



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00810**

(22) Data de depozit: **29.10.2014**

(41) Data publicării cererii:
29.05.2015 BOPI nr. **5/2015**

(71) Solicitant:
• **ROMVAC COMPANY S.A.**,
ȘOS. CENTURII NR. 7, VOLUNTARI, IF, RO

(72) Inventatori:
• **PĂTRAȘCU IONEL VICTOR**,
CALEA DOROBANȚI NR. 136-138, AP. 3,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• **CHIURCIU VIORICA**, STR. CIOCÂRLIEI
NR. 32, BL.24, AP. 36, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **CHIURCIU CONSTANTIN**,
STR. MIHAI BRAVU NR. 17, AFUMAȚI, IF,
RO;
• **TOPILESCU GEORGIANA**,
STR. MAIOR VASILE BĂCILĂ NR. 13,
BL. 19, AP. 63, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **MIHAI IULIANA**, STR. LANTERNEI NR. 95,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) PRODUCEREA ȘI FOLOSIREA OULUI HIPERIMUN - PC2

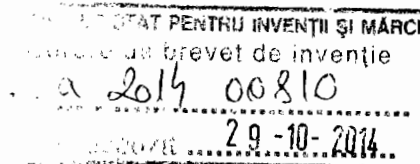
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs imunologic pe bază de imunoglobuline de pasăre. Procedeu conform invenției constă în imunizarea unor găini outoare convenționale, cu o masă antigenică formată dintr-un amestec de bacterii, virusuri, ciuperci inactivate în asociere cu un adjuvant uzual, după care se fac testele de evaluare a

răspunsului imun la antigen, găinile care prezintă răspuns pozitiv fiind admise în producția de ouă, din care sunt selectate exemplarele de ouă care conțin în gălbenuș 100...200 mg IgY, respectiv, 10...20 mg IgY specific, și se prelucrează în vederea conservării.

Revendicări: 5





90

PRODUCEREA ȘI FOLOSIREA OULUI HIPERIMUN PC2

Inventatori:

Pătrașcu Ionel Victor, Chiurciu Viorica, Chiurciu Constantin,

Topilescu Georgiana si Mihai Iuliana

Domeniul tehnic

Medicină, imunologie, anticorpi policlonali, tratamente preventive și curative prin imunizare pasivă, susținerea imunologică a stării de sănătate convenabilă a persoanelor cu vârsta de peste 60 de ani și a stării de sănătate a pacienților cu imunosupresie.

Prezenta invenție descrie o metodă de producere a oului hiperimun polivalent IMUNOINSTANT. Prezenta invenție are o relație directă cu modul de preparare a antigenului complex, înalt purificat din amestecul a mai multor tulpini bacteriene rezistente la antibiotice sau standard, de la mai multe specii de bacterii. Prezenta invenție are o relație directă cu modul de preparare a antigenului prin amestecul celulelor bacteriene inactivate, levurilor și virusurilor cu un adjuvant special QS21.

Descrierea invenției:

Prezentarea stadiului tehnicii inclusiv bibliografie

În cursul anului 1996 prof. Dr. Roy Walford (1) a stabilit ca declinul biologic al adultului se datorează îmbătrânirii imunologice a organismului numită imunosenescența. Dr. Walford explică în detaliu faptul că declinul sistemului imun este cauza majoră a îmbătrânirii sistemice, incluzând creșterea riscului apariției cancerului, infecțiilor și a inflamațiilor¹.

Preocuparea cercetătorilor de a găsi diverse soluții de tratare a bolilor începe de cele mai multe ori prin studierea sistemului imun uman. Fără acest "perete invizibil" de apărare asigurat de un sistem imun bine reglementat, omul este susceptibil de aproape orice boală imaginabilă, de la pneumonie, la artrită și diabet²⁻⁴. Chiar și cancerul sau bolile cardiovasculare profită rapid de punctele slabe sau de supraactivitatea funcțiilor imune normale^{5,6}.

Infecțiile și cancerul apar atunci când sistemul imun își pierde capacitatea normală de supraveghere sau control intens⁷. Bolnavii de cancer sunt deosebit de vulnerabili la infecții deoarece atât boala cât și terapiile aplicate pentru tratamentul ei slăbesc în continuare sistemul imun. Pe de altă parte, bolile autoimune apar atunci când restricțiile naturale ale reactivității sistemului imun scad, permițând să apară în loc un răspuns inflamator necontrolat care, la rândul său, poate crește riscul apariției cancerului^{8,9}.

Veștile bune sunt reprezentate de faptul că prin protejarea sau chiar oprirea îmbătrânirii sistemului imun putem întârzia substanțial impactul patologic al îmbătrânirii însăși^{10,11}. Oamenii de știință caută în mod constant noi metode de stimulare a imunității prin intermediul suplimentelor alimentare, dietelor, exercițiilor, odihnei și bineînțeles prin intermediul medicației costisitoare la care face apel industria farmaceutică.

Oamenii de știință au descoperit un mod foarte interesant de a asigura un suport imunologic natural utilizând proteinele imuno-protectoare din componența ouălor de găină. Această descoperire promite să crească în mod substanțial imunitatea organismului pentru doar o fracțiune din costul medicamentelor¹². Acestea sunt vești bune pentru fiecare dintre noi odată cu înaintarea în vârstă și totodată sunt vești grozave pentru toți aceia a cărui sistem imunitar este vulnerabil, precum bolnavii de cancer sau cei care trăiesc cu HIV/AIDS.

Studii făcute recent cu privire la susținerea biologică a organismului uman în perioada de bătrânețe folosind oul hiperimun au dovedit că imunoglobulinele reacționează specific cu germeii patogeni pentru care au fost produse în organismul găinilor imunizate. Această activitate se reflectă și asupra mucoasei intestinale unde îmbunătățește funcțiile membranei celulare dar și prin crearea unui confort biologic prin neutralizarea toxinelor din conținutul digestiv. Consumul de ouă hiperimune protejează sau chiar oprește îmbătrânirea sistemului imun și chiar să întârzie substanțial impactul patologic al îmbătrânirii însăși^{10,11}. Consumul de ouă hiperimune permite să crească în mod substanțial imunitatea organismului pentru doar o fracțiune din costul medicamentelor¹².

În ultimii 25 de ani a crescut utilizarea găinilor pentru producția de anticorpi, în locul mamiferelor. Cel mai mare avantaj îl constituie faptul că anticorpii se prelevă din ou în loc de ser. În același timp cantitatea de anticorpi produși de către o găina ouătoare este mai mare de cât cantitatea de anticorpi produși de către un mamifer de aceeași dimensiune. Purificarea imunoglobulinelor de la mamifere este consumatoare de timp și scumpă. Astăzi găinile sunt recunoscute ca o sursă ieftină și convenabilă de anticorpi. Cantitatea de imunoglobulină produsă dintr-un ou este egală cu cea preparată din 300 ml de sânge prelevat de la iepure.

În prezent ouăle pot fi personalizate astfel încât, prin consumul acestora, să asigure diferite tipuri de imunitate. S-au utilizat un număr de 24 de organisme diferite pentru imunizarea unei singure găini care apoi poate produce ouă capabile să ofere imunizare pasivă pentru toate aceste organisme¹⁴.

Controlul colesterolului. Ateroscleroza este o altă manifestare a imunosenescenței. Controlul din ce în ce mai scăzut asupra inflamațiilor facilitează formarea plăcilor arteriale într-un proces numit de americani "inflamm-aging"¹⁸⁻¹⁹. Institutul de cercetare al armatei US privind medicina mediului înconjurător a devenit interesată de acest proces datorită numărului extrem de mare al soldaților care prezentau un nivel crescut al colesterolului și au hotărât studierea potențialului extractului de ou hiperimun în scăderea riscului cardiovascular²⁰.

S-a descoperit stabilizarea colesterolului soldaților care au folosit băuturi ce conțineau pudră de ou hiperimun în comparație cu grupul de control tratat cu placebo, la care nivelul de colesterol era în continuă creștere²⁰. Această descoperire contrazice prejudecățile generale legate de faptul că oul este sursa creșterii colesterolului.

La acest studiu de 26 de săptămâni a participat personalul militar având un nivel de colesterol estimat la peste 180 mg/dL²⁰. Toți subiecții au avut aceleași caracteristici fizice și au participat, pe parcursul studiului, la un program de educație alimentară pentru a reduce consumul de grăsime și colesterol. Până la sfârșitul studiului, nivelul de colesterol total al grupului de control a crescut, în timp ce subiecții din grupul suplimentat nu au arătat nici o schimbare. În mod similar, la subiecții tratați cu placebo, raportul colesterolului total la HDL a crescut, în timp ce din nou nici o schimbare nu a fost observată în grupul suplimentat. Aceste constatări au demonstrat cercetătorilor faptul că oul hiperimun ar putea modifica în mod benefic reglementarea nivelului de lipoproteine serice, reducând riscul bolilor cardiovasculare²⁰.

Lupta împotriva inflamației și artritei. În timpul declinului imunitar organismul uman poate experimenta o creștere a reactivității sistemului imun sub forma unei inflamații excesive. Acest paradox apare datorită faptului că sistemul imun include mecanisme puternice de apărare care în mod normal controlează inflamația odată ce adevărata amenințare a dispărut. Prin deteriorarea funcțiilor imunologice organismul devine vulnerabil la condițiile caracterizate de inflamația excesivă¹⁸.

Odată cu îmbătrânirea, funcția de reglare a imunității scade și odată cu această scădere crește riscul apariției bolilor autoimune cronice precum lupusul sau artrita reumatoidă. În mod normal aceste condiții sunt dificil de tratat însă oul hiperimun a demonstrat un succes considerabil în reducerea inflamațiilor de acest gen, pe modele animale^{14,21-23}.

