	-	-	-
E. me2 -3	-	-	-	-	-	-
E. me2 -4	+	++	+			
E. me2 -5	-	-	-	-	-	-

^AIsolados de campos foram caracterizados por PCR como contendo *E. meleagritidis* 2, bem como outra *Eimeria* em alguns casos.

YSD = divertículo do saco vitelino; CP = bolsa cecal;

E. me2 = *E. meleagritidis* 2

[00136] Patogenicidade e patologia. O parasitismo com esta espécie é acompanhado por produção grave de muco na metade superior dos intestinos delgados, com hemorragia moderada a grave ocorrendo do duodeno ao íleo a medida que a infecção progride. As lesões grandes apresentam hiperemia, muco em excesso no duodeno e jejuno, seguido por hemorragia na mucosa nos intestinos delgados, (ver, tabelas 5 e 6, figuras 1 e 2).

Tabela 5

[00137] A gravidade de lesões grandes e regiões intestinais afetadas por *E. meleagritidis* 2 em animais hiper-imunizados contra *E. meleagritidis* 1 ou *E. meleagritidis* 2

Espécie de imunização	Isolado para desafio	Intestino superior	Intestino médio	Intestino inferior
E, mel	1	NA	NA	NA
E, mel	E, me2-2	3,5	3,5	4
E, mel	E, me2-3	0	0	0
E, mel	E, me2-4	4		4
E, mel	E, me2-5			4
E, mel	E, me2-6	3	2,5	2
E, mel	E, mel	0	0	0
E, me2	E, mel	2,3	0	0,3

E, me2	E, me2-B	0	0	0
E, me2	E, me2-C	0	0,5	1
E, me2	E, me2-D	0	0	0
E, me2	E, me2-E	0	0	0
E, me2	E, me2-A	0	0	0

E. me1 = *E. meleagritidis* 1; E. me2= *E. meleagritidis* 2 ; NA = não aplicável

TABELA 6

[00138] Gravidade das lesões grandes e produção de oocistos por pássaro (OPB) em milhões de animais jovens hiper-imunizados contra *E. meleagritidis* 1 ou *E. meleagritidis* 2 e desafiados com *E. meleagritidis* 2

Agente de imunização	Isolado para o desafio	Pontuações da lesão	OPB x106
E, me1	1	NA	NA
E, me1	E, me2-2	3,5	3,5
E, me1	E, me2-3	0	0
E, me1	E, me2-4	4	4
E, me1	E, me2-5	4	4
E, me1	E me2-6	3	2,5
E, me1	E, me1	0	0
E, me2	E, me1	2,3	0
E, me2	E, me2-B	0	0
E, me2	E, me2-C	0	0,5
E, me2	E, me2-D	0	0
E, me2	E, me2-E	0	0
E, me2	E, me2-A	0	0

E. me1 = *E. meleagritidis* 1; E. me2= *E. meleagritidis* 2 ; NA = não aplicável

Sumário

[00139] Os dados dos estudos de imunização e imunização cruzada com *Coccidia* de diferentes fontes, as espécies heterólogas e homólogas mostraram que animais jovens imunizados com *E. meleagritidis* 1, *E. adenoides* e *E. dispersa* (E. MAD) e desafiados com *E. meleagritidis* 2 não foram protegidos contra este desafio. Os animais jovens imunizados contra *E. meleagritidis* 2 e desafiados com *E. meleagritidis* 2 mostraram um alto grau de proteção, mas não quando desafiados com *E. meleagritidis* 1.

DESCRIÇÃO DO OOCISTO:

[00140] *Eimeria meleagritidis* 2 (*E. edgari* sp.n.) da maneira aqui revelada. Os oocistos esporulados são subsféricos, medindo 17,82 x 16,44

microns (16,92-19,55 x 14,59- 18,31 microns) com um índice de forma de 1,084.

[00141] *E. meleagrimitis* 1. Os oocistos esporulados são subsféricos, medindo 21,47 x 19,19 microns (18,90-25,93 x 16,36-21,78 microns) com um índice de forma de 1,119. *Eimeria meleagrimitis* 1, referenciada em nas doenças de Aves: Os oocistos esporulados são subsféricos, medindo 19,2 x 16,3 microns com um índice de forma de 1,178.

EXEMPLO 2

ESTUDO DE PROTEÇÃO CRUZADA EM PERUS

[00142] Materiais e Métodos. Quarenta perus comerciais jovens de 4 dias foram hiper-imunizados por um período de 28 dias com um estoque puro de *E meleagrimitis* 1 (E. me- 080121). Quarenta aves de quatro dias (chocadas juntas) foram mantidas sem *Coccidia* por alimentação com AMPROL® a 125 ppm durante o período de crescimento. O AMPROL® foi removido 96 horas antes do desafio. Os pássaros dos grupos hiper-imunizados e controle foram separados aleatoriamente em cinco grupos e desafiados com um dos cinco tratamentos, da maneira mostrada na tabela 1. Havia sete pássaros por grupo. Os perus foram considerados prontos para o desafio quando nenhum oocisto foi excretado nas fezes 5 a 6 dias após a exposição. O desafio foi realizado por gavagem oral e as galinhas foram eutanizadas e classificadas de acordo com as lesões grandes da coccidiose em uma escala de 0 a 4 (sem lesões à lesões graves) no dia 6 após o desafio. As classificações de lesão grande cumulativa do duodeno, intestino médio, íleo e ceco foram tabuladas (grandes). O intestino foi examinado por parasitemia microscópica (Micros) a 100X e classificado em uma escala de 0 a 4. Oocisto excretado foi determinado por coleta de fezes coletadas de cada pássaro por um período de 48 horas do dia 4 aos dia 6. Os oocistos foram contados e tabulados por grama, por pássaro (OPB). Ver tabela 1 para resultados. O ganho foi calculado como a diferença no peso corporal do dia do desafio e dia 6.

TABELA 1

[00143] Estudo de proteção cruzada em perus imunizados contra EME1 e desafiados com vários isolados medidos por ganho de peso e carga do parasita

Vacina	Desafio	Ganho (g)	Grande	Micro	OPB x 106
E,,mel-080121	E, me1-080121	393			
E, me1-080121	E,me1-071690	341	0,14	0,43	
E, mel -080121	E,me2- WPC	266	2,99	8,66	222
E, me1-080121	E,me2-UK	206	2,85	6,43	250
E, mel -080121	E,me2-Sundale	267	4,6	10,4	49,2
Controle	E,me2-UK	235	1,14	4,57	68,7
Controle	E,me2- WPC	293	0,86	4,85	52,3
Controle	E,me1-071690	302	0	7,57	36,9
Controle	E,mel -080121	303	0	5,71	88,3
Controle	E,me2-Sundale	213	1,25	7,75	15,0

E.mel -080121 = stock *E. meleagrimitis* 1 ; E.mel -071690 = stock *E. meleagrimitis* 1 ; E.me2-WPC = isolado de campo de *E. meleagrimitis* 2 = *E. edgari*; E.me2-Sundale = isolado de campo de *E. meleagrimitis* 2 = *E. edgari*; E.me2-UK = *E. meleagrimitis* 2 estoque

Resultados e Conclusões

[00144] Os pássaros imunizados com E.mel -080121 ficaram solidamente imunes quando desafiados com E. me1 -080121, sem nenhuma lesão grande, nenhum oocisto excretado e nenhum parasita observado *in situ*. As galinhas imunizadas com E.me2-080121 mostraram imunidade sólida quando desafiadas com E.mel -071690, sem nenhuma lesão, nenhum oocisto excretado e nenhum parasitas observado *in situ*; mas os parasitas *E. adenoides* foram observados no tecido cecal. As galinhas imunizadas com E.mel -080121 e desafiadas tanto com E.me2-UK, E.me2-WPC quanto E.me2-Sundale não foram protegidas do desafio com E.mel, da maneira demonstrada por depressão de crescimento, lesões grandes, parasitemia microscópica e oocisto excretado. Todos os isolados de E.me2 demonstraram patogenicidade em animais jovens naïve com *Coccidia*. Patologias agressivas foram similares entre os isolados E.me2. E.mel e E.me2 não foram similares.

EXEMPLO 3ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE ESPÉCIES DE *EIMERIA* EM PERU

[00145] Quatro cepas referência de *Eimeria* em peru previamente classificadas pelos exame de sua patologia em pássaros foram obtidas da Universidade da Georgia. A análise de sequências de DNA foi realizada em fragmentos clonados amplificados por PCR da região ITS-1 (espaçadora transcrita interna um do agrupamento de DNA ribossomal 18S-5,8S-28S) de cada cepa, e as relações filogenéticas foram estabelecidas. Ao passo que, análises análogas foram realizadas para identificar diferentes isolados de *Eimeria* em galinhas, até o momento, nenhuma análise como esta foi realizada em perus.

[00146] Os presentes resultados identificam as quatro espécies de peru previamente classificadas, e inesperadamente identificam uma espécie adicional de *Eimeria* em peru, que foi previamente agrupada com *E. meleagritidis* 1 (ver, exemplo 1 anterior). A espécie adicional, aqui revelada, caracterizada e descrita, foi denominada *E. meleagritidis* 2. Além de classificar os vários isolados de peru dos Estados Unidos, os conjuntos de oligonucleotídeo iniciador de PCR capazes de identificar cada uma das cinco espécies são também aqui revelados. Estes conjuntos de oligonucleotídeo iniciador de PCR provaram, *inter alia*, serem úteis como ferramentas de diagnóstico.

