



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00156**

(22) Data de depozit: **25/02/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2022** BOPI nr. **5/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2014 BOPI nr. **7/2014**

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

(72) Inventatori:
• **PĂTRAȘCU IONEL-VICTOR**, CALEA
DOROBANȚILOR NR.134-138, BL.11, SC.C,
ET.3, AP.98, 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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 4550019; WO 0027410 A2

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A IMUNOGLOBULINELOR IgY**

Examinator: **biochimist EREMIA LAURA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 129645 B1

1 Prezenta invenție descrie o metodă de purificare a anticorpilor IgY din gălbenușul
2 găinilor. Prezenta invenție are o relație directă cu modul de preparare a antigenului din
3 amestecul a mai multor tulpini bacteriene rezistente la antibiotice din cadrul aceleiași specii
4 bacteriene sau a antigenului preparat din tulpini rezistente la antibiotice de la mai multe
5 specii de bacterii. Prezenta invenție are o relație directă cu modul de preparare a antigenului
6 prin amestecul celulelor bacteriene inactivate cu un adjuvat special QS21.

7 În 1893 Klemperer, în documentul **Klemperer, F. 1893. Ueber natirlich Immunität
8 und ihre verwerthung fur die Immunisirungstherapie. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.
9 31:356-382**, a publicat că în ou sunt proteine care neutralizează virusuri. În 2004-2006
10 experți din toată lumea au descris pentru prima dată oul ca produs farmaceutic, **G. A. Leslie
11 and L.W. Gem, "Phylogeny of immunoglobulin structure and function", Journal of
12 Experimental Medicine, Vol. 130, Nr. 6:1337-1352, 1969**. S-a discutat despre gălbenuș ca
13 o sursă importantă de imunoglobuline care pot fi folosite în diagnostic, profilaxie și tratament
14 la animale și om. Leslie și Clem în 1969 au demonstrat că IgY este diferit de IgG. IgY nu
15 afectează activitatea medicamentelor în tractusul digestiv nici absorbția lor în circulația
16 sângelui și nici activitatea lor în organism. IgY nu produce rezistența microorganismelor pen-
17 tru care au fost create și nici remanența în organism.

18 Anticorpii folosiți în prezent pentru cercetare, diagnostic și tratament provin de la
19 mamifere. Aceștia sunt anticorpi monoclonali sau policlonali. Tradițional pentru producerea
20 de anticorpi policlonali sunt folosite animale dintre care calul, oaia, porcul, iepurele, cobaiul.
21 Pentru anticorpi monoclonali se folosesc animale ca iepurele și șoarecele. Ambele tehnologii
22 au avantaje și dezavantaje, vezi **Mojca Narat. Production of Antibodies in Chickens,
23 Food Technol. Biotechnol. 41, (2003) 259-267; Michael et al. Chicken egg yolk
24 antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. Indian Journal of Science
25 and Technology, Vol. 3 Nr. 4, (Apr. 2010)**. Cea mai mare problemă a anticorpilor mono-
26 clonali este că multe antigene sunt slab sau nu sunt de loc imunogeni pentru șoarece. S-a
27 constatat că prepararea anticorpilor proveniți de la mamifere necesită tehnologii sofisticate
28 și de multe ori cu un randament scăzut. Tehnologia folosită la mamifere este stresantă atât
29 pentru imunizare cât și pentru prelevarea de sânge ca probă de control și prelevarea de
30 sânge pentru prepararea anticorpilor. În ultimii 25 de ani utilizarea găinilor în locul mamife-
31 relor pentru producția de anticorpi a crescut. Cel mai mare avantaj îl constituie faptul că anti-
32 corpii se prelevă din ou în loc de ser. În același timp cantitatea de anticorpi produși de către
33 o găina ouătoare este mai mare decât cantitatea de anticorpi produși de către un mamifer
34 de aceeași dimensiune, **Hau J. and Hendriksen C. (2005), Refinement of polyclonal
35 antibody production by combining oral immunization of chickens with harvest of
36 antibodies from the egg yolk. ILAR. 46, 294-299**. Purificarea imunoglobulinelor de la
37 mamifere este consumatoare de timp și scumpă. Astăzi găinile sunt recunoscute ca o sursă
38 ieftină și convenabilă de anticorpi. Cantitatea de imunoglobulină produsă dintr-un ou este
39 egală cu cea preparată din 300 ml de sânge prelatat de la iepure.