Cercetările făcute pe subiecți umani la Weill Cornell Graduate School of Medical Sciences a demonstrat puterea terapiei cu ouă hiperimune la pacienți cu diferite forme de artrite²⁴. S-a evidențiat o ameliorare semnificativă a pacienților după începerea suplimentării incluzând și bolnavii cu artrită reumatoidă. Această îmbunătățire a stării pacienților s-a păstrat până la 30 de zile după întreruperea tratamentului. Cercetătorii au concluzionat studiul prin faptul că preparatele din ou hiperimun pot reduce încărcarea intestinală cu organisme care au tendința de a reacționa încrucișat cu țesutul uman în timpul răspunsului autoimun²⁴.

Sănătatea cavității bucale. Imunosenescența aduce cu ea numeroase schimbări negative în interiorul cavității bucale mai ales privind dinții și gingiile care pot ascunde germeni patogeni și inflamații care contribuie în ultimă instanță la condiții cronice precum bolile cardiovasculare²⁵⁻²⁶. Placa dentară este un adevărat biofilm de bacterii și molecule inflamatorii care cresc riscul inflamațiilor cavităților sau gingivite).

S-a demonstrat că extractul de ou hiperimun poate reduce volumul de microorganisme de la nivelul plăcii dentare fapt ce duce la scăderea inflamațiilor în gură²⁷. Deasemenea, un lot de animale suplimentate cu ou hiperimun împotriva bacteriilor care cauzează cariile au dezvoltat un număr mult mai redus de carii decât lotul de control²⁸⁻²⁹. Gargara făcută cu ou hiperimun a fost deasemenea utilizată cu succes la oameni în scopul reducerii bolilor cauzate de bacterii; aparent extractul rămâne activ și prezent la nivelul gurii cel puțin peste noapte, oferind protecție de lungă durată³⁰⁻³². În această luptă contra bolilor de dinți sau gingii s-au folosit și paște de dinți sau gume de mestecat ce conțin extracte de ou hiperimun³³.

Infecțiile gastrointestinale. Imunosenescența are implicații și la nivelul tractusului gastrointestinal (GI), considerat a fi unul dintre cele mai mari organe care crează legătura corpului uman cu lumea înconjurătoare. În timpul protecției imunologice normale tractului GI permite trecerea selectivă a nutrienților și fluidelor benefice excluzând milioanele de organisme dăunătoare. Tractul GI normal secretă anticorpi IgA benefici care cătușesc și izolează bacteriile. Deasemenea, tractul GI conține propriul set de celule vigilente specifice sistemului imunitar care recunosc și acționează instantaneu împotriva amenințărilor.

Odată cu îmbătrânirea toate aceste funcții ale tractului GI scad, lăsându-ne vulnerabili nu numai față de infecțiile legate de sistemul digestiv sau diaree ci și față de alte afecțiuni maligne precum cancerul de colon, una dintre cele mai grave afecțiuni întâlnită la persoanele în vârstă³⁴⁻³⁶. Suprainfecția bacteriană, care se extinde în intestinul subțire, este o problemă importantă, care este frecvent diagnosticată greșit la vârstnici³⁷.

Cele mai comune infecții virale ale tractului GI nu răspund la antibiotice sau chiar sunt exacerbate de acestea³⁸⁻³⁹. Trebuie să se găsească o metodă mai eficientă care să nu implice omorârea organismelor cu chimicale ci mai degrabă să le inactiveze și să le împiedice răspândirea. Oul hiperimun oferă exact această abordare. Cele mai cunoscute microorganisme nocive la om sunt bacteriile *Salmonella* și *E. coli* și rotavirusul. În studiile efectuate pe animale eficacitatea preparatelor din ou hiperimun împotriva acestor bacterii este aproape de 100%, chiar dacă tratamentul este făcut după infectare⁴⁰⁻⁴⁴. De exemplu, șoarecii au fost protejați împotriva rotavirusului și infecțiilor cu *Salmonella* prin administrarea orală de ou hiperimun⁴⁴⁻⁴⁶. Animale utilizate în experiment au primit și o protecție parțială împotriva altor tulpini decât cele pentru care au fost inițial imunizate găinile⁴²⁻⁴⁴. De importanță egală pentru responsabilii de sănătate publică subiecții suplimentați cu ou hiperimun nu excretă aproape deloc virusuri sau bacterii în comparație cu nivelul extrem de ridicat de transmisie a acestor microorganisme observate la animalele de control⁴⁷⁻⁵⁰. Oul hiperimun este eficient ca tratament și împotriva infecțiilor deja instalate, producând o rată de vindecare de până la 84% și reducând excreția de germeni în scaun.

La fel de interesant este un studiu realizat pe subiecți umani de către expertul de renume mondial S.A. Sarker de la centrul Internațional Diarrheal Disease Research. Acesta a demonstrat faptul că oul hiperimun arată o eficacitate similară cu preparatele pe bază de lapte privind tratamentul rotavirusului la copii¹⁷⁻⁵¹.

Este clar faptul că oul hiperimun prezintă un mare potențial de prevenire și tratament al infecțiilor extrem de periculoase de la nivel digestiv și nu numai, după cum va fi demonstrat în continuare.

Alte efecte antibacteriene. Desigur, scăderea imunității rezultată din imunosenescență ne face vulnerabili la o mare varietate de infecții bacteriene și în afara tractului gastro-intestinal. Extracte de ou hiperimun arată un potențial ridicat în multe infecții de acest gen.

Pacienții cu fibroză chistică (CF) sunt expuși în mod special riscului de colonizare cu *Pseudomonas aeruginosa* (PA) la nivelul plămânilor, organism care se dezvoltă în propria secreție mucoasă. Infecțiile cu PA reprezintă de fapt cauza majoră de deces și invaliditate la pacienții cu CF⁵². Printre pacienții cu fibroză chistică care au efectuat gargară cu un preparat din ou hiperimun obținut de la găini imunizate împotriva PA, nici unul nu a fost colonizat cronic cu acest organism în timp ce, 24% dintre subiecții de control au fost colonizați⁵².

Oul hiperimun și-a demonstrat eficacitatea și împotriva altor infecții de la nivelul sistemului respirator. Un lot de pacienți cu dureri de gât cauzate de bacterii au folosit un spray de gât ce conține ou hiperimun și au arătat o reducere dramatică a simptomelor, în comparație cu subiecții tratați cu placebo⁵³.

Oamenii care trăiesc cu HIV/AIDS. În mai multe feluri, infecția cu virusul imunodeficienței umane (HIV) imită imunosenescența accelerată prin imunitatea scăzută și inflamația excesivă caracteristică⁵⁹. Un studiu efectuat pe persoane care trăiesc cu HIV/AIDS a demonstrat beneficiile remarcabile asociate consumului de ouă hiperimune⁶⁰. Subiecții suplimentați au simțit o îmbunătățire generală a calității vieții, inclusiv reducerea anorexiei, a durerilor abdominale, diareei, pierderilor de memorie pe termen scurt, amețelilor, durerilor de cap și a insomniilor. Durerea și dificultățile de respirație s-au redus de asemenea iar toți subiecții au prezentat o creștere semnificativă în greutate până la sfârșitul studiului de 8 săptămâni. Markerii de inflamație au scăzut în mod semnificativ și numărul celei mai importante limfocite CD4, un indicator al funcției imune, s-a îmbunătățit la 20% dintre pacienți.

Aceasta este o constatare extrem de importantă, având în vedere gradul de suprimare a sistemului imunitar întâlnit în general la pacienții cu HIV/AIDS și cheltuielile exorbitante ale tratamentului standard. Posibilitatea ca un extract de ou ieftin și ușor de distribuit ar putea scuti atât de multă suferință, oferă un progres important.

Sprrijinul sănătății imunitare la pacienții bolnavi de cancer. Imunosenescența este un factor important în creșterea riscului apariției cancerului, deoarece în acest caz, nivelul ridicat de supraveghere al sistemului imunitar normal împotriva potențialelor afecțiuni maligne se îngustează. În același timp, cancerul la fel ca și HIV/AIDS, aduce cu sine un fel de imunosenescență accelerată, celulele canceroase invadând și destabilizând gazdele lor nefericite. Chimioterapia agravează de cele mai multe ori situația, lăsând pacienții cu cancer chiar mai vulnerabili la infecții. Tractul GI primește o lovitură extrem de grea atât de la boală cât și de la

chimioterapicele administrate, ambele ducând la creșterea permeabilității intestinale care, în final, permite pătrunderea în corp a infecțiilor⁶¹.

Surprinzător, anticorpii de diferite tipuri administrați pe cale orală au arătat o activitate promițătoare în ameliorarea efectelor cauzate de cancer și de chimioterapie la nivelul tractului GI⁶². Un amestec de anticorpi IgA și IgG umani, administrat pe cale orală la pacienții cu transplant de măduvă osoasă, a împiedicat creșterea periculoasă a permeabilității intestinale, care a fost observată la pacienții tratați cu placebo⁶³.

Imunoglobulinele de origine animală (similare cu proteine biologice active din extractul de ou hiperimun) a fost capabile să reducă colonizarea fungică în timpul administrării orale la pacienții supuși transplantului de măduvă osoasă⁶⁴. Aceste studii au validat conceptul de utilizare a oului hiperimun pentru a susține imunitatea sistemului digestiv la pacienții imunosupresați bolnavi de cancer și au deschis calea către noi studii cu rezultate chiar mai dramatice.