[00147] Uma vacina que foi usada por muito tempo para auxiliar na prevenção de coccidiose em peru, Coccivac-T[®], contém oocistos vivos de quatro espécies de *Eimeria* em peru: *E. adenoeides*, *E. meleagritidis* (aqui identificada como *E. meleagritidis* 1), *E. gallopavonis*, e *E. dispersa*. Previamente, a sequência de nucleotídeos da região ITS-1, localizada entre os genes ribossomais 18S e 5,8S no genoma de *Eimeria*, foi usada para estabelecer relações filogenéticas entre diferentes espécies de *Eimeria* que infectam galinhas. O Genbank contém vários depósitos desta região para vários isolados de galinha que auxiliam seu uso em isolados de especiação, mas não existem depósitos comparáveis para espécies de peru nesta região

específica.

[00148] Da maneira aqui revelada, os estoques de referência de cada espécie conhecida de *Eimeria* em peru foram obtidos de uma fonte bem respeitada e a sequência ITS-1 foi então determinada para cada um dos isolados obtidos. Uma comparação foi realizada entre as sequências dos estoques de referência stocks e aqueles contidos em Coccivac- T[®]. Além do mais, uma análise da árvore filogenética foi realizada. As análises de sequência também foram usadas para determinam se os conjuntos de oligonucleotídeo iniciador baseados nas quatro espécies de peru previamente classificadas podem identificar inequivocamente todos os vários isolados.

Materiais e Métodos

Estojos e géis comerciais: ver tabela 1

TABELA 1

Reagente	Fabricante	Catálogo	Procedimento
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	51304	Extração do DNA de <i>Eimeria</i>
HotStar Taq Mester Mix Kit	Qiagen	203444	Amplificação por PCR
E-Gels	Invitrogen	G5018-02	Visualização do fragmento de PCR
QIAquick Ge! Extraction Kit	Qiagen	28704	Purificação do produto de PCR a partir da agarose
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen	K4400-40	Clonagem do fragmento de PCR
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27104	Extração do DNA de bactérias contendo o ragmento de PRC clonado

Produtos biológicos:

[00149] Amostras de referência de *Eimeria* (ver tabela 2) foram obtidas da Universidade da Georgia, em Atenas (UGA). Todos os isolados UGA de *Eimeria* foram previamente caracterizados pela patologia. Algumas das amostras foram isoladas do campo e, portanto, continham potencialmente espécies múltiplas. O DNA também foi isolado das espécies na na vacina Coccivac-T[®] de peru contra *Eimeria*, which contém isolados de *E. adenoeides*, *E. meleagrimitis*, *E. dispersa* e *E. gallopavonis*. Além do mais, o DNA e a informação da sequência das três amostras européias de *Eimeria* em

peru foram obtidas. Estas amostras foram caracterizadas pela patologia e foram marcadas como *E. adenoides*-EU, *E. dispersa*-EU e *E. meleagrimitis* 1-EU.

Protocolo:

- DNA foi isolado das amostras referência UGA de *Eimeria* em peru (ver tabela 2).

- A(s) região(s) ITS-1 de cada cepa referência foram amplificadas por PCR usando conjunto de oligonucleotídeo iniciador WW1/WW3r para amplificação de ITS-1, e então purificadas [ver tabela 5 para sequência de oligonucleotídeo iniciador, e figura 3A para seu local no genoma; Woods et al/. Electrophoresis 21 :3558-3563 (2000)].

- Cada fragmento de PCR foi clonado em um vetor plasmídeo, pCR2.1 -TOPO, e o fragmento é sequenciado.

- Os dados da sequência foram analisados por um programa disponível comercialmente, [software de análise DNASTAR, Seqman, Editseq, Mapdraw, Megalign] e as relações filogenéticas de cepas referência para cepas internas foram determinadas (ver figura 4).

- As discrepâncias foram avaliadas entre as determinações de espécies obtidas pela patologia e por análise de sequências usando amplificação de PCR que emprega conjuntos de oligonucleotídeo iniciador de espécie de ITS-1 interna (ver tabela 5 para sequências de oligonucleotídeo iniciador, figura 3B para local no genoma e tabela 7).

Procedimentos experimentais

- Purificação de oocistos por sacarose - RDP 7416.0-01 (Manual/escala pequena).

- Excitação de esporocistos - RDP 7423.0-01.

- Oocistos suspensos 1×10^5 a 1×10^6 em 1 mL de PBS, usando um microtubo para centrífuga com tampa de 1,5 mL e adicionado um grama de vidro ballotini (estéril) [SIGMA 710-1,180 μ m (peneira 16-25

U.S.)] ao tubo. Fechar a tampa.

- Vortexar no maior ajuste por 1 minuto, e então transferir a suspensão de esporocisto pipetando em um microtubo de centrífuga de 2 mL, e rinsar as microesferas com mais PBS até q.s. em 2 mL

- Centrifugar a suspensão de esporocisto (12.000 r.p.m. por 15 segundos em uma microcentrífuga), remover o sobrenadante, e ressuspender os esporocistos liberados em 200 μ L de PBS.

- A extração do DNA de esporocistos liberados é realizada da maneira descrita no mini estojo Qiagen QIAamp DNA (protocolo de centrifugação de sangue e fluido corporal):

- Pipetar 20 μ L de proteinase K no fundo de um microtubo de 1,5 mL.

- Adicionar 200 μ L de amostra no tubo, adicionar em 200 μ L de tampão AL a amostra, misturar vortexando por pulso por 15 segundos.

- Incubar a 56 °C por 10 minutos.

- Centrifugar rapidamente para remover gotas de dentro da tampa, adicionar 200 μ L de etanol e mistura novamente por 15 segundos. Centrifugar rapidamente para remover gotas de dentro da tampa.

- Transferir a mistura a coluna de centrifugação QIAamp, tampar e centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto, transferir a coluna para um tubo limpo de 2 mL, descartar o sobrenadante.

- Adicionar 500 μ L de tampão AW1, tampar e centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto, transferir a coluna para um tubo limpo de 2 mL, descartar o sobrenadante.

- Adicionar 500 μ L de tampão AW2, tampar e centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos, transferir a coluna para um tubo limpo de 1,5 mL, descartar o sobrenadante.

- Adicionar 200 μ L de tampão AE, tampar, incubar em temperatura ambiente por 1 minuto, e centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto

para coletar o DNA eluído.

- Amplificação por PCR de ITS-1

• Realizar as reações de PCR contendo 10 μ L DNA molde, 1 μ M de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores Woods ITS-1 sentido e anti-sentido (WW1 e WW3r), mistura master 1x HotStar Taq, e água sem RNase em um volume final de 50 μ L. As condições do ciclo foram da maneira a seguir: 1 ciclo de 95 °C por 15 minutos; 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos; e então 1 ciclo de 72 °C por 7 minutos, seguido por uma espera a 4 °C. Um DNA molde controle positivo e um controle negativo de água (sem molde) foram incluídos para cada conjunto de oligonucleotídeo iniciador.

- Eletroforese de produtos de PCR - RDP 7605.0-03

• Após a amplificação, 10 μ L de cada reação foram colocados em um E-Gel de agarose a 2 %, e a corrente foi aplicada por 15-30 minutos. A descrição completa do uso de E-Géis é descrita no manual técnico de E-Gel da Invitrogen. Estes géis contém brometo de etídio que se liga a quaisquer fragmentos de DNA, e permite que sejam visualizados e fotografados quando expostos à luz UV. Um DNA líder de 1-kb foi corrido em cada gel para comparação de tamanho do fragmento de PCR.

• Para purificar os fragmentos de PCR, um gel de agarose 2 % foi preparado em uma solução de tampão TAE 1X e 0,5 μ g/mL de brometo de etídio, seguindo as diretrizes descritas em RDP 7605.0-03. A mistura restante da reação de PCR, ~40 μ L, foi misturada com corante de peso Bluejuice 10x em uma concentração final de 1x, e então colocada nos poços do gel, e a corrente foi aplicada e eletroforizada até que a boa separação de todos os fragmentos foi obtida (85V por 60 minutos, seguido por 75V por 50 minutos.) Novamente, um DNA líder de 1-kb foi colocado como uma referência de tamanho. O gel foi exposto à luz UV para visualizar os fragmentos de DNA.

- Purificação do gel dos produtos de PC

- Uma vez que cada fragmento de PCR foi separado por eletroforese em agarose 2 %, um bisturi foi usado para cortar um bloco de gel de agarose contendo o fragmento de PCR, e o bloco de gel foi transferido para um microtubo pesado.

- O volume do bloco de gel foi determinado por peso (1 miligrama igual a 1 μ L de gel fundido).

- O DNA foi extraído usando um estojo de extração de gel da Qiagen, seguindo as instruções do fabricante, e o DNA foi eluído em um volume final de 200 μ L.

- Clonagem dos produtos de PCR em vetor de clonagem de pCR2.1-TOPO, e transformação de plasmídeo em *E. coli*.

- Para clonar cada fragmento de PCR purificado, seguir as instruções dos fabricantes forecidas no estojo de clonagem TOPO TA, incluindo a transformação de células de *E.coli* Top 10 competentes.