40 Anticorpii de la găina se folosesc cu succes în cercetare, diagnostic și tratamente cu
41 scop profilactic sau curativ. Proteinele sunt mult mai imunogene la păsări decât la mamifere
42 datorită distanței filogenetice dintre păsări și mamifere, iar producția de anticorpi este imediat
43 stimulată la păsări, **Bizanov G. and Jonavskiene I., (2003), Production and purification
44 of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgY. Bull. Vet. inst. Pulawy.
45 47, 403-410**. Folosirea găinilor pentru producerea de anticorpi permite reducerea drastică
46 a numărului de animale. Stresul provocat mamiferelor este înlocuit cu recoltarea anticorpilor
47 din ou. În plus, în ou este o cantitate mai mare de anticorpi decât în ser **Larsson A., Balow
48 R.M., Lindahl T.L. and Forsberg P.O. (1993), Chicken antibodies: Taking advantage of
49 evolution. A review. Poultry Sci. 72, 1807-1812**.

RO 129645 B1

1 Producția de anticorpi pe găină are o serie de avantaje în comparație cu anticorpii
 3 policlonali de la mamifere (tabelul 1). Aceste avantaje permit utilizarea IgY în analize cât și
 în terapie.

5 *Compararea IgG de mamifere față de IgY de găină (Schade et al., 1991) (13)*

Tabelul 1

Animal	Iepure (IgG)	Găină (IgY)
Sursa anticorpilor	Ser din sânge	Gălbenuș din ou
Felul de anticorpi	Policlonali	Policlonali
Prelevarea probelor	Sângerare	Colectarea ouălor
Cantitatea de anticorpi	200 mg/sângerare (40 ml sânge)	100 ± 150 mg/ou
Cantitatea de anticorpi per an	1400 mg	40000 mg
Cantitatea de anticorpi specifici per an	~ % 70 mg	2 ± 10% 800-4000 mg
Cuplarea la proteina A/G	Da	Nu
Interacțiunea cu IgG de mamifere	Da	Nu
Interacțiunea cu factorul reumatoid	Da	Nu
Activarea complementului de mamifere	Da	Nu

19 În ou se găsesc imunoglobulinele IgA și IgM care ajung în albuș din oviduct, în timp
 21 ce IgG, numit mai recent IgY se transferă din sânge în ovar. Masa moleculară este 180 kDa
 (25 kDa lanțurile ușoare și 65-68 kDa lanțurile grele).

23 Fragmentul Fc din IgY are cele mai hidrofobice molecule. Cantitatea de
 25 imunoglobuline din ou este egală cu cea din serul de mamifer, aproximativ 6-13 mg/ml. O
 singură găină poate produce 30-34 g de imunoglobulină pe an, de 10 ori mai multă decât
 poate produce un iepure. Perioada optimă de imunizare este de 60 de zile. După acest
 interval de timp de imunizare se poate obține cantitatea de 40 g IgY per an.

27 IgY este o imunoglobulină cu greutate moleculară mică prezentă în serul și
 29 gălbenușul păsărilor în concentrație de aproximativ 5-20 mg/ml. Masa moleculară este 180
 kDa (25 kDa lanțurile grele și 65-68 kDa lanțurile ușoare). Fragmentul Fc din IgY are cele
 31 mai hidrofobice molecule. Afinitatea anticorpilor policlonali nu se poate măsura deoarece nu
 interacționează doar cu un singur epitop. Afinitatea evidențiază doar interacția dintre un
 33 locus de cuplare cu antigenul și un epitop de pe antigen, ceea ce se poate măsura doar cu
 anticorpi monoclonali.