Trăim într-o lume ostilă, înconjurați de un mediu plin de microbi și toxine care ne pot afecta acut sănătatea sau ne pot provoca dureri cronice și suferință. Pe măsură ce îmbătrânim, *imunosenescența* slăbește sistemul nostru imunitar, făcându-ne vulnerabili nu numai la infecții ci și la cancer sau alte boli autoimune sau inflamatorii. Abordările biochimiei medicale sau a industriei farmaceutice nu reușesc întotdeauna să remedieze situația, putând chiar să exacerbeze riscul apariției acestor condiții (ca și în cazul prescripției antibioticelor în exces care conduce la apariția de noi organisme periculoase pentru sănătatea umană).

Cu toate acestea, oul hiperimun produs de găină este un depozit natural pentru elementele de protecție care pot promova sănătatea umană. Găinile care au fost imunizate împotriva organismelor cauzatoare de boală fac ouă îmbogățite cu substanțe care au potențialul de a îmbunătăți sănătatea umană, atât în tractul GI cât și în alte părți ale corpului. Bolile gastro-intestinale precum și cele cauzate de infecții sau inflamației excesivă sunt ținte legitime pentru suplimentarea cu ou hiperimun. Mai mult decât atât, suplimentele din ou hiperimun pot îmbunătăți imunitatea persoanelor care trăiesc cu HIV/AIDS și chiar au demonstrat potențial în susținerea imunitară la pacienții cu cancer. Nu există nici o îndoială: ouăle hiperimune reprezintă o abordare unică privind protejarea sănătății și longevității.

Populația de oameni bătrâni este în creștere la această oră, fără precedent. Cu o tehnologie avansată recentă și o nutriție mai bună, populația trăiește mai mult decât până acum, mai ales în țările dezvoltate unde speranța de viață s-a dublat de la 45 la 80, în anul 2000. Pentru a putea asigura o sănătate adecvată pentru bătrâni este necesară realizarea unor studii științifice cu aspect medical privitor la procesul de îmbătrânire. Sistemul imun este una dintre funcțiile corpului profund afectate de îmbătrânire. Este necesar ca cercetarea privind îmbătrânirea să se concentreze asupra fenomenelor imunologice ale îmbătrânirii ca să înțelegem îmbătrânirea ca un tot unitar.

La bătrâni multe modificări privesc imunitatea cu care se naște persoana respectivă precum și imunitatea dobândită în timpul vieții. Alterarea sistemului imun la bătrâni este privită în

general ca o deteriorare a imunității numită imunosenescența. Mulți parametri imunologici sunt frecvent reduși la bătrâni, iar raportul dintre imunitatea de la naștere și cea dobândită rămâne relativ asemănător pe tot parcursul vieții. În ultima perioadă de timp recunoașterea rolului sistemului imun la bătrâni a dus la creșterea numărului de publicații în revistele de științe geriatrice și gerontologie. În anul 2004 a apărut revista *Immunity & Ageing*, o revistă "on-line" care are drept scop publicarea numărului mare de lucrări ce nu au loc în publicațiile tipărite.

Imunogerontologia, studiul sistemului imun la bătrâni, este un domeniu relativ nou așadar, nu sunt disponibile încă o serie de informații cheie asupra acestui subiect. Concluziile studiilor făcute pe animale sau culturi de țesuturi și investigațiile făcute pe om au fost contradictorii, dar aceste discrepanțe vor fi probabil rezolvate odată ce vor fi disponibile mai multe informații. Această situație s-a datorează faptului că gerontologii nu au folosit definiții acceptate de toți cu privire la momentul când începe procesul de îmbătrânire sau în ce moment un individ este considerat bătrân. Studiile cu privire la bătrânețe compară o populație cu indivizi tineri față de o populație de indivizi bătrâni fără a încerca să definească cine este tânăr și cine este bătrân. Fără o definiție clară a acestor termeni este dificil să determini care sunt diferențele imunologice observate în grupul de bătrâni ca rezultat al îmbătrânirii sau ca rezultat al bolilor bătrâneței. Numeroase studii s-au concentrat exclusiv asupra faptului că pentru a trăi 100 de ani bătrânul trebuie să fie excepțional de sănătos. Chiar dacă această populație este extrem de limitată, concluzia din aceste studii a ajutat să se stabilească lucrările de bază pentru studii mai ample care să includă populația de tineri îmbătrâniți.

În 1984, un grup de cercetare a dezvoltat protocolul **SENIEUR** ca o încercare să definească criteriile pentru selectarea indivizilor cu adevărat bătrâni sănătoși pentru studii imuno gerontologice. Protocolul **SENIEUR** a stabilit patru puncte de sănătate bazate pe date clinice și de laborator. În efortul de a reduce implicarea acestora în alte studii s-a realizat coliziunea dintre fenomenele observate în procesele naturale ale îmbătrânirii sănătoase și fenomenele atribuite bolilor legate de îmbătrânire. Folosind protocolul **SENIEUR**, câteva studii recente au răsturnat multe ipoteze cu privire la procesul de îmbătrânire al sistemului imunitar. Următoarele paragrafe vor prezenta unele dintre aceste noi descoperiri în imuno gerontologie.

Este bine documentat faptul că declinul imunocompetenței apare odată cu vârsta sau mai bine spus este legat de vârsta oamenilor. În acest caz sistemul imun începe să piardă câteva din funcțiile sale și nu mai poate răspunde repede sau eficient la stimuli. Modificările sunt legate de vârsta gazdei:

- în sistemul imun;
- modificări chimice până și la modificarea tipurilor de proteine găsite pe suprafața celulelor;
- alterarea întregului organism.

Studiate separat, câteva dintre aceste modificări par a fi ciudate, dar când sunt studiate împreună se constată că acestea afectează radical sănătatea generală a individului. O modificare majoră care se poate constata în corpul îmbătrânit este *involuția timusului*. Timusul, este un organ unde se maturează celulele T. Celulele T sunt foarte importante fiind o populație de limfocite specializate care au mai multe funcții:

- omoară bacterii;
- asistă alte tipuri de celule ale sistemului imun.

Timusul se atrofiază natural, odată cu vârsta. La 60 de ani volumul timusului este mai mic de 5% din cel de la naștere și dacă luăm în considerație că omul poate trăi până la 120 de ani, la această vârstă timusul va dispărea în totalitate. De asemenea celulele T sunt produse continuu în toată perioada de viață, iar atrofia timusului duce la o scădere continuă a celulelor T în tot timpul vieții. Nu se știe de ce se deteriorează timusul. Se pare că timusul este un organ extrem de scump din punct de vedere energetic și de care este nevoie în primele stadii de viață ale corpului. Acesta nu are timp să dezvolte rezistență proprie față de antigenii străini. Odată cu dezvoltarea completă a sistemului imun, pentru a proteja gazda față de miliarde de antigeni, menținerea timusului devine din punct de vedere energetic foarte scumpă. Pentru organism este mai avantajos din punct de vedere evolutiv să scadă cantitatea de țesut timic și să folosească energia care ar susține timusul pentru alte scopuri. Deoarece celulele T joacă un rol important în imunitate, indivizii care trăiesc mai mult au nevoie permanent de un suport *proaspăt* de celule T ca să protejeze organismul față de antigenii noi și această pierdere înceată dar sigură a țesutului timic afectează profund efectele întregului sistem imun al bătrâneții. Efectele îmbătrânirii funcțiilor celulelor T se manifestă în nenumărate feluri.

Numeroase subpopulații de celule T sunt găsite în timus și în circulația sanguină, dintre ele celule T naive și celule T cu memorie. Celulele T naive sunt celulele T care niciodată nu au fost expuse la nici un fel de antigen străin. Acestea sunt activate, stimulate pentru a identifica antigenii străini. Sistemul imun, cu ajutorul celulelor T cu memorie elimină antigenii străini din corp și păstrează informația în memoria celulelor T. Memoria celulelor T intră în stare de adormire și se reactivează numai la o altă expunere la același antigen. O diferență cu privire la subpopulațiile de celule T naive și celulele T cu memorie fost observată între subiecții tineri și cei în vârstă. La noii născuți sunt mai multe celule T naive de cât celulele T cu memorie. La adulți raportul este invers deoarece cele mai multe celule T naive s-au transformat în celule T cu memorie prin expunere la antigeni. Bătrânii nu mai au celule T naive datorită deteriorării progresive a timusului odată cu vârsta iar populația de celule T naive nu se reîmprospătează. În consecință stocul de celule T naive scade și sistemul imun îmbătrânit nu mai poate răspunde tot așa de bine ca la persoanele tinere la antigenii noi.

Odată cu declinul subpopulației de celule T, se constată modificări importante ale suprafeței celulare la toate celulele T. Celula T folosește proteina receptor T care se găsește pe

suprafața celulei pentru cuplarea de un antigen, iar stimulul, informația, o comunică în interiorul celulei. Multe molecule sunt implicate în **transducția semnalului**. Procesul de transmitere a semnalelor de cuplare și identificare a antigenilor trec prin membrana celulară în celulă. Semnalul de transducție este o cascadă de reacții chimice, fiecare fiind dependentă de eveniment. Celulele T îmbătrânite nu mai recunosc antigenul CD 28, o moleculă importantă pentru semnalul de transducție și activarea celulelor T la suprafața celulei. Fără această proteină, celulele T rămân active și nu răspund la stimuli patogeni străini. Un indiciu al disfuncției semnalului de transducție în celulele T este că nu răspund la stimuli patogenii străini. Un alt indiciu este că prezența antigenului CD69 pe suprafața celulei este în cantitate mică la persoanele bătrâne. Celulele T produc antigenul CD69 numai după cuplarea cu un antigen la receptorul celular. Dacă semnalul de cuplare la antigen nu este transmis în interiorul celulei T, antigenul CD69 nu va apărea pe suprafața celulei și acesta este un indiciu că la persoanele bătrâne nu există semnalul de transducere.