- Plaquear células transformadas em placas de ágar imMedia Amp, espalhadas com 40 μ L de uma solução 40 mg/mL de X-Gal e incubar a 37 °C por toda a noite.

- Crescimento, extração de DNA e análise de restrição de Clones

- Após 20 -24 horas de crescimento bacteriano nas placas de transformação, as colônias bacterianas de cor azul e brancas white e blue estão visíveis.

- Duas colônias "brancas" de cada transformação foram escolhidas para crescimento e análise. Cada colônia foi escolhida com um palito de dente estéril e inoculada em 3 mL de caldo Luria contendo 100 μ g/mL de antibiótico carbenicilina. Cada tubo da cultura foi então aerado em 200 rpm em uma temperatura de 37 °C for aproximadamente 16-20 horas.

- O DNA foi extraído de 1,5 mL de cada cultura por toda a noite usando um estojo Qiagen QIAprep Spin Miniprep. As instruções do

fabricante foram seguidas, e o DNA foi eluído em um volume final de 50 μ L.

- A digestão por restrição de cada preparado de DNA foi realizada com enzima EcoRI, e o material digerido colocado em um gel de agarose 1,5 % em tampão TAE 1X e 0,5 μ g/mL de brometo de etídio. Cda reação de digestão continha 5 μ L de DNA miniprep, 100 μ g/mL de BSA, tampão de enzima EcoRI 1x, 10 U de enzima e água em um volume final de 20 μ L. As misturas da reação foram incubadas por mais de 2 horas a 37 °C, e então o corante de peso foi adicionado em uma concentração final de 1 %. A seguir, a mistura foi colocada no gel e eletroforizada a 95V por 41 minutos. A luz UV foi usada para visualizar os produtos de digestão. O DNA digerido a partir dos clones bacterianos contendo o fragmento de PCR desejado foi liberado do fragmento restante do plasmídeo e pode ser identificado por comparação com um padrão de tamanho de DNA.

- Análise de sequências de produtos de PCR clonados
- O DNA purificado de cada clone contendo o fragmento de PCR desejado foi enviado para SeqWright DNA Technologies para reações de sequência de corante grande usando oligonucleotídeos iniciadores de sequenciamento que anelam-se ao vetor plasmídeo, e lido no fragmento de PCR clonado.

- Teste de identidade de PCR usando ITS-1 baseado nos conjuntos de oligonucleotídeo iniciador

- Reações realizadas de PCR contendo 10 μ L de DNA molde, 1 μ M de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos sentido e anti-sentido, mistura master 1x HotStar Taq, e águas sem RNase em um volume final de 50 μ L. As condições do ciclo foram as seguintes: 1 ciclo de 95 °C por 15 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento variável (55- 65 °C) por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos; a seguir 1 ciclo de 72 °C por 7 minutos, seguido por uma espera a 4 °C. As reações contendo conjuntos de oligonucleotídeo iniciador para *E. adenoides*

ou *E. meleagridis* 2 usaram uma temperatura de anelamento de 60 °C. As reações contendo conjuntos de oligonucleotídeo iniciador de *E. dispersa* ou *E. gallopavonis* usaram uma temperatura de anelamento de 65 °C, e as reações contendo o conjunto de oligonucleotídeo iniciador de *E. meleagridis* 1 usaram uma temperatura anelamento de 55 °C. Um molde de DNA controle positivo e um cotrole negativo com água (sem molde) foram incluídos para cada conjunto de oligonucleotídeo iniciador, e os resultados visualizados da maneira descrita anteriormente.

Análise de dados

[00150] Critérios de validade e aceitabilidade do teste: o(s) produto(s) da região ITS-1 de PCR foi(m) amplificado(s) para todos os isolados. O número e a sequência da(s) região(s) ITS-1 para cada isolado puro foi(m) agrupado(s) em famílias. Os isolados contendo espécies múltiplas foram identificados com base na análise de PCR com conjuntos de oligonucleotídeo iniciador espécie-específico.

Resultados

[00151] O DNA foi extraído satisfatoriamente de todos os isolados UGA de *Eimeria* em peru. A amplificação por PCR da(s) região(s) ITS-1 foi realizada em cada isolado de UGA, junto com os outros isolados dos Estados Unidos (exceto *E. dispersa*), e os fragmentos resultantes foram clonados em um plasmídeo comercial para facilitar o sequenciamento. A região ITS-1 do isolado interno de *E. dispersa* foi amplificada, mas não foi clonada ou sequenciada, já que foi identificada usando oligonucleotídeos iniciadores baseados na sequência de *E. dispersa*-EU. Um único clone para cada fragmento clonado de ITS-1 foi enviado para uma companhia de sequenciamento comercial [SeqWright DNA Technology Services of Houston, Texas] para realizar o sequenciamento por extensão do oligonucleotídeo iniciador BigDye. Tanto as fitas sentido quanto anti-sentido foram sequenciadas para cada fragmento, e os dados brutos foram então

analisados usando software DNASTAR. A análise demonstrou sequências não ambíguas para todos os clones.

Tabela 2

Número do isolado (544)	Identificação	ITS-1 PCR Products (WW1/WW3r primers)
-064A	<i>E. dispersa</i>	405 bp
-0648	<i>E. dispersa</i>	409 bp
-064C	<i>E. dispersa</i>	409 bp
-065A	<i>E. meleagrimitis .1</i>	405 bp
-0658	<i>E. gallopavonis</i>	534 bp + 392 bp
-065C	<i>E. gallopavonis</i>	534 bp + 392 bp
-066A	<i>E. adenoides</i>	500 bp + 417 bp
-066C	<i>E. adenoides</i>	534 bp + 417 bp
-066D	<i>E. adenoides Desconhecido</i>	417 bp
-066E	<i>E. adenoides</i>	417 bp
-067A	<i>E. meleagrimitis 1</i>	502 bp
-067B	<i>E. meleagrimitis 1</i>	503 bp
-067C	<i>E. meleagrimitis 1</i>	405 bp
-067D	<i>E. meleagrimitis 1</i>	405 bp
-067E	<i>E. meleagrimitis 1/E. adenoides</i>	405 bp
-067F	<i>E. meleagrimitis 1 (Pode não ser puro)</i>	405 bp
-067G	<i>E. meleagrimitis 1</i>	407 bp
-068A	<i>E. meleagrimitis 1</i>	501 bp

TABELA 3

Tipo	Abreviatura	ITS-1 PCR Products (WW1/WW3r primers)
<i>E. adenoides</i>	CAD	418 bp
<i>E. meleagrimitis 1</i>	Eme	402 bp
<i>E. dispersa</i>	Edi	~400 bp
<i>E. gallopavonis</i>	Ega	535 bp + 392 bp

TABELA 4

Tipo	ITS-1 PCR Products (WW1/WW3r primers)
<i>E. gallopavonis'</i>	535 bp + 392 bp
<i>E. meleagrimitis 2</i>	>500 bp
<i>E. dispersa</i>	410 bp

TABELA 5

Alvo	Sequências de pares de oligonucleotídeo iniciador (5'→3')	Tamanho do produto de PCR Size (bp)
		Variável em espécies ~440 a 770 bp pode

		produzir bandas múltiplas
<i>E. meleagrimitis 1</i> ^b	CTCTCCTCCGTTCACTCCTTTCTG SEQ ID NO: 3 AGCCACCTGCGCAACACATTCT SEQ ID NO: 4	205 bp
<i>E. adenooides</i>	GCTTGTAGGTTTGCATTGGTTC 5 NO: ID SEQ CTCGTTGTGAGAAAAGAAAAAGA T SEQ ID NO: 6	172 bp
<i>E. gallopavonis</i>	TCCGTTTGTGATTGTTGTGG SEQ ID NO: 7 TCCCCTATCAGCACCAACAAA SEQ ID NO: 8	282 bp
<i>E. dispersa</i>	CAGGAGCTGGTATTCATTCATTTC T SEQ ID NO: 9	179 bp
	AGGGCGCAAC i l l CATTC i l i SEQ ID NO: 10	
<i>E. meleagrimitis 2</i> (based on EU <i>meleagrimitis</i>)	CTGGAAAGGTGCCTGTTTGT SEQ ID NO: 11 AGCACAGTGAAGCAGCTGAA SEQ ID NO: 12	225 bp

^a Fonte da sequência: Woods et.al., Electrophoresis 21 :3558 - 3563 (2000) ^b

Fonte da sequência: SPAH US para *E. meleagrimitis 1*, *E. adenooides*, *E. gallopavonis*, e *E. dispersa*

^c Fonte da sequência: SPAH UK

[00152] Uma vez que a sequência de cada fragmento ITS-1 foi determinada, o alinhamento e a análise filogenética foram realizados nestas sequências, bem como nas sequências dos isolados europeus. Os resultados da análise filogenética são mostrados na figura 4. O alinhamento da análise da sequência agrupou os vinte e cinco isolados nas cinco "espécies". Os moldes de *E. adenooides* amplificam um produto único de PCR de 419 base pares (bp) usando o conjunto de oligonucleotídeo iniciador Woods ITS-1. Os moldes de *E. dispersa* rendem um produto único de ITS-1 de 409 bp. Todos os moldes de *E. gallopavonis* produzem dois produtos, de 534 bp e 392 bp em tamanho. O DNA dos isolados caracterizado originalmente como *E. meleagrimitis* amplifica um produto único com os oligonucleotídeos iniciadores Woods mas, surpreendentemente, os isolados são segregados em

duas famílias distintas. Os fragmentos de ITS-1 produzidos a partir destas duas famílias apresentam tamanhos diferentes e compartilham apenas 10,6 % de homologia. Uma família amplificou um produto de 405 bp, ao passo que a segunda, designada *E. meleagrimitis* 2, amplificou um produto de 500 bp. As sequências dos fragmentos ITS-1 em cada grupo compartilham entre 96 % a 100 % de homologia, mas entre grupo compartilham apenas 10,6 % a 49,7 % de homologia.