35 Puterea de cuplare a anticorpilor monoclonali se poate descrie ca aviditate, care este
 o combinație între afinitatea către un singur locus și valența anticorpilor. Valența descrie cu
 37 câte locusuri interacționează anticorpii când se cuplează cu un antigen. IgY poate acționa
 ca și IgG, bi sau monovalent, în funcție de dimensiunea antigenului. Din acest motiv puterea
 de cuplare a anticorpilor policlonali poate fi puternică sau slabă.

39 Se poate constata uneori că IgY are o afinitate scăzută față de antigene. În acest caz
 41 trebuie ca IgY să fie tratat cu atenție deoarece capacitatea de cuplare este foarte mare.
 Acest fapt apare când antigenele sunt mai străine pentru găină decât față de iepure. În
 43 aceste situații se poate ca anticorpii să fie puternic multivalenți la pasăre când se compară
 cu iepurele, chiar dacă afinitatea este scăzută.

RO 129645 B1

1 La mamifere diversitatea anticorpilor este de cele mai multe ori realizată prin
rearanjarea segmentelor diferitelor gene ca să producă partea hipervariabilă a anticorpilor
3 și în plus prin mutații somatice. În acest mod este posibil să fie mai mult de un milion de anti-
corpi specifici.

5 Diversitatea anticoprilor de la găină este realizată în special de conversia genelor și
în plus de jocul flexibilității V-J și prin mutația punctului somatic ca la mamifere. În contrast
7 față de mamifere, la găini este o singură genă VH sau VL, dar în plus sunt aproximativ 25
de așa numitele pseudo-gene-V (care au pierdut secvențele uzuale de reglarea transcripției
9 și recunoașterea de semnal). Astfel că găinile pot produce frecvent anticorpi care vor
recunoaște mai mulți epitopi decât anticorpii de mamifere.

11 S-au făcut eforturi să se purifice IgY din gălbenușul ouălor. S-au folosit diferite mate-
riale care să permită separarea proteinelor de biomoleculele insolubile în apă, majoritatea
13 lipide și granule de gălbenuș, folosind Caragennan, **Hajime Hatta, Mujo Kim and Takehiko
Yamamoto. A Novei Isolation Method for Hen Egg Yolk Antibody, "IgY" Agric. Biol
Chem., 54, (10), 2531-2535, 1990** sau polyethyl glycol (PEG) Polson A, von Wechmar
15 **MB, van Regenmortel MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized
hens. Immunol Commun 1980; 9: 475-93; Polson Alfred. US 4550019, Manufacture and
17 use of fowl egg antibodies. 01, 29, 1985** sau precipitarea prin congelare, **Hoon H.
Sunwoo, Eun N. Lee, Naiyana Gujral and Mavanur R. Suresh. Growth Inhibition of
19 Escherichia coli 987P by Neutralizing IgY Antibodies The Open Immunology Journal
2010, 3, 1-8 11874-2262/10 2010; Akita E.M. and Nakai S. (1993), Comparision of four
21 purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens
23 immunized with an enterotoxigenic E. coli străin. J. Immunological Methods. 160,
207-214.**

25 Numeroase brevete și studii se referă la izolarea întregii populații de anticorpi din
gălbenuș inclusiv IgY (AFc) folosind diferite tehnologii de extracție a IgY, dintre care
27 precipitare cu sulfat de amoniu, cu PEG, alcool. Există și posibilitatea de a separa faza
apoașă de componentele lipidice și granulele de gălbenuș prin congelare la -20°C.

29 Există necesitatea de a extrage imunoglobulinele din gălbenuș printr-o metodă simplă
și purificarea lor prin filtrări tangențiale cu scopul de a menține și a proteja structura și
31 activitatea specifică a IgY. În plus există necesitatea preparării imunoglobulinelor specifice
față de antigene preparate din celule inactivate rezistente la antibiotice din aceeași specie
33 de bacterie sau antigene preparate din bacterii provenite de la mai multe specii. Prepararea
antigenelor s-a făcut prin amestecul celulelor bacteriene cu un adjuvant care conferă un grad
35 mărit imunogenic care permite obținerea unui titru mare de IgY pentru o perioadă lungă de
timp de la găinile imunizate.