Un alt defect în activitatea celulei T la bătrâni este legată de scăderea calciului. Calciu este un element vital care este crucial pentru multe reacții biochimice inclusiv semnalului de transducție. O deficiență de calciu în celulele T oprește semnalul de transducție prin lipsa stimulării enzimatică inclusiv a protein kinazei C, MAPK și MEK, care au nevoie de calciu pentru funcțiile proprii. Scăderea cantității de calciu poate inhiba producția de citokine, proteine responsabile de coordonarea interacțiunii cu antigenul și amplificarea răspunsului imun.

O citokină care a fost studiată mai mult este interleukina 2 (IL-2), citokina produsă și secretată de celulele T, care induce proliferarea celulară și suportă creșterea pe termen lung a celulelor T. Celulele T bătrâne pierd capacitatea de a produce și a răspunde la IL-2. Când sunt expuse la un antigen, celulele de memorie T se divid rapid și proliferază ca să producă mai multe celule T clonate care, la rândul lor, să lupte cu antigenul. Aceasta proliferare se face cu ajutorul IL-2. Dacă nu se produce suficientă citokină IL-2, sau dacă celulele T nu pot să răspundă eficient la IL-2, funcțiile celulei T sunt mult diminuate. S-au înregistrat schimbări față de alte citokine precum citokina 4, factorul -alfa de necroză tumorală și gama-interferonul, dar încă nu se cunoaște ce influență au aceste modificări asupra sistemului imun îmbătrânit.

Alterarea genetică în relație cu vârsta se constată în celulele T. Studiile *in vitro* a celulelor T umane cultivate pentru o perioadă mai lungă de timp au arătat că ciclurile de diviziune devin mai lente și eventual se opresc, chiar atunci când celulele cresc în prezența IL-2; Concluzia este că, celulele T se opresc să se dividă și devin prea bătrâne să mai funcționeze. Multe probleme legate de mașinăria genetică a celulelor T se constată odată cu scăderea multiplicării celulare. Factorii de transcripție (că NF-kB și AP-1) proteică care folosesc ADN ca să creeze ARN în cursul proceselor de producere a proteinelor, par să devină improprii sau inactivi. La acest proces intervine și îmbătrânirea care scade capacitatea de răspuns a celulelor T prin pierderea activării genelor necesare pentru stimularea celulelor T. Celulele T bătrâne sunt mult mai sensibile la apoptoză sau sunt programate să moară, ceea ce se face prin pierderea graduală a telomerelor care creează probleme pentru cromozomii care previn degradarea ADN-ului. Problemele rearanjării

receptorilor genelor celulelor T contribuie la involuția timusului prin formarea celulelor mai puțin rezistente la apoptoze. Astfel, celulele T par să aibă o viață limitată și imunosensescență și sunt programate genetic.

Reducerea funcțiilor celulelor T la bătrâni afectează funcțiilor celulelor de tip B deoarece celulele T acționează împreună cu celulele B să regleze producția de anticorpi. Celulele T induc celulelor B să activeze genele imunoglobulinelor, care în schimb formează repertoarul de anticorpi care este mult mai restricționat la bătrâni de cât repertoarul celulelor T la tineret. Producția de imunoglobuline M, una dintre cele cinci clase de anticorpi, este afectată în mod special. În cursul infecțiilor IgM este prima clasă de anticorpi care răspunde. La bătrâni inabilitatea de a lupta cu infecțiile în comparație cu organismul tinerilor poate fi legată de diminuarea răspunsului imun IgM. Rata de maturizare a celulelor B scade cu vârsta. Celulele B sunt produse în măduva oaselor tot timpul vieții, dar numărul celulelor B scade cu vârsta. Având puține celule B mature, scade cantitatea de anticorpi produsă ca răspuns imun la infecție.

Autoanticorpii, anticorpii care reacționează contra antigenilor self (proprii), sunt în mod obișnuit semnele distinctive ale bolii autoimune. Totuși prezența autoanticorpilor este adesea corelată cu vârsta, chiar la persoanele bătrâne sănătoase care nu au boală autoimună. Interleukina 10 (Il-10) este o moleculă care stimulează producția de autoanticorpi în pacienții cu boala autoimună. Il-10 se pare că nu afectează sănătatea bătrânilor. În schimb, producția de autoanticorpi la bătrâni poate fi în legătură cu modificările funcționale în celulele T descrise mai sus. Producția în cantități mici de autoanticorpi este o parte normală a bătrâneții, al cărei activitate nu este cunoscută. O posibilitate ar fi ca mutațiile în genele celulelor T care apar odată cu îmbătrânirea pot crea o subpopulație de celule T care recunosc antigenul propriu gazdei. În condiții normale, aceste celule T sunt eliminate din timus înainte de maturarea completă, dar involuția timică duce la păstrarea populației de celule T. Aceste celule T pot induce celulelor B să producă autoanticorpi contra antigenilor proprii. Această teorie pare să fie susținută de studii realizate pe șoarece demonstrând că transplantarea unui timus de la făt în indivizi bătrâni cu o boală autoimună poate reface funcționarea și astfel să se trateze boala autoimună.

Și alte celule ale sistemului imun sunt afectate de îmbătrânire. Activitatea leucocitelor, incluzând macrofagele, monocitele, neutrofilele și eozinofilele, este redusă la bătrâni. Sunt foarte puține informații cu privire la efectele îmbătrânirii asupra acestor tipuri de celule.

Celulele natural killer (NK). Celule care sunt create să secrete citokine și să omoare alte celule, sunt un tip de celule care au fost studiate intens. A fost o informație potrivit căreia celulele NK scad odată cu îmbătrânirea dar această teorie care s-a bazat pe studii făcute pe șoareci s-a schimbat deoarece s-a constatat că la om, numărul acestora se schimbă foarte puțin. Inițial nu s-a ținut cont de protocolul SENIEUR. În studiile făcute folosind protocolul SENIEUR s-a constatat că activitatea celulelor NK se schimbă foarte puțin în timp, deasemenea un studiu contradictoriu sugerează că și în cazul când funcțiile citotoxice (cell-killing) ale celulelor NK se mențin, activitatea secretorie a citokinelor este nesigură. În timp ce citokinele joacă un rol important în

dezvoltarea tumorilor și de a îndepărta infecțiile, immunosenescența celulelor NK poate avea un efect extensiv asupra sistemului imun. Studii suplimentare cu privire la celulele NK sunt necesare să rezolve aceste discrepanțe.

Ce implicații produc toate aceste modificări în sistemul imun îmbătrânit cu privire la sănătatea bătrânilor? S-au studiat două domenii pentru a asigura sănătatea acestora: vaccinarea și nutriția.

Se știe că bătrânii nu răspund tot așa de bine ca tinerii la vaccinare. Vaccinarea se face pentru a *educa* sistemul imun contra unui agent infecțios. Vaccinurile oferă o substanță neinfecțioasă care conține același antigen ca și agenții patogeni pentru crearea unei populații de celule T cu memorie și celule de tip B producătoare de anticorpi și astfel să se prevină infecțiile ulterioare. Unele vaccinuri, că vaccinul antivariolic aviar (smallpox) are nevoie să fie administrat o dată ca să confere imunitate pentru toată viața. Alte vaccinuri, cum ar fi vaccinul antigripal, este necesar să fie administrat anual datorită numeroaselor tulpini de virus existente și dominației unei tulpini virale față de altele. Gripă și pneumonia sunt două boli care în mod special afectează bătrânii.

Din acest motiv, vaccinurile sunt o prioritate pentru asistența medicală a îmbătrânirii. Cu toate acestea, sunt schimbări deosebite la bătrâni cu privire la vaccinuri. La bătrâni răspunsul în anticorpi este mai lent și mai slab decât la tineri și celulele subpopulațiilor T nu răspund bine la vaccinare. Memoria celulelor T la persoanele bătrâne nu reacționează așa de repede și pentru o perioadă lungă de timp ca la subiecții tineri. Numeroase studii au avut drept scop îmbunătățirea vaccinurilor folosite la bătrâni. Sunt în studiu un nou tip de vaccinuri care pot produce eliberarea de lipozomi sau DNA (naked DNA) ca să creeze un răspuns imun mai puternic. Se încearcă utilizarea a noi metode de vaccinare dintre care spray-ul intra nazal sau oral ca să stimuleze imunitatea mucoaselor.

Nutriția joacă un rol deosebit în răspunsul imun la bătrâni. În același timp bătrânii suferă în mod curent de malnutriție. Reducerea caloriilor în nutriție este cunoscută pentru încetinirea procesului de îmbătrânire și ajută la menținerea unui număr mare de celule T naive și a nivelului de IL-2. Vitamina E și zincul sunt nutrienți importanți pentru funcționarea corectă a sistemului imun. Deficiența pe termen lung a zincului la bătrâni cauzează o scădere a producției de citokine și, în consecință, a reglării activității celulelor T. Vitamina E se anunță ca un posibil medicament în tratamentul la bolii Alzheimer (CSA's Discovery Guide Series: Alzheimer's Disease de Fred Spangler). În același timp s-a constatat că suplimentele cu vitamina E pot ajuta sistemul imun. La șoareci și oameni o doză zilnică de vitamina E mai mare de cât cea recomandată de metodologia din USA, îmbunătățește funcțiile celulelor T în imunitatea mediată celular. Vitamina E este deasemenea un antioxidant care poate proteja limfocitele, creierul și alte țesuturi de acțiunea distructivă a radicalilor liberi.

Așa cum am văzut îmbătrânirea afectează multe componente ale sistemului imun și sistemul imun interacționează cu fiecare organ în corp. O înțelegere clară a modificărilor imunologice care duc la îmbătrânire este necesare pentru o asistentă medicală de calitate pentru bătrâni (65,66).