TABELA 6

Nome	Framento(s) ITS-1	Números Lot
<i>E. dispersa</i>	409 bp	-064B, -064C Edi (Coccivac-T) Edi (UK)
<i>E. adenoeides</i>	417 bp	-066A, -066C -066D, -066E CAD (Coccivac-T)
<i>E. gallopavonis</i>	534 bp + 392 bp	-65B, -65C Egal(Coccivac-T) Ead (UK)
<i>E. meleagrimitis</i> 1	405 bp	-67C, -67D -67E, -67F -67G, -65A -64A, Eme (Coccivac-T)
<i>E. meleagrimitis</i>	500 bp	-067A, -67B -66A Eme (UK)

[00153] Com poucas exceções importantes, os agrupamentos baseados em sequência das cepas referência UGA combinaram com os agrupamentos baseados na patologia. Da maneira entendida na técnica, nem todos os isolados estudados foram puros, e examinando a sequência de um único fragmento clonado por isolado, permaneceu a possibilidade de que alguns estoques continham múltiplas espécies, e que um clone de um contaminante de *Eimeria* tem que ser retirado de um estoque caracterizado. Para determinar se este é o caso onde um conflito existe entre a informação da sequência e a caracterização baseada na patologia, uma análise de PCR foi realizada usando os oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos.

[00154] Finalmente, os oligonucleotídeos iniciadores de PCR que foram

desenhados com base na sequência segregaram EU *E. meleagrimitis*, da maneira aqui revelada como *E. meleagrimitis* 2, assim, estes oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados e usados em um ensaio de PCR igualmente (ver tabela 5).

[00155] A análise de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos forneceu os seguintes resultados: isolado UGA *E. adenoides* 544-066A foi positivo tanto com oligonucleotídeos iniciadores de *E. adenoides* quanto de *E. meleagrimitis* 2. Isolado UGA *E. adenoides* 544-066C foi positivo tanto com oligonucleotídeos iniciadores de *E. adenoides* quanto de *E. gallopavonis*. Isolado de UGA *E. dispersa* 544-064A foi positivo tanto com oligonucleotídeos iniciadores *E. dispersa* quanto com *E. meleagrimitis* 1.

TABELA 7

Análise de PCR usando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para resolver conflitos

Estoque	Resultados de PCR (positivos)	Determinação
UGA <i>E. adenoides</i> isolado	Both <i>Eimeria adenoides</i> & <i>Eimeria meleagrimitis</i> 1 2	Contaminado com <i>Eimeria meleagrimitis</i> 2
UGA <i>E. adenoides</i> isolado	Both <i>Eimeria adenoides</i> & <i>Eimeria gallopavonis</i>	Contaminado com <i>Eimeria gallopavonis</i>
UGA <i>E. dispersa</i> isolado	Both <i>Eimeria meleagrimitis</i> 1	Contaminado com <i>Eimeria meleagrimitis</i> 1

Conclusões

[00156] Os isolados de *Eimeria* em peru foram estudados para aumentar o entendimento das relações filogenéticas entre as espécies existentes, e para validar um teste de identificação a base de PCR para os isolados de peru. As amostras referência de todas as cepas *Eimeria* em peru conhecidas nos Estados Unidos foram obtidas de uma coleção da Universidade de Georgia, em Atenas (UGA), e seu DNA foi extraído. Este DNA foi então submetido à amplificação por PCR usando conjunto de oligonucleotídeo iniciador da região Woods ITS-1, e os fragmentos resultantes foram clonados e sequenciados. A análise filogenética das sequências foi então realizada, e os

resultados comparados com isolados internos de *Eimeria* em peru, e três isolados europeus. Destas análises, uma quinta espécie distinta foi identificada. Quatro espécies de peru foram previamente reconhecidas com base na patologia da lesão, mas a presente análise de sequências indica que uma das quatro, *E. meleagriditis*, pode ser subdividida adicionalmente em duas espécies separadas, *E. meleagriditis* 1 e *E. meleagriditis* 2.

Adendo

[00157] Oligonucleotídeos iniciadores de PCR adicionais também foram criados com base na sua sequência ITS-1 dos isolados EU *Eimeria* em peru, e em uma sequência ITS-1 "desconhecida" amplificada originalmente de Coccivac-T®. A identidade destes estoques foi verificada no experimento descrito anteriormente. Estes oligonucleotídeos iniciadores adicionais foram usados para identificar os estoques descritos a seguir.

TABELA 8

Alvo	Sequências de pares de oligonucleotídeo iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto de PCR Size (bp)
<i>E. gallopavonis</i>	(5')-AGCATGAAAGCAGGGAAAGA SEQ ID NO: 45	
	(5')-TGTAACGGCTATGGGTCCTC SEOID NO: 46	347 bp
<i>E. adenoeidés</i>	(5')-AGCGTCTC I I i CTTTACTGC S ^E Q ID NO: 47 (5')-TGGTACATACACAGCCAGCAA SEC)ID NO: 48	151 -bp
<i>E. dispersa</i> (based on EU isoiate)	(5')-GTGTGAAATGGCACAGATGG SEO ID NO: 49 (5')-TACAAATGCGGCTCTCAATG SEO1D NO: 50	185 bp

EXEMPLO 3

SEQUÊNCIA CONSENSUAL PARA A REGIÃO ITS-1 DO GENE RIBOSSOMAL 18 S DE E. MELE AGRIMITIS 2

[00158] O DNA de oito isolados de campo de *Eimeria* em peru foi isolado e suas regiões ITS-1, localizadas entre os genes ribossomais 18S e 5,8S, foram amplificadas por PCR e clonados em um vetor *E. coli*. Até cinco

clones de cada isolado (a até e) foram selecionados e sequenciados. As sequências das regiões ITS-1 de cada clone foram então comparadas com as sequências referência de *E. meleagrimitis* 2 do isolado EU-E.me2 e quatro isolados UGA-E. me2. Cada sequência estende-se da primeira base após o gene de RNA ribossomal 18S até o gene de RNA ribossomal 5,8S. Uma árvore filogenética foi desenvolvida. As sequências foram analisadas por similaridade e uma sequência consensual foi gerada (SEQ ID NO: 44, ver a seguir). A sequência inclui "N's" onde existem substituições, inserções ou deleções. O tamanho que varia para as sequências ITS-1 entre os oito isolados é 394-398 bases. A sequência consensual, SEQ ID NO: 44, compartilha 87,2 – 88,5 % de homologia com os clones sequenciados Eme2 ITS1, comparado com a homologia de sequência das oito sequências umas com as outras, que mostram 93,8 - 100 % de homologia.

DETERMINAÇÕES DE SEQUÊNCIA

[00159] SEQ ID NOs. 13-44 referem-se às sequências de nucleotídeos das respectivas regiões ITS-1 e são denotadas em letras maiúsculas. SEQ ID NOs. 51 -81 referem-se à sequência completa de nucleotídeos apresentados.

[00160] As sequências mostradas a seguir não incluem todas as sequências 18S e 5,8S que preparam os fragmentos de PCR gerados pelos conjuntos de oligonucleotídeo iniciador Woods WW1/WW3r.

[00161] O texto em **negrito** é a região 18S (oligonucleotídeo iniciador WW1 é sublinhado)

[00162] O texto em *itálico* é a região 5,8S (oligonucleotídeo iniciador WW3R é sublinhado)

Isolados de UGA *E. gallopavonis*

[00163] 544-065B: Grande fragmento 5' → 3' (534 bp) SEQ ID NO.: 51
[SEQ ID NO.:13 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aaqttgcglaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggtttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTAAAG
 CATGAAAGCAGGGAAAGATACTTTTTGATCTTATCCGTTTGTTGATTGTTGTGGGACAGTCAGCTTGCATG
 AGGGTTGGGTACGAGTGTCTGCTGCTGTTCCAGGCTTATCCGGGTGGGACAAAGATTAACAACAACCTGT
 AAATCTGTTTTTTCTCACAACGAGTTTTCTTTTTTTGCCGAAAAAGTCTTTTTGCTGCTTCACTGTGTAGT
 GCGGTGTGGGTGTGGCGGCAGGTGTTGTGATCTCCATAAATCCCTCCCATGCATCATCATGACCAGTG
 TTGGGACTGGTTTGTGGTGTGATAGGGGAACGTTATGTAGAGGACCCATAGCCGTTACACAACGTTT
 CCGGCCTCAGTGTATTGCAGGGACTTTATTCTGTATATACTAACAGAATGTATATATGAAGCCAAAaaaactttcagc
aatgagatgcttg