Brevete privind imunoglobulinele de pasăre (Gallus domesticus)

39	5976519	Yolk antibody-containing hair care product	Nojiri et al.
41	5814477	Recombinam clostridial toxin protein	Williams et al.
	5728813	Antibodies directed against elk ligand	Lyman et al.
43	5601823	Avian antitoxins to clostridium difficle toxin A	Williams et al.
45	5585098	Oral administration of chicken yolk immunoglobulins to lower somatic cell count in the milk of lactating ruminants	Coleman

5367054	Large-scale purification of egg immunoglobulin	Lee et al.	1
5340923	Methods for making and purifying antivenoms	Carroll	3
4550019	Manufactura and use of fowl egg antibodies	Polson	
20100233162	Local administration of chicken yolk immune globulins (IgY) to treat and prevent fungal infections	A. Larsson, H. Kollberg	5
20070151928	Purification of immunoglobulins	Grunnar Glad et al.	
20100121035	Purification of immunoglobulins	Maloisel Jean-Luc	7
5420253	Method for purifying egg yolk immunoglobulins	Emery Daryl A. Straub D.	

Problema pe care o rezolvă invenția constă în descrierea unui procedeu de obținere a imunoglobulinelor IgY de găină.

Procedeul conform invenției, înlătură dezavantajele prin aceea că după imunizarea găinilor cu un antigen format dintr-un amestec de tulpini bacteriene rezistent la antibiotice din cadrul aceleiași specii de bacterii, amestecul de imunoglobuline specifice IgY este extras din galbenușul de ou al găinilor imunizate cu respectivul antigen în apă ionizată, la pH 5 prin congelare rapidă timp de 60 min la -40°C și decongelare rapidă la +20°C, purificarea prin filtrare tangențială prin casete de 200 kDa și casete de 30k Da.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- nu interacționează cu factorul reumatoid la mamifere. Acesta este un avantaj considerabil în cazul când testul se face pe probe de ser de mamifere, nu cuplează cu receptorul Fc de pe suprafața celulelor;
- nu cuplează proteina A sau proteina G;
- particulele de latex sensibilizate de molecule IgY nu agreghează factorul reumatoid (ca în cazul anticorpilor IgG);
- complexe latex-IgY au o stabilitate mai mare decât IgG la pH 8;
- în IgY nu se pot găsi ca impurități IgM și IgA;
- IgY pot să cupleze selectiv de cinci ori mai mulți anticorpi secundari decât IgG;
- segmentul Fc din IgY se cuplează ferm la particulele de latex la pH 8;
- 12 ouă conțin aproximativ 1 gram de anticorpi IgY, ceea ce este echivalent cu cantitatea de IgG total prezent în aproximativ 100 ml de ser;
- o singură găină poate înlocui producția de ser a 12 iepuri pe o perioadă de un an;
- aproximativ 2,5 g de IgY total se pot produce per găină/lună. Cantitatea de anticorpi specifici-antigen variază de la 0,5 la 10% din IgY total. Aceste diferențe sunt în legătură cu tipul de antigen folosit.

A fost realizat un program intensiv de cercetare privind obținerea și valorificarea imunoglobulinelor prezentate mai jos. S-a urmărit obținerea unor anticorpi policlonali care să acționeze specific asupra mai multor epitopi, metodele de producție să asigure păstrarea activităților specifice la nivelul maxim iar metodele de control să ne permită evalua corect activitatea acestora asupra antigenului dat. Surprinzător, noi am descoperit că se poate prepara un antigen complex folosind adjuvant QS21 care poate fi aplicat foarte ușor după metodologia prezentată. 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. Folosind setul de evaluare IMB- (brevet în lucru) cu care se testează tulpinile izolate de la fiecare pacient se poate realiza un program de tratament specific folosind IgY care acționează direct și blochează multiplicarea bacteriilor *in vitro*.