Glossary

1. **Adjuvant:** o substanță non-reactivă încorporată în vaccinuri ca să crească răspunsul imun față de vaccin. Adjuvanții nu pot stimula răspunsul imun fără antigeni.

2. **Anticorpi:** proteine produse de celulele de tip B ca răspuns al stimulilor unui antigen. Odată recunoscut antigenul celulei B produc același timp de anticorpi care vor cupla numai acest antigen care a stimulat celule de tip B.

3. **Antigen:** o substanță străină care se cuplează cu anticorpii sau receptorii celulelor T care produc un răspuns imun. Antigenii pot fi proteine, carbohidrați, acizi nucleici, hormoni sau alte substanțe. Sistemul imun în mod obișnuit răspunde contra unui antigen străin, dar în boală autoimună sistemul imun reacționează contra antigenilor proprii (self-antigens) produși de corp ca și cum ar fi antigeni proprii dar străini.

4. **Apoptoză:** celule programate să moară, în care se condensează cromozomii, AND-ul se degradează și celulele killer le distruge.

5. **Boala autoimună:** o boală în care sistemul imun își atacă propriul corp și cauzează distrugerii tisulare. Sistemul imun al gazdei face greșeli cu privire la antigenii proprii față de antigenii străini și montează un răspuns imun contra țesuturilor care au antigeni proprii. Lupus, artritele reumatoide și scleroza multiplă sunt exemple de boli autoimune la om.

6. **Celule B:** o populație de limfocite care se maturează în măduva osoasă și produc anticorpi. Celulele B pot fi găsite în măduva osoasă și în circulația sanguină.

7. **Antigeni CD:** proteine care apar la suprafața limfocitelor și care pot servi ca markeri biochimici caracteristici pentru un tip de celule. CD pot fi utilizați pentru o diferențiere (cluster differentiation) și indică legătura sau stadiul de maturare al limfocitelor. Se acceptă ca moleculele să fie numite CD urmate de un număr (CD 28 sau CD 69). Unii antigeni CD au funcții cunoscute în timp ce pentru alți antigeni CD nu se cunosc funcțiile acestora.

8. **Cytokine:** proteine sintetizate de celulele sistemului imun care reacționează cu sistemele imun, nervos și endocrin. Cytokinele pot fi imunostimulatoare sau

imunosupresive. Dintre cytokine fac parte interleukinele, interferonii și unii factori de creștere.

9. **Imunocompetenței:** o calitate sau o stare a sistemului imun care are o funcționalitate adecvată.

10. **Imunogerontologie:** studiul procesului de îmbătrânire al sistemului imun.

11. **Imunoglobulina:** un alt cuvânt pentru anticorpi. Imunoglobulinele sunt subdivizate în 5 clase: IgM, IgA, IgE, IgD și IgG.

12. **Imunosenescența:** îmbătrânirea sistemului imun.

13. **Leucocite:** celulele albe ale sângelui. Populația de leucocite se compune din celulele B, celulele T, monocitele, macrofagele, bazofilele, eozinofilele, neutrofilele și celulele killer naturale.

14. **Lipozomi:** vezicule de lipide care conțin o substanță (medicament sau vaccine) de livrat pentru un anumit tip de celulă

15. **Limfocite:** a populație de celule albe din sânge, dintre care o subpopulații de celule, celule B și celule natural killer.

16. **Imunitatea mucoaselor:** o parte din sistemul imun asociat de țesuturile mucoaselor tractusului respirator, gastro intestinal și tractusului urogenital.

17. **Celule natural killer:** celule care atacă și distrug celule infectate cu virusuri și celule tumorale.

18. **Signal transduction:** un proces prin care reacționează o celulă la un stimul din mediul înconjurător prin transmiterea informației de pe suprafața membranei în interiorul celulei. Pe membrana celulară sunt proteine/receptori pentru molecule specifice. Când moleculele se cuplează la un receptor, cuplarea produce o cascadă de evenimente chimice în celulă, implicând enzime, proteine și ioni (în special calciu). Fiecare eveniment este dependent de evenimentul petrecut și dacă nu este parte a acestuia este pierdut iar semnalul transducției este întrerupt.

19. **Receptor celular T:** un complex proteic de pe suprafața celulelor T care cuplează cu antigenul. Ca și anticorpilor, receptorii celulari T sunt specifici pentru anumiți antigeni.

20. **Celule T:** o populație de limfocite din sânge, care se maturizează în timus. Celule T se pot găsi în timus, noduli limfatici și în circulația sanguină. Celulele T au multe

funcții incluzând asistența altor celule ale sistemului imun, omorând patogenii străini sau celule infectate și chiar subpresand răspunsul imun.

21. **Telomere:** proteine specializate pentru a repeta secvențe DNA pe sfârșitul cromozomului; care protejează cromozomii de degradare.

22. **Timusul:** un organ deasupra inimii, unde se maturează celulele T

23. **Factori de transcripție:** proteinele care ajută sinteza ARN folosind un ADN template. Proteina NF-kB și proteina AP-1 sunt doi bine cunoscuți factori de transcripție.

Referințe:

1. Effros RB. Roy Walford and the immunologic theory of aging. *Immun Ageing*. 2005 Apr; 25:2(1):7.
2. Lindstrom TM, Robinson WH. Rheumatoid arthritis: a role for immunosenescence? *J Am Geriatr Soc*. 2010 Aug; 58(8):1565-75.
3. Zeiler P. Approach to the obese adolescent with new-onset diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Dec; 95(12):5163-70.
4. Sannikova TE, Marchuk GI, Romaniukha AA, Iashin AI. Immune system senescence and mortality dynamics. Role of antigenic load. *Adv Gerontol*. 2003; 12:91-8.
5. Pawelec G, Derhovanessian E, Larbi A. Immunosenescence and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010 Aug; 75(2):165-72.
6. Mann DL, Topkara VK, Evans S, Barger PM. Innate immunity in the adult mammalian heart: for whom the cell tolls. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2010; 121:34-50; discussion 50-1.
7. Gupta S, Bi R, Su K, Yel L, Chiplunkar S, Gollapudi S. Characterization of naive, memory and effector CD8⁺ T cells: effect of age. *Exp Gerontol*. 2004 Apr; 39(4):545-50.
8. Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing*. 2006 May; 19:3-5.
9. Probst-Hensch NM. Chronic age-related diseases share risk factors: do they share pathophysiological mechanisms and why does that matter? *Swiss Med Wkly*. 2010 Sep 1; 140:w13072.
10. Pfister G, Savino W. Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15(4-6):351-64.
11. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol*. 2009 Jan; 9(1):57-62.
12. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, et al. T cells and aging. January 2002 update. *Front Biosci*. 2002 May 1; 7:dl056.
13. Dias da Silva W, Tambourgi DV. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010 Jun 15; 135(3-4):173-80.

14. Dean KL. Hyperimmune eggs capture natural immune support. *Altern Complement Ther.* June 2000;6(3):118-24.
15. Cama VA, Sterling CR. Hyperimmune hens as a novel source of anti-Cryptosporidium antibodies suitable for passive immune transfer. *J Protozool.* 1991 Nov-Dec;38(6):42S-43S.
16. Fujibayashi T, Nakamura M, Tominaga A, et al. Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida* spp. Adherence and biofilm formation. *Jpn J Infect Dis.* 2009 Sep;62(5):337-42.
17. Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001 Jan;32(1):19-25.
18. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun;908:244-54.
19. Candore G, Caruso C, Jirillo E, Magrone T, Vasto S. Low grade inflammation as a common pathogenetic denominator in age-related diseases: novel drug targets for anti-ageing strategies and successful ageing a hyperimmune egg yolk. *Curr Pharm Des.* 2010;16(6):584-96.
20. Karge WH, DeLuca JP, Marchitelli LJ, et al. Pilot study on the effect of hyperimmune egg protein on elevated cholesterol levels and cardiovascular risk factors. *J Med Food.* 1999;2(2):51-65.
- Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun;908:244-54.
21. Murosaki S, Yoshikai Y, Kubo C, et al. Influence of intake of skim milk from cows immunized with intestinal bacterial antigens on onset of renal disease in (NZB x NZW1F1) mice fed ad libitum or restricted in energy intake. *J Nutr.* 1991 Nov;121(11):1860-8.
22. Ormrod DJ, Miller TE. The anti-inflammatory activity of a low molecular weight component derived from the milk of hyperimmunized cows. *Agents Actions.* 1991 Mar;32(3-4):160-6.
23. Ormrod DJ, Miller TE. Milk from hyperimmunized dairy cows as a source of a novel biological response modifier. *Agents Actions.* 1993;38 Spec No:C146-9.
24. Greenblatt HC, Adalsteinsson O, Kagen L. Administration to arthritis patients of a dietary supplement containing immune egg: An open-label pilot study. *J Medicinal Food.* 1998;1(3):171-9.
25. Klosinska A, Nowacka M, Kopec G, et al. Periodontitis and the risk of cardiovascular diseases - review of epidemiological studies. *Kardiol Pol.* 2010 Aug;68(8):973-6.
26. Bodineau A, Folliguet M, Segnier S. Tissue senescence and modifications of oral ecosystem in the elderly: risk factors for mucosal pathologies. *Curr Aging Sci.* 2009 Jul;2(2):109-20.
27. Hata H, Tsuda K, Ozeki M, et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1997;31(4):268-74.
28. Otake S, Nishihara Y, Makimura M, et al. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (IgY). *J Dent Res.* 1991 Mar;70(3):162-6.