[00164] 544-065B: Grande fragmento 5' → 3' (392 bp) SEQ ID NO.: 52

[SEQ ID NO.:14 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aaqttgcglaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggtttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTATAA
 AGCATGAAAGCAGGAAGAGACATATTTCTTTATTTGATCTCCTCCTATATCCTTCTTGAGAGATCTGCGTT
 TACGCGGCTTGATCAAGTTTGGTGGTGGTGGTCAATAGAAGAGGTGCTTTTTGACTGGTCTTTTCAGG
 CTTATTATGGGATAATATTCAACCGCAACCTGTAATCTCTTTTTCTCTCTCACAACAACGAGTTTTCTGT
 AGATTGCAATTGATGCAAGTGTATTCTGTACGCTACAGAATATAAAGGTACAAAAAGAAAAAaaaactttcagc
aatgagatgcttg

[00165] 544-065C: Grande fragmento 5' → 3' (518 bp sequenciado) SEQ

ID NO.: 53

[SEQ ID NO.:15 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aaqttgcglaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggtttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTAAAG
 CATGAAAGCAGGGAAAGATACTTTTTGATCTTATCCGTTTGTTGATTGTTGTGGGACAGTCAGCTTGCATG
 CCGGTTGGGTACGAGTGTCTGCTGCTGTTCCAGGCTTATCCGGGTGGGACAAAGATTAACAACAACCTGT
 AAATCTGTTTTTTCTCACAACGAGTTTTCTTTTTTTGCCGAAAAAGTCTTTTTGCTGCTTCACTGTGTAGT
 GCGGTGTGGGTGTGGCGGCAGGTGTTGTGATCTCCATAAATCCCTCCCATGCATCATCATGACCAGTG
 TTGGGACTGGTTTGTGGTGTGATAGGGGAACGTTATGTAGAGGACCCATAGCCGTTACACAACGTTT
 CCGGCCTCAGTGTATTGCAGGGACTTTATTCTGTATATACTAACAGAATGTATATATGAAGCCAAAaaaactttcagc
aatgagatgcttg

[00166] 544-065C: Grande fragmento 5' → 3' (3928 bp) SEQ ID NO.: 54

[SEQ ID NO.:16 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aaqttgcglaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggtttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTATAA
 AGCATGAAAGCAGGAAGAGACATATTTCTTTATTTGATCTCCTCCTATATCCTTCTTGAGAGATCTGCGTT
 TACGCGGCTTGATCAAGTTTGGTGGTGGTGGTCAATAGAAGAGGTGCTTTTTGACTGGTCTTTTCAGG
 CTTATTATGGGATAATATTCAACCGCAACCTGTAATCTCTTTTTCTCTCTCACAACAACGAGTTTTCTGT
 AGATTGCAATTGATGCAAGTGTATTCTGTACGCTACAGAATATAAAGGTGCAAAAAAGAAAAAaaaactttcagc
aatgagatgcttg

[00167] 544-065C: Grande fragmento 5' → 3' (532 bp) SEQ ID NO.: 55

[SEQ ID NO.:17 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aatgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggtttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTAAAGCATGAA
 AGCAGGGAAAGATACTTTTTGATCTTATCCGTTTGTTGATTGTTGTGGGACAGTCAGCTTGCATGCGGGTT
 GGGTCACGAATGTCTGCTGCTGTTCCAGGCTTATCCGGGTGGGACAAAGATTAACAACAACCTGTAATCT
 GTTTTTTTCTCACAACGAGTTTTCTTTTTTTGCCGAAAAAGTCTTTTTGCTGCTTCACTGTGTAGTGCAGT
 GTGGGTGTGGCGGCAGGTGTTGTGATCTCCATAAATCCCTCCCATGCATCATCATGACCAGTGTGGGT
 ACTGGTTTGTGGTGTGATAGGGGAACGTTATGTAGAGGACCCATAGCCGTTACACAACGTTTCCGGCC
 TCAGTGTATTGCAGGGACTTTATTCTGTATATACTAACAGAATGTATATATGAAGCCAAAaaaactttcagc
aatgagatgcttg

Isolados de UGA E. adenoideis

[00168] 544-066A: Pequeno Grande fragmento 5' → 3' (417 bp) SEQ ID

NO.: 56

[SEQ ID NO.:18 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTGAAG
CATGAAGGCAGAGAAAGGATGCTTTTGATCAGATATATCTGCTTTGCTTGTAGGTTTGCATTGGTTCTTGG
TAACAAGTCGCCAAGCAGATTTGCATGCATGCAGTTTGTGATCATTATTTATAGCGTCACTTTCTTTGACT
GCTGTTTATGCTTTTGTATGGATTGGACACACATTACAAAATCTGTAATCTTTTTCTTTTCTCACAACGA
GTTTTCTCTTTGAAATTTCTGGAAAGAAAGAATATAGATTGCTGGCTGTGTATGTACCAGCAGAATGTGTA
GAATGAAAAAGTTGA~~aaaactttcagcaatggaatgctttg~~

[00169] 544-066C: `Pequeno fragmento 5' → 3' (417 bp) SEQ ID NO.:
57

[SEQ ID NO.:19 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTGAAG
CATGAAGGCAGAGAAAGGATGCTTTTGATCAGATATATCTGCTTTGCTTGTAGGTTTGCATTGGTTCTTGG
TAACAAGTCGCCAAGCAGATTTGCATGCATGCAGTTTGTGATCATTATTTATAGCGTCACTTTCTTTGGCT
GCTGTTTATGCTTTTGTATGGATTGGACACACATTACAAAATCTGTAATCTTTTTCTTTTCTCACAACGA
GTTTTCTCTTTGAAATTTCTGGAAAGAAAGAATATAGATTGCTGGCTGTGTATGTACCAGCAGAATGTGTA
GAATGAAAAAGTTGA~~aaaactttcagcaatggaatgctttg~~

[00170] 544-066D: 5' → 3' (417 bp) SEQ ID NO.: 58

[SEQ ID NO.:20 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTGAAG
CATGAATGCAGAGAAAGGATGCTTTTGATCAGATATATCTGCTTTGCTTGTAGGTTTGCATTGGTTCTTGG
TAACAAGTCGCCAAGCAGATTTGCATGCATGCAGTTTGTGATCATTATTTATAGCGTCTCTTTCTTTGACT
GCTGTTTATGCTTTTGTATGGATTGGACACACATTACAAAATCTGTAATCTTTTTCTTTTCTCACAACGA
GTTTTCTCTTTGAAATTTCTGGAAAGAAAGAATATAGATTGCTGGCTGTGTATGTACCAGCAGAATGTGTA
GAATGAAAAAGTTGA~~aaaactttcagcaatggaatgctttg~~

[00171] 544-066E 5' → 3' (416 bp) SEQ ID NO.: 59

[SEQ ID NO.:21 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTGAAG
CATGAATGCAGAGAAAGGATGCTTTTGATCAGATATATCTGCTTTGCTTGTAGGTTTGCATTGGTTCTTGG
TAACAAGTCGCCAAGCAGATTTGCATGCATGCAGTTTGTGATCATTATTTATAGCGTCTCTTTCTTTGACT
GCTGTTTATGCTTTTGTATGGTTGGACACACATTACAAAATCTGTAATCTTTTTCTTTTCTCACAACGA
GTTTTCTCTTTGAAATTTCTGGAAAGAAAGAATATAGATTGCTGGCTGTGTATGTACCAGCAGAATGTGTA
GAATGAAAAAGTTGA~~aaaactttcagcaatggaatgctttg~~

Isolados de UGA *E. dispersa*

[00172] 544-064B 5' → 3' (409 bp) SEQ ID NO.: 60

[SEQ ID NO.:22 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACATTCTG
TCCAACAGGAGCTGGTATTCATTCATTTCTGTGTGAAATGGCATAGATGGGTGTTGCAAGCTTCCTGTCTT
GGGCGGCTGAGTATTGAACCTTTTATCCCTCCCAACCTTTGAATCGGTTTGTGAGTTTTCTTTCCAC
GACGAGTTTTCTTAATATTTAAAAGAATGAAAGTTGCGCCCTTGTGGCCACTCATTGAGAGCCGCATTTG
TAACTGCTCTCGTGAGCAGTGAAGCGGGGCTTTTTCAGTGAGTGGCTGCATGCGCGCATGCGTAATATT
TATCAGCTCTT~~aaaactttcagcaatggaatgctttg~~

[00173] 544-064C 5' → 3' (409 bp) SEQ ID NO.: 61

[SEQ ID NO.:23 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aaqttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACATTCTG
 TCCAACAGGAGCTGGTATTTCATTCTTCTGTGTGAAATGGCACAGATGGGTGTTGCAAGCTTCCTGTCTT
 GGGCGGCTGAGTATTGAACCTTTTTATCCCTCCCACAACCTTTGAATCGGTTTGTGAGTTTTCTTTCCAC
 GACGAGTTTTCTTAAAATTTAAAAGAATGAAAGTTGCGCCCTTGCTGGTCACTCATTGAGAGCCGCATTGG
 TAACTGCTCTCGAGAGCAGAGGAAGCGGGCTTTTTAGGTGAGTGGCTGCATGCGCGCATGCGTAATAT
 TTATCAGCTCTT~~aaaacttcagcaatggatgcttg~~