RO 129645 B1

1 Prezenta invenție este pentru a produce IgY din gălbenușul de ou, care are
următoarele etape:

3 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
5 la antibiotic de aceeași specie de bacterii sau un antigen preparat dintr-un amestec de tulpini
de la mai multe specii de bacterii;

7 b. prepararea antigenului în amestec cu un adjuvant QS21;

9 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;

11 d. extragerea gălbenușului din aceste ouă care provin de la găini imunizate cu
antigenul dat extrăgând fracțiunea solubilă în apă care conține IgY, prin separarea de
13 fracțiunea care nu se dizolvă în apă și de granulele de gălbenuș;

15 e. trecerea fracțiunii solubilă în apă prin prefiltre și filtre de 0,45 um și respectiv
0,22 um;

17 f. concentrarea IgY prin filtrare tangențială prin casete de 30 kDa.

19 g. un alt obiectiv al acestei invenții este utilizarea IgY-specific în clinică și laborator.
Anticorpii IgY preparați prin această procedură sunt ușor de preparat și se obțin la un preț
21 convenabil. Acești anticorpi IgY sunt specifici pentru tulpinile bacteriene existente în mediul
înconjurător în România, tulpini care frecvent sunt rezistente la antibiotice. Anticorpii IgY se
23 pot comercializa sub forma unui produs monovalent alcătuit dintr-un singur IgY-specific față
de un singur germene patogen sau ca un IgY multiplu care este un amestec de anticorpi
specificați față de mai multe specii de bacterii patogene izolate de la om;

25 h. încă un obiectiv al invenției este să se asigure o nouă imunoglobulină pentru
testele de laborator folosind IgY-specific purificat. IgY-specific se folosește la evaluarea
27 calitativă și cantitativă a sensibilității bacteriilor patogene izolate de la pacienții bolnavi în
baza căror rezultate se stabilește conduita terapeutică.

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

29 IgY-specific se prepară prin extracția fazei apoase din gălbenuș, filtrări successive
și tratări prin filtrare tangențială astfel:

31 - identificarea și măsurarea conținutului de proteină prin Coomassie Blue;

33 - IgY-specific identificat prin imunodifuziune în gel de agar față de IgY standard
internațional (USA);

35 - IgY-specific identificat prin testul de imunodifuziune radiară în gel de agar față de IgG
anti IgY de iepure;

37 - IgY-specific identificat prin testul ELISA folosind IgG anti IgY de iepure;

39 - IgY-specific determinat cantitativ prin testul ELISA față de IgY standard internațional;

41 - IgY-specific identificat prin testul de inhibiție a multiplicării bacteriene (IMB) folosind
cultură de bacterii standard ATCC;

43 - IgY-specific identificat prin testul de inhibiție a multiplicării bacteriene (IMB) folosind
cultură de bacterii standard ATCC și evaluat prin determinarea spectrofotometrică a turbidității
45 culturilor testate cu IgY-specific și cu matorul de reacție IgY-SPF, IgY extras din gălbenușul
ouălor de la găini libere de germeni patogeni specifici (SPF).

Procedura fluxului tehnologic

47 Extragerea anticorpilor IgY din gălbenușul ouălor provenite de la găini imunizate cu
un antigen dat are și rațiune economică având un preț de cost redus. În acord cu prezenta
49 invenție prepararea IgY-specific cuprinde o serie de etape dintre care: prepararea antigenului
(1), imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF (2) extragerea anticorpilor din
gălbenuș și purificarea parțială (3), evaluarea calitativă și cantitativă a anticorpilor, purificarea
și concentrarea anticorpilor prin filtrare tangențială (4).