29. Mitoma M, Oho T, Michibata N, et al. Passive immunization with bovine milk containing antibodies to a cell surface protein antigen-glucosyltransferase fusion protein protects rats against dental caries. *Infect Immun*. 2002 May;70(5):2721-4.
30. Carlander D, Kollberg H, Larsson A. Retention of specific yolk IgY in the human oral cavity. *BioDrugs*. 2002;16(6):433-7.
31. Wang WH, Wang WJ, Zhang BX. Effect of IgY solution on dental plaque. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2003 Nov;38(6):417-9.
32. Zhou Z, Zhou R, Tang Z. Effects of topical application of immunoglobulin yolk on mutans streptococci in dental plaque. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2003 Aug;21(4):295-7.
33. Chi ZB, Gao YX, Pan Y, Zhang B, Feng XP. The inhibitive effect of IgY toothpaste against oral *Streptococcus mutans*. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2004 Aug;13(4):256-8.

- Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001 Jan;32(1):19-25.
34. Kawamishi H. Recent progress in senescence-associated gut mucosal immunity. *Dig Dis*. 1993;11(3):157-72.
35. Schmucker DL, Heyworth MF, Owen RL, Daniels CK. Impact of aging on gastrointestinal mucosal immunity. *Dig Dis Sci*. 1996 Jun;41(6):1183-93.
36. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
37. Riordan SM, McIver CJ, Wakefield D, Bolin TD, Duncombe VM, Thomas MC. Small intestinal bacterial overgrowth in the symptomatic elderly. *Am J Gastroenterol*. 1997 Jan;92(1):47-51
38. Cutting WA. Mechanisms of diarrhoea and why they matter. *Dialogue Diarrhoea*. 1988 Dec;(35):4-5.
39. Available at: <http://digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pubs/viralgastroenteritis/>. Accessed January 28, 2011
40. Ebina T. Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. *Arch Virol Suppl*. 1996;12:217-23.
41. Wiedemann V, Linckh E, Kuhlmann R, Schmidt P, Losch U. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. V. In vivo studies on protective effects against *Escherichia coli* diarrhea in pigs. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1991 Jun;38(4):283-91
42. O'Farrelly C, Branton D, Wanke CA. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. *Infect Immun*. 1992 Jul;60(7):2593-7

43. Marquardt RR, Jin LZ, Kim JW, Fang L, Fröhlich AA, Baidoo SK. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88- infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999 Apr;23(4):283-8.
44. Ebina T, Tsukada K, Umezaki K, et al. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation (PSK). *Microbiol Immunol.* 1990;34(7):617-29
45. Yokoyama H, Umeda K, Peralta RC, et al. Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium*. *Vaccine.* 1998 Feb;16(4):388-93
46. Yokoyama H, Peralta RC, Umeda K, et al. Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. *Am J Vet Res.* 1998 Apr;59(4):416-20.
47. Hiraga C, Kodama Y, Sugiyama T, Ichikawa Y. Prevention of human rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins containing rotavirus antibody in cat. *Kansenshogaku Zasshi.* 1990 Jan;64(1):118-23
48. Kuroki M, Ikemori Y, Yokoyama H, Peralta RC, Icaño FC Jr, Kodama Y. Passive protection against bovine rotavirus-induced diarrhea in murine model by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Vet Microbiol.* 1993 Oct;37(1-2):135-46.
49. Imberechts H, Deprez P, Van Driessche E, Pohl P. Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. *Vet Microbiol.* 1997 Mar;54(3-4):329-41.
50. Yokoyama H, Hashi T, Umeda K, et al. Effect of oral egg antibody in experimental F18 *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *J Vet Med Sci.* 1997 Oct;59(10):917-21.
51. Sarker SA, Casswall TH, Mahalanabis D, et al. Successful treatment of rotavirus diarrhea in children with immunoglobulin from immunized bovine colostrum. *Pediatr Infect Dis J.* 1998 Dec;17(12):1149-54.
52. Kollberg H, Carlander D, Olesen H, Wejaker PE, Johannesson M, Larsson A. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatr Pulmonol.* 2003 Jun;35(6):433-40.
53. Xie MQ, Meng YX, Li ZH, et al. Effect of specific immunoglobulin Y in the treatment of acute and chronic pharyngitis. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2004 Feb;39(2):112-5
54. Watson RR, Zibadi S, Vazquez R, Larson D. Nutritional regulation of immunosenescence for heart health. *J Nutr Biochem.* 2005 Feb;16(2):85-7.
55. Petermans J. Physical exercise in the aged. *Rev Med Liege.* 2001 Apr;56(4):223-7.

56. Available at http://www.hyperimmuneegg.org/studies/Scheett_Boland_Rivera_AnaoboleMediators.pdf. Accessed January 31, 2011.
57. Available at: <http://www.hyperimmuneegg.org/NSCA.pdf>. Accessed January 31, 2011
58. Available at <http://www.hyperimmuneegg.org/Submax.pdf>. Accessed January 31, 2011
59. Desai S, Landay A. Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV AIDS Rep*. 2010 Feb;7(1):4-10
60. Kizito FB. Improvements in Quality of Life for HIV/AIDS Patients Using Hyperimmune egg (Immune 26™) – The TASA Study. 3rd International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. 2005. Abstract No. MoPe11.2C43.
61. Nio Y, Tobe T. Immunity of gut-associated lymphoid tissue and the role of the oral immunotherapy in multi-disciplinary treatment of the digestive organ cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 1989 Sep;90(9):1436-8
62. Bishi M, Bisi SS, Dhasmana DC. Biological response modifiers: current use and future prospects in cancer therapy. *Indian J Cancer*. 2010 Oct-Dec;47(4):443-51.
63. Johansson JE, Ekman T. Gut mucosa barrier preservation by orally administered IgA-IgG to patients undergoing bone marrow transplantation: a randomised pilot study. *Bone Marrow Transplant*. 1999 Jul;24(1):35-9.
64. Tollemar J, Gross N, Dolgiras N, Jarstrand C, Ringden O, Hammarstrom L. Fungal prophylaxis by reduction of fungal colonization by oral administration of bovine anti-Candida antibodies in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1999 Feb;23(3):283-90.
65. Deborah B. Whitm. *The Immunology of Ageing (Updated March 1999) Power Quest*. www.powerquest.com
66. Sonya Vasto and Calogero Caruso. *Immunity and Ageing (I&A 10th Aniversery). Looking for an antibody against the mentioned targets? (2004)*



Patente privind imunoglobulinele de pasăre (*Gallus domesticus*)

5976519	<u>Yolk antibody-containing hair care product</u>	Nojiri et al.
5814477	<u>Recombinant clostridial toxin protein</u>	Williams et al.
5728813	<u>Antibodies directed against elk ligand</u>	Lyman et al.
5601823	<u>Avian antitoxins to clostridium difficile toxin A</u>	Williams et al.
5585098	<u>Oral administration of chicken yolk immunoglobulins to lower somatic cell count in the milk of lactating ruminants</u>	Coleman
5367054	<u>Large-scale purification of egg immunoglobulin</u>	Lee et al.
5340923	<u>Methods for making and purifying antivenoms</u>	Carroll
4550019	<u>Manufacture and use of fowl egg antibodies</u>	Polson

INVENȚIA PE SCURT

Formularea pe scurt a soluțiilor tehnice

Studiile efectuate în perioada 2011-2014 au avut drept scop obținerea unui ou hiperimun identificat: ou hiperimun PC2, în componența căruia sunt anticorpi formați pentru 10-30 de agenți patogeni și/sau substanțe toxice. Acest ou integral poate fi consumat crud, fiert la 65°C pentru 25 de minute, fiert la 100°C 4.5 minute. În aceste condiții se păstrează activitățile specifice ale tuturor imunoglobulinelor. Oul hiperimun PC2 se poate conserva prin uscare folosind atomizarea la temperaturi joase sau liofilizarea. Pulberea obținută se poate consuma ca atare, în amestec cu cacao, cu vitamine dizolvate în apă, apă minerală, sucuri și băuturi gazoase sau lapte.

Imunizarea se execută folosind minimum 10 antigeni bacterieni sau un amestec de 10-30 de antigeni bacterieni, virali și micotici, uscați prin liofilizare și în amestec cu adjuvant QS21. Această tehnologie prezentată în acest brevet de invenție poate fi ușor folosită, iar IgY specific poate fi comercializat la un preț convenabil și valorificat în unitățile medicale din România.

Prezenta invenție este pentru a produce un ou hiperimun care să conțină un grup de 10-30 de IgY-uri din gălbenușul de ou, care are următoarele etape:

- (a) prepararea unui antigen complex folosind tulpini bacteriene izolate de la pacienții din România, tulpini rezistente la antibiotice. Antigenul este un amestec de tulpini rezistente la antibiotice de aceeași specie de bacterii sau un antigen preparat dintr-un amestec de tulpini de la mai multe specii de bacterii, cu antigeni virali și micotici;
- (b) prepararea antigenului în amestec cu un adjuvant QS21;
- (c) imunizarea păsărilor cu antigenul preparat conform pct. (a) și (b) în urma cărora se formează anticorpi specifici în corpul găinilor, anticorpi care sunt transferați și acumulați în gălbenușul ouălor;
- (d) oul hiperimun PC2 se utilizează în hrana persoanelor în vârstă de peste 65 de ani sau la recomandarea medicilor la pacienți cu imunosupresie, cu afecțiuni bucale, digestive sau pe alte mucoase, țesuturi sau organe.