Isolados de UGA *E. meleagrimitis*

[00174] 544-067C 5' → 3' (405 bp) SEQ ID NO.: 62

[SEQ ID NO.:24 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aaqttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACATTTTC
 GGTCGCGCAACAAAAGGAGCCTCTCTCCTCCGTTCACTCCTTTCTGCTGCAATTCAGTGGAAATGTGG
 GGTGTGCAGATGGTCTGTGTGACGGCTTTTTGTCTTGTGGCCGACTGGAATCCTTTTTGAACCTTTTTA
 ATTCTCCCAACCTTTGAATCGGTTAAGAGTTTTCTTCCCACGACGAGTTTTCTTTGAGAATAAAAGAGAAT
 GTGTTGCGCAGGTGGCTGCTTGTCTCGTTGAGAGTGGCTGGGCTGCATGCGCGCATGCGAAGAGAGAAA
 AAAGGACCC~~aaaacttcagcaatggatgcttg~~

[00175] 544-067D 5' → 3' (405 bp) SEQ ID NO.: 63

[SEQ ID NO.:25 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aaqttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACATTTTC
 CGCGAACAACAAAAGGAGCCTCTCTCCTCCGTTCACTCCTTTCTGCTGCAATTCAGTGGAAATGTGGGTG
 GCAGATGGTCTGTGTGACGGCTTTTTGTCTTGTGGCCGACTGGAATCCTTTTTGAACCTTTTTAATTCC
 TCCCAACCTTTGAATCGGTTAAGAGTTTTCTTCCCACGACGAGTTTTCTTTGAGAATAAAAGAGAATGTGTT
 GCGCAGGTGGCTGCTCGCTCGTTGAGAGTGGCTGGGCTGCATGCGCGCATGCGAAGAGAGAAAAAAGG
 ACCC~~aaaacttcagcaatggatgcttg~~

[00176] 544-067E 5' → 3' (404 bp) SEQ ID NO.: 64

[SEQ ID NO.:26 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aaqttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACATTTTC
 GGTCGCGCAACAAAAGGAGCCTCTCTCCTCCGTTCACTCCTTTCTGCTGCAATTCAGTGGAAATGTGG
 GGTGTGCAGATGGTCTGTGTGACGGCTTTTTGTCTTGTGGCTGACTGGAATCCTTTTTGAACCTTTTTA
 ATTCTCCCAACCTTTGAATCGGTTAAGAGTTTTCTTCCCACGACGAGTTTTCTTTGAGAATAAAAGAGAAT
 GTGTTGCGCAGGTGGCTGCTCGCTCGTTGAGAGTGGCTGGGCTGCATGCGCGCATGCGAAGCGAGAAA
 AAAGGACCC~~aaaacttcagcaatggatgcttg~~

[00177] 544-067F 5' → 3' (405 bp) SEQ ID NO.: 65

[SEQ ID NO.:27 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aaqttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACATTTTC
 GGTCGCGCAACAAAAGGAGCCTCTCTCCTCCGTTCACTCCTTTCTGCTGCAATTCAGTGGAAATGTGG
 GGTGTGCAGATGGTCTGTGTGACGGCTTTTTGTCTTGTGGCCGACTGGAATCCTTTTTGAACCTTTTTA
 ATTCTCCCAACCTTTGAATCGGTTAAGAGTTTTCTTCCCACGACGAGTTTTCTTTGAGAATAAAAGAGAAT
 GTGTTGCGCAGGTGGCTGCTCGCTCGTTGAGAGTGGCTGGGCTGCATGCGCGCATGCGAAGCGAGAAA
 AAAGGACCC~~aaaacttcagcaatggatgcttg~~

[00178] 544-067G 5' → 3' (407 bp) SEQ ID NO.: 66

[SEQ ID NO.:28 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aaqttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACATTTTC
 GGTCGCGCAACAAAAGGAGCCTCTCTCCTCCGTTCACTCCTTTCTGCTGCAATTCAGTGGAAATGTGG
 GGTGTGCAGATGGTCTGTGTGACGGCTTTTTGTCTTGTGGCCGACTGGAATCCTTTTTGAACCTTTTTA
 ATTCTCCCAACCTTTGAATCGGTTAAGAGTTTTCTTCCCACGACGAGTTTTCTTTGAGAATAAAAGAGATG
 TGTTGCGCAGGTGGCTGCTCGCTCGTTGAGAGTGGCTGGGCTGCATGCTGCGCGCATGCGAAGAGAGAA
 AAAAGGACCC~~aaaacttcagcaatggatgcttg~~

[00179] 544-064A 5' → 3' (405 bp) SEQ ID NO.: 67

[SEQ ID NO.:29 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACATTTTC
GGTCGCGCGAACAAAAGGAGCCTCTCTCTCCTCCGTTCACTCCTTTCTGCTGCAATTCAGTGGAAATGTGG
GGTGTGCAGATGGTCGTGTGTGACGGCTTTTGTCTTGTGGCCGACTGGAATCCTTTTTGAACCTTTTTA
ATTCCTCCCAACCTTTGAATCGGTTAAGAGTTTTCTCCACGACGAGTTTTCTTTGAGAATAAAAGAGAAT
GTGTTGCGCAGGTGGCTGCTCGCTCGTTGAGAGTGGCTGGGCTGCATGCGCGCATGCGAAGAGAGAAA
AAAGGACCCaaaactttcagcaatgagatgcttg

[00180] 544-065A5' → 3' (405 bp) SEQ ID NO.: 68

[SEQ ID NO.:30 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

Isolados de UGA *E. meleagrimitis*

[00181] 544-066A Grandes fragmentos 5' → 3' (500 bp) SEQ ID NO.: 69

[SEQ ID NO.:31 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACATTTTC
GGTCGCGCGAACAAAAGGAGCCTCTCTCTCCTCCGTTCACTCCTTTCTGCTGCAATTCAGTGGAAATGTGG
GGTGTGCAGATGGTCGTGTGTGACGGCTTTTGTCTTGTGGCCGACTGGAATCCTTTTTGAACCTTTTTA
ATTCCTCCCAACCTTTGAATCGGTTAAGAGTTTTCTCCACGACGAGTTTTCTTTGAGAATAAAAGAGAAT
GTGTTGCGCAGGTGGCTGCTCGCTCGTTGAGAGTGGCTGGGCTGCATGCGCGCATGCGAAGAGAGAAA
AAAGGACCCaaaactttcagcaatgagatgcttg

[00182] 544-067A 5' → 3' (502bp) SEQ ID NO.: 70

[SEQ ID NO.:32 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTTGATG
CATGCAGCAAGCTGGAAGGTGCCTGTTTGTATGTGGGAAGTGCATTTATTATGCACACCTGCATTCATG
CGAGGTTACTGTCAATCCGGCGACTGCATGTATGGCTTCTTGGACCGCAATAACAACCTGTAAATCTCTTT
TCTTCTCCACAACGGTTTTCTTTGTTTACGGTACTTTATTTGTGTACCACAACTATAAGTTGTTGGGGTTT
TCAGCTGCTTCACTGTGCTACTGGATGATAGGCTAGCTGCATTTGTTTTGCCGGTCGGGGTTGTTGTTG
GCAGGCACAGCATGGCAGCAGGGCTGTCGGCAGTGGCAGGTGTTTGCAGTTGTGTACCATTTAATTCTG
CTAAAGAGCAGAATGATTTGTTTACAAAAAAAaaaactttcagcaatgagatgcttg

[00183] 544-067B 5' → 3' (503 bp) SEQ ID NO.: 71

[SEQ ID NO.:33 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTTGATG
CATGCAGCAAGCTGGAAGGTGCCTGTTTGTATGTGGGAAGTGCATTTCTTATGCACACCTGCATGCATG
TGAGGTTACTGTCAAGCCGGCGACTGCATGTATGGCTTCTTGGACCGCAATAACAACAACCTGTAAATCT
CTTTTCTCTCCACAACGGTTTTCTTTGTTTACGGTACTTTATTTGTGTACCACAACTATAAGTTCTTGGG
GTTTTCAGCTGCTTCACTGTGCTACTGGATGATAGGCTAGCTGCATTTGTTTTGCCAGTCGGGGTTGCTGT
TTGGCAGGCACAGCATGGCAGCAGGGGTGTTGGCAGTTGCAGTGTTCAGTTGTATACCATTTAATTCT
GCTGAAGAGCAGAATGTTTTGTTTACAAAAAAAaaaactttcagcaatgagatgcttg

[00184] 544-068A 5' → 3' (501 bp) SEQ ID NO.: 72

[SEQ ID NO.34 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTTGATG
CATGCAGCAAGCTGGAAGGTGCCTGTTTGTATGTGGGAAGTGCATTTCTTATGCACACCTGCATGCATG
TGAGGTTACTGTCAAGCCGGCGACTGCATGTATGGCTTCTTGGACCGCAATAACAACAACCTGTAAATCT
CTTTTCTCTCCACAACGGTTTTCTTTGTTTACGGTACTTTATTTGTGTACCACAACTATAAGTTCTTGGG
GTTTTCAGCTGCTTCACTGTGCTACTGGATGATAGGCTAGCTGCATTTGTTTTGCCAGTCGGGGTTGCTGT
TTGGCAGGCACAGCATGGCAGCAGGGGTGTTGGCAGTTGCAGTGTTCAGTTGTATACCATTTAATTCT
GCTGAAGAGCAGAATGTTTTGTTTACAAAAAAAaaaactttcagcaatgagatgcttg

Isolados de US-SPAH

[00185] *E. adenoides* SPAH-US (CAD) 5' → 3' (417 bp) SEQ ID NO.:

75

[SEQ ID NO.37 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTGATG
 CATGCAGCAAGCTGGAAAGGTGCCTGTTTGTATGTGGGAAGTGCATTTCTTATGCACACCTGCATGCATG
 TGGGGTTACTGTCAATCCGGCGACTGCATGTATGGCTTCTTGGACCGCAATAACAACAACCTGTAATCT
 CTTTTCTTCTCCACAACGGTTTTTCTTTGTTTACGGTGTCTTATTTGTGTACCACAACATAAGTTGTTGG
 GGTTTTCAGCTGCTTCACTGTGCTACTGGATGACGGGCTAGCTGCATTTATTTGCCAGTCGGGGTTGCT
 GTTCGGCAGGCACAGCATGGCAGCAGGGCTGTCCGCAGTGGCAGGTGTTTGCAGTTGTATACCATTTAA
 TTCTGCTGÁAGAGCAGAATGTTTTGTTTACAAAAaaaactttcaaccaatggaatgcttg

[00186] *E.meleagrimitis* SPAH-US (Eme) 5' → 3' (403 bp) SEQ ID NO.:

76

[SEQ ID NO.38 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTGAAG
 CATGAAGKGCAGAGAAAGGATGCTTTTGATCAGATATATCTGCTTGGCTTGTAGGTTTGCATTGGTTCTTGG
 TAACAAGTCGCCAAGCAGATTTGCATGCATGCAGTTTTGTGATCATTATTTATAGCGTCTCTTTCTTTGACT
 GCTGTTTATGCTTTTGTATGGATTGGACACACATTACAAAATCTGTAATCTTTTTCTTTCTCACAACGA
 GTTTTCTCTTTGAAATTTCTGGAAAGAAAGAATATAGATTGCTGGCTGTGTATGTACCAGCAGAATGTGTA
 GAATGAAAAGTTGAAaaaactttcaaccaatggaatgcttg

[00187] *E.gallopavonis* SPAH-US (Ega) Grande fragmento 5' → 3' (538 bp) SEQ ID NO.: 77

[SEQ ID NO.39 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACATTTTC
 GGTCCGCGGAACAAAAGGAGCCTCTCTCTCCTCCGTTCACTCCTTTCTGCTGCAATTCAGTGGAAATGTGG
 GGTGTGCAGATGGTGGTGTGTGACGGCTTTTGTCTTGTGGCCGACTGGAATCCTTTTTGAACCTTTTTA
 ATTCTCCCAACCTTTGAATCGGTTAAGAGTTTTCTTCCCACGACGAGTTTTCTTTGAGAATAAAAGAGAAT
 GTGTTGCCAGGTGGCTGCTCGCTCGTTGAGAGTGGCTGGGCTGCATGCCGCGCATGCCGAAGAGAGAAA
 AAAGGACCCAaaaactttcaaccaatggaatgcttg

[00188] *E.gallopavonis* SPAH-US (Ega) Pequeno fragmento 5' → 3' (392 bp) SEQ ID NO.: 78

[SEQ ID NO.40 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

taagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTAAA
 GCATGAAAGCAGGGAAAGATACTTTTTGATCTTATCCGTTTGTGATTGTTGTGGGACAGTCAGCTTGCAT
 GCCGGTTGGGTACAGAGTGTCTGCTGCTGTTTCAAGCTTATCCGGGTGGGACAAAAGATTAACAACAACCT
 GTAAATCTGTTTTTTTTCTCACAACGAGTTTTTTTTTTTGGCGAAAAGTCTTTTTGCTGCTTCACTGTGTA
 GTGCCGTTGTGGGTGTGGCGGCAGGTGTTGTGATCTCCATAACTCCCCTCCCATGCATCATCATGACCAG
 TGTTGGTACTGGTTTGTGGTGTGATAGGGGAACGTTATGTAGAGGACCCATAGCCGTTACACAACGT
 TTCCGGCCTCAGTGTATTGCAGGGACTTTATTCTGTATATACTAACAGAATGTATATATGAAGCCAAAAaaa
 cttcaaccaatggaatgcttg

Isolados de Referência EU

[00189] *E.meleagrimitis*- 5' → 3' (4753 bp) SEQ ID NO.: 73

[SEQ ID NO.35 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

aagttgcgtaaatagagccctctaaaggatgcaaaagtcgtaacacggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTATAA
 AGCATGAAAGCAGGAAGAGACATATTTCTTTATTTGATCTCCTCCTATATCCTTCTTGAGAGATCTGCGTT
 TACCGGGCTTGATCAAGTTTGGTGGTGGTGGTCAATAGAAGGTTGCTTTTTGACTGGTCTTTTCAAG
 CTTATTATGGATAAATTTCAACCACAACCTGTAATCTCTTTTTCTCACAACAACGAGTTTTCTGTA
 GATTGCAATGATGCAAGTGTATTCTGTACGCTACAGAATATAAAGGTACAAAAAGAAAAAAAaaaactttcaaccaatggaatgcttg

[00190] *E.gallopavonis* Grande fragmento 5' → 3' (506 bp) SEQ ID NO.: 74

[SEQ ID NO.36 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

gcatgcagtcgtacacgggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTGATGCATGCAGCAAGCTGGAAAGGTG
CCTGTTTGTATGTGGGAAGTGCATTTCTTATGCACACCTGCATTGCAGGTTACTGTCAATCCGGCGA
CTGCATGTATGGCTTCTTGGACCGCAATAACAACAACCTGTAATCTCTTTTCTCTCCACAACGGTTTTTC
TTTTGTTTACGGTACTTTATTTGTGTACCACAACATAAGTTGTTGGGGTTTTCAGCTGCTTCACTGTGCTA
CTGGATGATAGGCTAGCTGCATTTGTTTTGCCGGTCGGGGTTGTTGTTCCGGCAGGCACAGCATGGCAGC
AGGGCTGTCGGCAGTGGCAGGTGTTGCAGTTGTATACCATTAATTCTGCTAAAAAGCAAAATGTTTTGT
TTACAAAAAAAATTTTTCAACGGTGGTTTTGAGGAA

[00191] *E.gallopavonis* Pequeno fragmento 5' → 3' (355 bp) SEQ ID NO.: 79

[SEQ ID NO.41 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

gtcgtcaagtcgtacacgggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTAAAGCATGAAAGCAGGGAAGATACT
TTTTGATCTTATCCGTTTGTGATTGTTGTGGGACAGTCAGCTTGCATGCGGGTTGGTCCAGAGTGTCTG
CTGCTGTTCCAGGCTTATCCGGGTGGGACAAAGATTAACAACAACCTGTAATCTGTTTTTTCTCACAAACG
AGTTTTCTTTTTTCCGAAAAAGTCTTTTTGCTGCTTCACTGTGTAGTGCGGTGTGGGTGTGGCGGCAG
GTGTTGTGATCTCCATAACTCCCTCCCATGCATCATCATGACCAGTGTGGGTACTGGTTTGTGGTGCT
GATAGGGGAACGTTATGTAGAGGACCCATAGCCGTTACACAACGTTTCCGGCCTCAGTGTATTGCAGGGA
CTTTATTCTGTATATACTAACAGAATGTATATATGAAGCCAAAAaaactttcagcaatgagatgcttga

[00192] *E.dispersa* 5' → 3' (373 bp) SEQ ID NO.: 80

[SEQ ID NO.42 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

gtaatcagtcgtacacgggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTATAAAGCATGAAAGCAGGAAGAGACAT
ATTTCTTTTATTTGATCTCTCTCTATATCTTCTTGGAGAGATCTGCGTTTACGCGGCTTGATCAAGTTTGGT
GGTGGTTGGTCAATAGAAGAGGTGCTTTTTGACTGGTCTTTCAGGCTTATTATGGGATAATATCAACC
GCAACCTGTAATCTCTTTTTCTCTCACAAACAACGAGTTTTCTGTAGATTGCAATTGATGCAAGTGTAT
TCTGTACGCTACAGAATATAAAGGTACAAAAAGAAAAAaaactttcagcaagggga

Isolados de UK-SPAH

[00193] *E.meleagrimitis* -2 SPAH-UK 5' → 3' (268 bp) SEQ ID NO.: 81

[SEQ ID NO.43 é a região ITS-1, mostrada em Letras Maiúsculas]

cggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcACACGTGATGCATGCAGCAAGCTGGAAAGGTGCCTGTTTGTATGTG
GGAAGTGCATTTCTTATGCACACCTGCATGCATGTGAGGTTACTGTCAATCCGGCGACTGCATGTATGGC
TTCTTGGACCGCAATAACAACAACCTGTAATCTCTTTTCTCTCCACAACGGTTTTTCTTTTGTACGGT
ACTTTATTTGTGTACCACAACATAAGTTGTTGGGGTTTTCAGCT

Sequência de consenso *E.meleagrimitis* -2

[00194] Sequência de consenso *E.meleagrimitis* -2 5' → 3' (409 bp) SEQ ID NO.: 44

ACACGTGANGCATGCANNAGCTGGAAANNNGCCTGTTTGTATGTGGGAAGTGCATTTNTTATGCACAC
CTGCATNCATGNGNGGTTACTGTCAANCCGGCGANCTGCATGTATGGCTTCTTGGACCGCAATAACANN
ACCTGTAATCNCNTTTTTNNTCTCCACAACGGTTTTTNTTTGTTTACGGTNCNTTATTTGTGTACCACAAC
ATAAGTTNTGGGGTTTTTCNGCTGCTTCACTGTGCTACTGGNTGANNNNNNGGCTAGCTGCATTTNTTTG
CCNGTCGGGGTTGNTGTTNGGCAGGCNCAGCATGGCAGCAGGGNTGTNGGCAGTNGCAGNNGTTTGCA
GTTGNNTACNATTTANTTCTGCTNAANAGCANNATGNTTTGTTTACAAAAAANNNN (5.8S end)

Onde “N” pode ser qualquer nucleotídeo ou nenhum nucleotídeo

[00195] Entende-se que esta invenção não é limitada a configurações,

etapas do processo e materiais particulares aqui revelados, tais como configurações, etapas do processo e materiais, que podem variar um pouco. Entende-se também que a terminologia aqui empregada é usada com o propósito apenas de descrever modalidades particulares e não pretende-se que sejam limitantes, uma vez que o escopo da presente invenção será limitado apenas às reivindicações em anexo e equivalentes destas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de que compreende *E. meleagridis* 2 e *E. meleagridis* 1.

2. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente uma ou mais espécies adicionais de *Eimeria* selecionadas do grupo que consiste em *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. dispersa*, *E. innocua* e *E. subrotunda*.

3. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a espécie adicional de *Eimeria* é *E. adenoides*.

4. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente *E. meleagridis*.

5. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente *E. dispersa*.

6. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um parasita do gênero *Coccidia* selecionado do grupo que consiste em *Isospora*, *Cystoisospora*, e *Cryptosporidium*.

7. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que *E. meleagridis* 2 é uma cepa não atenuada.

8. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que *E. meleagridis* 1 é uma cepa não atenuada.

9. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que compreende de cerca de 10 a cerca de 1000 oocistos de cada *E. meleagridis* 2 e *E. meleagridis* 1.

10. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que *E. meleagridis* 2 é uma cepa atenuada.

11. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que *E. meleagridis* 1 é uma cepa atenuada.

12. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 11,

caracterizada pelo fato de que a quantidade de oocistos é de cerca de 100 a cerca de 10000 oocistos de cada *E. meleagridis* 2 e *E. meleagridis* 1.

13. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que compreende merozoítas.

14. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para imunizar um peru contra a coccidiose.

15. Uso de uma composição contra *E. meleagridis* 2 que compreende uma quantidade imunologicamente efetiva *E. meleagridis* 2, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para imunizar um peru contra a coccidiose.



FIG. 1

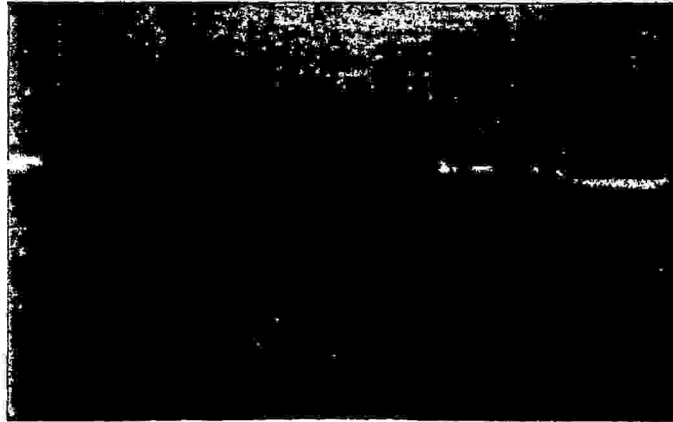


FIG. 2

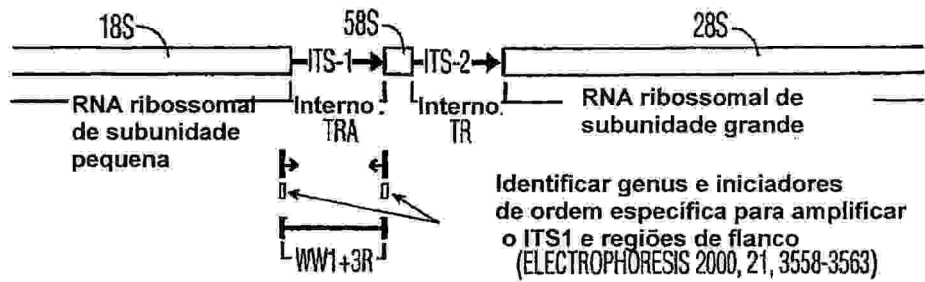


FIG. 3A

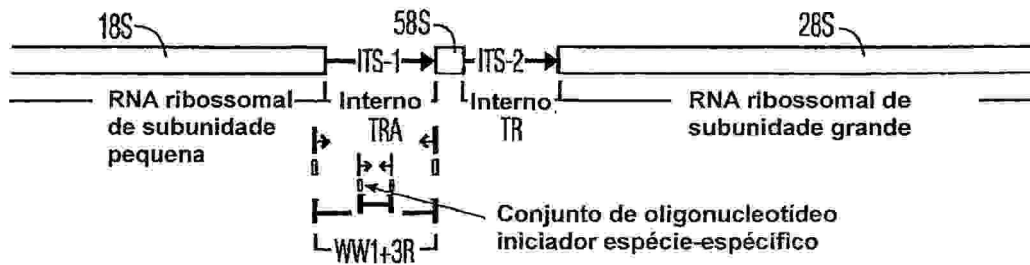


FIG. 3B

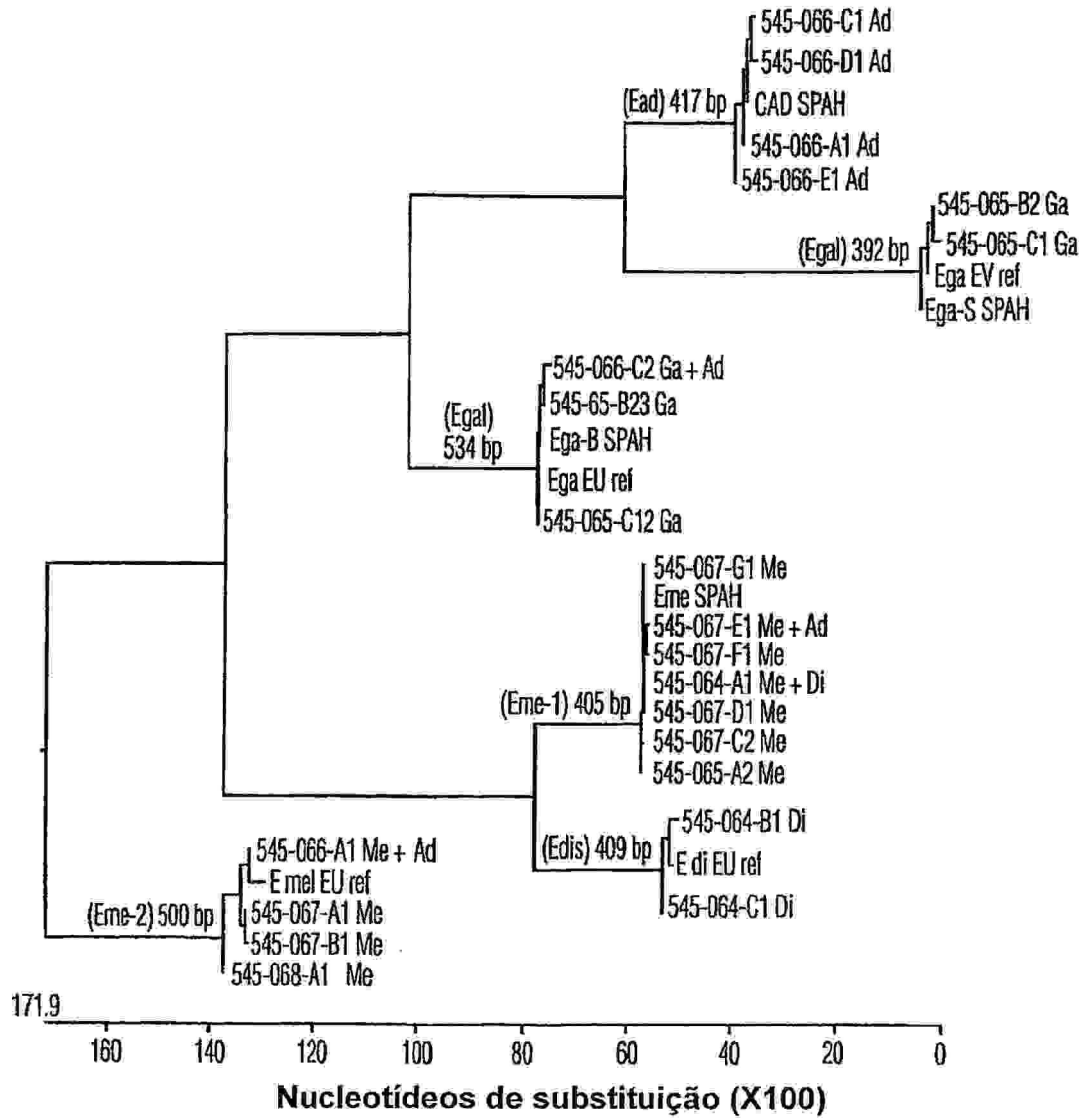


FIG. 4