RO 129645 B1

<i>1. Prepararea antigenului</i>	1
În acord cu prezenta invenție sunt izolate de la pacienți tulpini bacteriene rezistente la antibiotic 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 min sunt liofilizate în flacoane de 10 ml, cate 4 ml de suspensie bacteriană în fiecare flacon. După liofilizare flacoanele se conservă la -20°C. 50 mg de bacterii se resuspendă în soluție tampon fosfat (PBS) la concentrația care reprezintă densitatea optică 600 (OD ₆₀₀) 1,00 și se amestecă cu 45 μl de adjuvant QS21.	3 5 7
<i>2. Imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF</i>	
Antigenul se administrează prin injecție intramusculară câte 0,5 ml în patru puncte diferite în mușchii 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 anti antigenul dat din sânge și gălbenuș folosind testele ELISA, ID și IMB-specific. Recoltarea ouălor se face la 14 zile de la cea de-a 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. Extragerea anticorpilor din gălbenușul ouălor care provin de la găinile imunizate cu antigenul dat se poate face la volume mari fără a se face investiții mari.	9 11 13 15 17
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, intramusculară, intravenoasă.	19 21
În prezenta invenție se folosește ca adjuvânt QS21. Se poate folosi și alte tipuri de adjuvanți dintre care adjuvant Freund complet sau adjuvant Freund incomplet, sau o combinație a acestora.	23
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 tirtu mare pentru o perioadă lungă de timp, 12 luni cât a ținut experimentul, adjuvantul QS21 are un rol important în prepararea anticorpilor specifici.	25 27
<i>3. Extragerea și purificarea parțială a anticorpilor</i>	29
Procedura de extracție a fracțiunii solubile în apă la pH 5 prin care se recoltează majoritatea anticoprilor care se separă de biomoleculele insolubile în apă și a granulelor de gălbenuș se poate face prin mai multe metode. În acest brevet s-a urmărit o procedură simplă care să permită conservarea cantitativă și calitativă a anticorpilor din gălbenușul ouălor provenite de la găinile imunizate cu antigenul dat. În acest brevet se folosește congelarea rapidă a amestecului de gălbenuș în apă la pH 5 la -22°C/-50°C și decongelarea rapidă la +20°C.	31 33 35
În prezenta invenție gălbenușul se separă de albuș, spălând cu apă distilată pentru a elimina cât mai mult posibil albușul. Membrana vitelină se taie și se separă fracțiunea de gălbenuș care se diluează 1:8 în apă deionizată la +4°C sau în soluție apoasă tamponată la pH 5 considerat un factor important în purificarea parțială a anticorpilor. Congelarea rapidă a amestecului de gălbenuș la -22°C/-50°C și decongelarea rapidă la +20°C. După separarea celor două fracții, extracția fracțiunii apoase se face prin absorbție folosind o pompă peristaltică, reprezentând 40-60% din amestec. În acest moment se adaugă în fracțiunea proteică recoltată Thimerosal 1:10000.	37 39 41 43
Supernatantul recoltat din amestec se filtrează prin prefiltre EKS2 și EKS1, după care este conservat la +4°C în timp ce se fac determinări cantitative și calitatite. Determinările cantitative se referă la conținutul proteic făcut la substanța uscată după liofilizare, prin testul Bradford, iunodifuziune radiaară, ELISA și IMB-specific. Determinarea calitativă se face prin testul de imunodifuziune în gel de agar, ELISA, imuno-electroforeză.	45 47 49

RO 129645 B1

1 4. Purificarea, evaluarea și concentrarea anticorilor

3 După evaluările cantitative și calitative ale seriei de IgY preparat se face o filtrare
tangențială pentru eliminarea particulelor de peste 200 kDa după care se trece printr-o altă
5 casetă de 30 kDa concentrând produsul proteic. În funcție de destinația seriei de IgY se
readministrează Thimerosal at 0,01% sau Gentamicin sulfat at 50 µg/ml.

7 Anticorpul din gălbenuș purificat după metoda prezentată mai sus care reprezintă
invenția este un IgY omogen, puritatea a fost determinată printr-un set de teste dintre care
ID, ELISA, ID radiar IMB-specific .