DESCRIEREA SUMARĂ A PROCEDURILOR

Obiectivele acestui brevet se vor evidenția în baza descrierii de mai jos:

Anexa # 1. Prezintă oul hiperimun PC2 preparat după această metodă:

- (a) IgY-specific identificat prin testul ELISA folosind IgG anti IgY de iepure (foto);
- (b) IgY-specific determinat cantitativ prin testul ELISA (foto)
- (c) IgY-specific determinat calitativ prin testul ELISA (foto)

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

În acord cu prezenta invenție, prepararea oului hiperimun PC2 cuprinde o serie de etape dintre care: prepararea antigenului (1), imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF (2) evaluarea calitativă și cantitativă a anticorpilor (3).

Prepararea antigenului.

În acord cu prezenta invenție sunt izolate de la pacienți tulpini bacteriene rezistente la antibiotice care se identifică și se înmulțesc. Celulele bacteriene spălate în tampon fosfat (PBS) de 3 ori și centrifugate la 4000 rpm la 20°C, 15 minute sunt liofilizate în flacoane de 10ml, câte 4ml de suspensie bacteriană în fiecare flacon. După liofilizare flacoanele se conservă la -20°C. 50mg de bacterii se resuspendă în soluție tampon fosfat (PBS) la concentrația care reprezintă densitatea optică OD₆₀₀ de 1.00 și se amestecă cu 45μl de adjuvant QS21. Antigenii virali se obțin prin replicarea pe cultura de celule a virusurilor și inactivarea lor cu beta-propiolactona. Ciupercile, după cultivarea în medii selective sunt inactivate timp de 60 minute la 80°C.

1. Imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF

Antigenul se administrează prin injecție intramusculară câte 0.5 ml în patru puncte diferite din musculatura pieptului la găinile ouătoare convenționale sau găini ouătoare SPF. Antigenul se inoculează la interval de 14 zile, de trei ori. La cea de-a doua administrare se face un control al prezenței anticorpilor specifici antigenului dat, din sânge și gălbenuș, folosind testele ELISA. Recoltarea ouălor se face la 14 zile de la cea de la treia administrare de antigen când titrul anticorpilor în ser și gălbenuș este mare. Titrul anticorpilor se evaluează periodic din gălbenușul provenit de la găinile imunizate cu antigenul dat.

Tehnica de imunizare a găinilor ouătoare cu antigenul selectat este bine cunoscută. Prezenta invenție poate folosi orice fel de metodă de imunizare a găinilor care permite administrarea antigenului dat prin orice cale de administrare, inclusiv subcutanată, intracutanată, intramuscular, intravenos. Metodele de control sunt prezentate pe larg în brevetul de invenție nr. A/00156 din 25.02.2014

În prezenta invenție se folosește ca adjuvant QS21. Se pot folosi și alte tipuri de adjuvanți dintre care adjuvantul Freund complet sau adjuvantul Freund incomplet, sau o combinație a acestora.

Folosirea adjuvantului QS21 în amestec cu antigenul dat crește răspunsul imun, nu produce reacții locale și s-a dovedit foarte eficient în producerea și menținerea unui titru mare pentru o perioadă lungă de timp, 12 luni cât a ținut experimentul; adjuvantul QS21 are un rol important în prepararea anticorpilor specifici.

Oul hiperimun PC2 din prezenta invenție este utilizat în tratamentul preventiv sau curativ al infecțiilor bacteriene, virale, micotice, cu levuri după administrarea per os pentru afecțiuni digestive, afecțiuni pulmonare, infecții virale sau infecții cu alte localizări în organismul uman.

MODELE RECOMANDATE DE FOLOSIRE A INVENȚIEI

Exemplele de mai jos au drept scop ilustrarea și nu au intenția de a limita scopul prezenței invenții.

Exemplul 1.

- (a). Fiecare serie de găini este imunizată cu un pachet de 10-30 de antigeni bacterieni, virali sau micotici. Tulpinile bacteriene și micotice pot fi izolate de la pacienții din spitalele din România. Unele tulpini virale sau micotice sunt reprezentate de un amestec de tulpini izolate de la pacienții din spitalele din România și a tulpinilor de referință certificate. Acest pachet de microorganisme cuprind: *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis and typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilis influenzae*, *Stereptococcus (6 specii)*, *Acinetobacter Baumani*, *Herpes simplex*, *Clostridium difficile (spori, forma vegetative și exotoxine A și B)* ganismul uman.
- (b). Fiecare tulpină va fi conservată la -85°C ca produs original. Multiplicarea bacteriilor pentru prepararea antigenului se va face în mediul de cultură recomandat;
- (c). Din cultura de bacterii de 24 de ore se prepară un sediment de bacterii echivalent cu 2×10^{10} UFC, prin centrifugare 15 minute la 4.000 rpm la $+20^{\circ}\text{C}$;
- (d). Peleta rezultată se resuspendă în PBS la volumul inițial și se liofilizează 2ml în flacoane de 4 ml. După liofilizare, cultura bacteriană se conserva la -20°C ;
- (e). Peleta rezultată la pct. (c). se resuspendă la volumul inițial în 0.4% formol în PBS și se incubează peste noapte la $+37^{\circ}\text{C}$. Formolul se elimină prin centrifugare 15 minute la 4000 rpm la $+20^{\circ}\text{C}$. Bacteriile inactivate se resuspendă în PBS și se liofilizează. După liofilizare flacoanele se conservă la -20°C ;
- (f). Antigenul se prepară folosind 500 μg de celule/ml inactivate sau 3-4.5 μg de proteină/ml care se reconstituie în 0.5ml PBS și se amestecă cu 0.5ml de adjuvant QS21. Amestecul se diluează în părți egale cu emulsificator Tween 20 5% pentru imunizarea găinilor;
- (g). Antigenul este un amestec de tulpini din cadrul aceleiași specii de bacterii sau un amestec de tulpini bacteriene;
- (h). Antigenii virali se prepară din suspensia de culturi de celule cu virus, inactivat cu beta-propiolactona, purificat prin filtrare prin filtre Millipore de 0.45 μm .

- (i). Antigenii reprezentați de ciuperci sunt preparați din culturile de ciuperci în medii selective care sunt inactivate 160 minute la 80°.
- (j). Găini ouătoare convenționale sau SPF la vârsta de 140-180 de zile, clinic sănătoase, crescute industrial, hrănite cu furaje pentru găini ouătoare, rasa Leghorn sau Rhode Island Red și cu adăpare automată.
- (k). Găinile sunt imunizate intramuscular, în patru puncte diferite cu 2 ml din antigenul dat;
- (l). După prima administrare găinile primesc alte două administrări din același antigen, pe aceeași cale de administrare la interval de 14 zile;
- (m). La cea de-a doua și respectiv a treia administrare se prelevă sânge pentru controlul răspunsului imun;
- (n). Probele de sânge prelevate de la găini după administrarea a doua și a treia de antigen sunt tratate pentru a se exprima serul care se extrage de pe coagul și se conservă la +4°C sau la -20°C.
- (o). Pentru evaluarea răspunsului imun se folosește testul ELISA calitativ și cantitativ;
- (p). Se admit în producția de ouă hiperimune PC2 găinile care au răspuns pozitiv la administrarea complexului antigenic dat.
- (q). Se consideră momentul optim de recoltare a ouălor atunci când se extrag din gălbenuș 100-200mg de IgY respectiv 10-20 mg IgY specific.

Exemplul 2

Extragerea IgY

- (a). Gălbenușul se separă de albuș și se extrage după ruperea membranei viteline de la ouăle colectate de la găinile imunizate după 14 zile de la ultima administrare a antigenului dat.
- (b). Se măsoară volumul gălbenușului după care se amestecă cu apă distilată la +4°C, pH 4-7 în raport de 1:7 -1:10 și se agită cu un turmix timp de 5 minute la temperatura camerei.
- (c). Se corectează pH-ul la 4-7 și se adaugă Thimerosal 0.01%
- (d). Amestecul se congelează la -20°/-40°C direct sau în trepte, câte un grad pe minut folosind azot lichid.
- (e). După congelarea întregului amestec se decongelează la temperatura de +20°C.
- (f). După separarea celor două faze lichidași semisolidă se extrage faza apoasă;

- (g). IgY extras în faza apoasă se prelucrează prin filtrare la temperatura de 20°C folosind filtre care permit trecerea proteinelor cu greutate mai mică de 20kDa pentru a se reține biomoleculele insolubile în apă, majoritatea lipide și granule de gălbenuș.
- (h). IgY se conservă la +4°C pentru a se efectua determinările cantitative și calitative de rutină.
- Determinările cantitative și calitative se fac folosind:
- testul ELISA calitativ;
 - testul ELISA cantitativ;

Exemplul 3

Condiționarea ouălor hiperimune PC2.

După stabilirea activității de inhibare specifică a multiplicării bacteriilor, ouăle hiperimune se condiționează prin:

- (a). Recoltare de pe banda colectoare și transportate în camera frigorifică la +4- 8°C;
- (b). Se sortează și se elimină ouăle sparte și ouăle murdare;
- (c). Se identifică fiecare ou cu data de fabricație și valoarea lor biologică;
- (d). Se repartizează automat în cofraje de 6, 12 și 36 de ouă;
- (e). Pe fiecare cofraj se lipesc etichete care conțin informații privind oul hiperimun PC2;
- (f). Se menționează pe etichete modul de conservare, modul de utilizare și data expirării produsului;
- (g). Ouăle hiperimune PC2 ambalate în cofraje sunt conservate și transportate la +4 – 8°C;
- (h). Ouăle hiperimune PC2 sunt conservate până în momentul consumului la +4-8°C.

Exemplul 4

Prepararea oului hiperimun PC2 integral granulat prin atomizare

Oul hiperimun PC2 se spală, se sparge și se separă de coajă manual sau cu o mașină automată. Conținutul oului se amestecă într-un malaxor special și se transferă la +10C° într-un aparat de uscare la temperatură joasă (+65°C) după care se transferă într-un recipient din inox și se preia într-o mașină de dozare cu ajutorul căreia se condiționează oul integral granulat în flacoane de 350g, 170g sau flacoane care se sigilează cu folie de aluminiu. Flacoanele etichetate sunt ambalate în cutii individuale și cutii colective.