9 IgY-specific obținut prin prezenta invenției nu reacționează cu sistemul complement
și nici cu factorul reumatoid din serurile de mamifere. În aceste condiții invenția oferă un nou
11 tip de anticorpi utili în clinică, cercetare și laborator. Invenția oferă o mare varietate de
formule folosite în clinică și cercetare cu anticorpii preparați în acord cu această invenție.

13 IgY preparat după această invenție se poate folosi cu succes pentru decelarea ger-
menilor nepatogeni sau patogeni de exemplu *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*,
15 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* și alte specii de bacterii, hormoni dintre care hormoni
estrogeni, progesteroni sau alții, antigenul de histocompatibilitate, virusuri dintre care virusul
17 rabic, virusurile patogene de la pasări, porcine, bovine etc, folosind teste de rutină dintre care
testul de imunodifuziune în gel de agar Ouchterlony, imunodifuziunea radiară, testele ELISA,
19 testul IMB-specific , testul Western blot, testul imunologic turbidimetric etc.

21 Folosind IgY-specific preparat în condițiile prevăzute în prezenta invenție se pot
structura seturi de diagnostic dintre care testul de imunodifuziune radiară simplă (SRID),
testul de imunodifuziune în gel de agar Ouchterlony (SPGA), ELISA, testul LMB-specific, în
23 care IgY specific și IgY-SPF nespecific preparate după metodologia din prezentul brevet
constituie principalii reagenți care pot fi utilizați în geluri de agaroză sau agar, în testul ELISA
25 și în bulionul folosit în testul IMB-specific. Toate testele menționate mai sus folosesc
interacțiunea între anticorp/antigen.

27 Un alt exemplu în care se folosește IgY preparat după metoda din acest brevet de
invenție este testarea unui antigen dat prin testul de imunodifuziune radiară simplă în agar
29 sau agaroză.

31 a. Se prepară gelul de agar sau agaroză în plăcile de reacție de unică folosință în
care s-a înglobat IgY- specific la pH 5-7.

33 b. Se practică orificii cu diametru diferit (4-6 mm) în gelul solidificat la distanțe de
minimum 10 mm.

35 c. Se prepară diluțiile de antigen în soluție tampon fosfat (PBS) la pH 6-8.

37 d. Se repartizează 40 µl de antigen în fiecare godeu.

39 i. Se incubează placa în mediu umed la +37°C timp de 24 h.

41 f. Se constată difuziunea radiară și se măsoară, comparând-o cu diametrul probelor
martor de control. Concentrația de antigen se calculează prin corelația lineară log 10.

43 Un alt exemplu pentru utilizarea IgY-specific din prezenta invenție este în tratamentul
preventiv sau curativ al infecțiilor bacteriene, virale, micotice, cu levuri unde IgY specific se
45 administrează per os pentru afecțiuni digestive, per os cu gargarisme pentru afecțiuni
pulmonare sau cu alte localizări în organismul uman, intranasal pentru afecțiuni pulmonare,
43 infecții virale sau infecții cu alte localizări în organismul uman, administrare cutanată pentru
infecții cutanate, administrări intraperitoneale, intravenoase sau intramusculare pentru
tratamentul infecțiilor cu bacterii sau virusuri la om.

47 Un exemplu pentru această utilizare a IgY-specific în tratamentul afecțiunilor gastrice:

- se izolează bacteria patogenă care produce afecțiunea digestivă;

49 - se stabilește specificitatea și acțiunea inhibitorie asupra bacteriilor izolate de către
IgY-specific folosind testul IMB-specific ;