Dozele individuale reprezintă câte 12 și respectiv 6g repartizate în plicuri din plastic care se închid la cald. Ambalajul final se face în cutii de carton cu câte 50 de plicuri per cutie.

Oul hiperimun PC2 granulat se poate conserva la +20-22°C timp de un an iar la +4-8°C cel puțin 2 ani de zile.

Exemplul 5

Prepararea oului hiperimuin PC2 integral granulat prin uscare în vid (liofilizare).

Amestecul de ou integral conf. Ex. nr 4 se liofilizează cu un program intensiv de uscare în vid, la un punct eutectic de $-30-56^{\circ}\text{C}$, cu un program special de evaporare la temperatura de -4°C și la temperatura finală de $+30^{\circ}\text{C}$.

După liofilizare oul hiperimun PC2 granulat se condiționează conf. Ex. Nr 4.

Exemplul 6

Control final al IgY

- (a). Pentru forma finală a oului hiperimun PC2, pentru administrare orală, se folosesc metodele de control:
- Sterilitate microbiologică: standard alimentar.
 - Regulamentul (CE) nr. 2160/2003 al Parlamentului European și al Consiliului privind controlul infecțiilor cu *Salmonella* și al altor agenți zoonotici specifici cu transmitere prin alimente.
 - Regulamentul (CE) nr. 852/2004 privind igiena produselor alimentare prevede faptul că ouăle sunt produse alimentare de bază. Toate prevederile legislației CE cu privire la igienă.
 - Stabilirea activității specifice a IgY folosind testul ELISA;
 - Stabilirea conținutului de IgY folosind testul ELISA;
- (b). Se admit în consum uman numai seriile de IgY-specific care corespund controalelor efectuate conform expl. 6 pct. a

Exemplul 7

A. Determinarea cantitativă a IgY prin testul ELISA

Testul ELISA se pregătește “in house” special pentru fiecare test în parte.

Testul ELISA poate decela imunoglobulinele la diluții foarte mari. Cantitatea minimă decelată de IgY este 10 nanograme în materialul testat. Datorită specificității și reproductibilității reacției imuno enzimatică testul ELISA se folosește în procesul de producție al IgY, pe faze de producție, în controlul calitativ și cantitativ.

- (a). Testul ELISA care urmează a fi folosit în controlul cantitativ al IgY se realizează prin comparație cu un etalon internațional IgY (UȘA) sau comparativ cu un subetalon IgY preparat la Romvac;
- (b). Godeurile se căpтуșesc cu 150μl IgG iepure anti IgY la concentrația de 3.75 μg/ml în tampon carbonat-bicarbonat;
- (c). Plăcile cu 96 de godeuri ELISA se incubează 90 de minute la +37°C;
- (d). se spală de patru ori cu câte 300 μl PBS-Tween folosind o mașină automată de spălat;
- (e). În fiecare godeu se adaugă 200μl de 1% BSA în PBS-Tween și se incubează 45 de minute la +37°C;
- (f). Placa de reacție se spală de patru ori cu PBS-Tween conform (d);
- (g). Se adaugă în triplicat câte 150 μl IgY specific sau IgY SPF (25, 12.5, 6.25 μg/ml) în PBS;
- (h). În paralel se adaugă în triplicat câte 150 μl IgY standard SIGMA ((25, 12.5, 6.25 μg/ml);
- (i). Plăcile sunt incubate la +37°C pentru 90 de minute;
- (j). Plăcile de spală de patru ori cu PBS-Tween;
- (k). Se adaugă 150μl IgG anti IgY conjugat cu peroxidază la diluția 1:5000;
- (l). Se adaugă 150 μl TMB și se incubează 5-15 minute la temperatura camerei, la întuneric
- (m). Se blochează reacția cu 150μl HCl;
- (n). Reacția se citește la spectrofotometru cu filtru OD₄₅₀;
- (o). Se fac curbe standard comparative, considerându-se diluția maximă pozitivă 0.200 OD.

B. Determinarea cantitativă a IgY prin testul ELISA direct

- (a). Placa se căpтуșește peste noapte la +4°C sau în 2 ore la temperatura camerei cu IgY de testat și cu IgY etalon în trei replicare fiecare, în diluții binare începând cu diluția 1:1000 în soluție carbonat-bicarbonat;
- (b). Godeurile A1 și H1 se păstrează ca martori pentru IgY;
- (c). Se spală placa de reacție de 3 ori cu soluție de spălare;
- (d). Se adaugă 100 μl de conjugat anti IgY pasăre diluat 1:5000;
- (e). Se incubează placa 2 ore la +37°C;
- (f). Se spală de 4 ori cu soluție de spălare;
- (h). Se adaugă 100 μl TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min;
- (i). Se adaugă 100 μl soluție de stopare;
- (j). Se citește absorbanta reacției la un spectrofotometru cu filtru de 450 nm;
- (k). Interpretarea reacției se face prin controlul godeurilor Blank unde DO₄₅₀ trebuie să fie maximum de 0.060. În cazul când sunt alte valori reacția nu se validează;
- (l). Se consideră ca reacție pozitivă pentru prezența IgY, diluția la care DO₄₅₀ este de 0.200 sau mai mare;
- (m). În cazul când placa de reacție se validează se compară reacțiile pozitive de la IgY- testat față de IgY standard internațional;

- (n). Conținutul în $\mu\text{g/ml}$ de IgY se face în raport cu IgY de referință, ținând cont de faptul că ELISA decelează minimum 10 ng/ml și se face prin comparație cu IgY standard.

Exemplul 8

C. Determinarea conținutului de IgY specific prin testul ELISA

Activitatea specifică IgY se determină cantitativ față de antigenul reprezentat de celulele întregi bacteriene inactivate și liofilizate conf. Pct. (1.). Placa de reacție se căptușește cu antigen, iar IgY-specific se testează în triplicate, în diluții succesive binare de la diluția 1:1000, în triplicat. Se consideră diluția maximă pozitivă diluția la care reacția este egală sau mai mare de 0.200 OD sau valoarea matematică pentru diluția mai mare de 0.200 OD. La această diluție reacția pozitivă este produsă de 5-10ng de IgY-specific per godeu, per 150 μl .

- (a). Se căptușește o placă ELISA cu 150 μl din suspensia de bacterii liofilizate la 1.67 -1.70 μg de celule per ml sau 10 μg de proteină bacteriană per ml în tampon carbonat-bicarbonat (0.05 M, pH 9.6);
- (b). Placa căptușită se păstrează 12 ore (peste noapte) la +4°C;
- (c). După îndepărtarea lichidului, placa se spală de 3 ori cu soluția de spălare PBS-Tween 20 (2%);
- (d). Reacția se blochează cu tampon de fixare, câte 300 $\mu\text{l/godeu}$ și se incubează 30 minute la temperatura camerei;
- (e). Se înlătură lichidul de blocare;
- (f). Placa se usucă 30 minute la exicator;
- (g). Se repartizează în fiecare godeu 100 μl din suspensia de IgY diluată 1:1000 în diluții binare conform configurării plăcii. IgY de evaluat se va testa în triplicat;
- (h). Se mențin godeul A1 și H1 ca martori pentru antigen, godeurile B1, C1 și D1 ca martori negativ de reacție folosind IgY-SPF și godeurile E1, F1 și G1 ca martor pozitiv de reacție folosind IgY-specific de referință Romvac;
- (i). Se incubează placa 2 ore la +37°C;
- (j). Se spală de 3 ori cu soluție de spălare;
- (k). Se adaugă 100 μl de conjugat anti IgG anti pasăre diluat 1:5000, folosind ca diluant tamponul de diluție;

- (l). **Placa se incubează 2 ore la +37 °C;**
- (m). **Placa se spală de 4 ori cu soluție de spălare;**
- (n). **Se adaugă 100 μl TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min.**
- (o). **Se adaugă 100 μl soluție de stopare;**
- (p). **Se citește reacția la un spectrofotometru la absorbanta 450 nm;**
- (r). **Se validează reacția din godeurile martor blank A1 și H1 au valori mai mici de 0.060 OD, când reacția din godeurile B1, C1 și D1 martor IgY-SPF (negativ) au valori de 0.060-0.090 OD, iar în godeurile martor pozitiv E1, F1, G1 sunt valori de 1.400-1.800 OD.**

REVENDICĂRI

1. Metoda de preparare a oului hiperimun PC2 se caracterizează prin faptul că se imunizează găini ouătoare cu o masă antigenică formată din antigeni preparați din bacterii, virusuri și ciuperci patogene pentru om.
2. Revendicarea metodei de la punctul 1, se caracterizează prin faptul că antigenul este un amestec de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice din cadrul aceleiași specii.
3. Revendicarea metodei de la punctul 1, se caracterizează prin faptul că antigenul este un amestec de tulpini bacteriene din mai multe specii bacteriene rezistente la antibiotice.
4. Revendicarea metodei de la punctul 1, se caracterizează prin faptul că antigenul conține un amestec de bacterii, virusuri și ciuperci inactivate în amestec cu un adjuvant QS21 care este suportat foarte bine de găinile inoculate intramuscular.
5. Revendicarea metodei de la punctul 1, se caracterizează prin faptul că antigenul conține un amestec de bacterii, virusuri și ciuperci inactivate în amestec cu un adjuvant QS21, care conferă un stimul imunologic care face ca în organismul găinilor răspunsul imun să fie uniform, pentru fiecare antigen în parte.