RO 129645 B1

- se administrează oral doza prestabilită unică sau fracționată de minimum 200 mg de IgY sau 20 mg de IgY specific 4-6 zile consecutiv;	1
- tratamentul cu IgY-specific se poate face folosind și antibiotic a cărui activitate va fi potențializată de 5-10 ori;	3
- se urmărește evoluția clinică și prezența bacteriilor patogene în conținutul intestinal;	5
- tratamentul aplicat la copii este de 4 zile, iar la adulți de 6 zile și este determinat de evoluția clinică și controlul privind conținutul de bacterii din intestine.	7
- tratamentul pacienților cu infecții vechi depinde de evoluția bolii și se apreciază că prin administrarea IgY-specific se urmărește blocare evoluției infecției de la stadiul pe care îl are pacientul la data tratamentului.	9
- în cazul infecției cu Rotavirus la copii se folosește aceeași procedură de tratament administrându-se IgY, în doză de 50 mg de IgY sau 5 mg de IgY-specific, patru zile consecutiv urmărindu-se evoluția clinică și conținutul de virus din intestin.	11
În continuare sunt prezentate 10 exemple de realizare a invenției în legătură cu fig. 1...10 care reprezintă:	13
- fig. 1, fluxul tehnologic al procedurii;	15
- fig. 2, reproductibilitatea reacției enzimatică în testul ELISA pentru identificarea IgY folosind IgG de iepure anti IgY;	17
- fig. 3, testarea IgY standard, în diluții succesive față de IgG de iepure anti IgY;	19
- fig. 4, test ELISA pentru <i>Salmonella enteritidis</i> / <i>Salmonella typhimurnim</i> ;	21
- fig. 5, IgY anti <i>Salmonella enteritidis</i> standard. Reproductibilitatea testului imunoenzimatic folosind imunoglobuline de pasăre (IgY);	23
- fig. 6, rezultate obținute în ID coroborate cu valorile testelor ELISA, Bredford și 1MB-specific;	25
- fig. 7, testarea prin IDR a serului de iepure anti IgY față de IgY;	27
- fig. 8, determinarea conținutului de proteină folosind testul Bredford;	29
- fig. 9, determinarea inhibiției multiplicării bacteriene folosind testul IMB specific;	31
- fig. 10, Inhibarea multiplicării bacteriene IMB specific <i>Staphylococcus aureus</i> , tulpini rezistente la antibiotice.	33
Exemplele de mai jos au drept scop ilustrarea și nu au intenția de a limita scopul prezentei invenții.	35
Exemplul 1	
a. Fiecare tulpină bacteriană va fi însoțită de certificatul de calitate emis de o instituție autorizată.	37
b. Fiecare tulpină va fi conservată la -75°C ca produs original. Multiplicarea bacteriilor pentru prepararea antigenului se va face în mediul de cultură recomandat.	39
c. Din cultura de bacterii de 24 h se prepară un sediment de bacterii echivalent cu 2 x 10 ¹⁰ UFC, prin centrifugare 15 min la 4000 rpm la +20°C.	41
d. Peleta rezultată se resuspendă în PBS la volumul inițial și se liofilizează 2ml în flacoane de 4 ml. După liofilizare cultura bacteriană se conservă la -20°C.	43
e. Peleta rezultată la punctul (c) se resuspendă la volumul inițial în 0,4% formol în PBS și se incubează peste noapte la +37°C. Formolul se elimină prin centrifugare 15 min la 4000 rpm la +20°C. Bacteriile inactivate se resuspendă în PBS și se liofilizează. După liofilizare flacoanele se conservă la -20°C.	45
f. Antigenul se prepară folosind 500 μg de celule/ml inactivate sau 3-4,5 μg de proteină/ml care se reconstituie în 0,5 ml PBS și se amestecă cu 0,5 ml de adjuvant QS21. Amestecul se diluează în părți egale cu emulsificator Tween 20 5% pentru imunizarea găinilor.	47

RO 129645 B1

1 g. Antigenul este un amestec de tulpini din cadrul aceleiași specii de bacterii sau un
amestec de tulpini bacteriene.

3 h. Găini ouătoare convenționale sau SPF la vârsta de 140-180 zile, clinic sănătoase,
sunt crescute în grupuri de câte 10, în cuști formate într-o baterie de creștere special confec-
5 ționată cu furajare și adăpare automată. Fiecare găină este individualizată prin matriculare
la ambele aripi.

7 i. Găinile sunt imunizate intramuscular, în patru puncte diferite cu 2 ml din antigenul
dat preparat ca la punctul (f).

9 j. După prima administrare găinile primesc alte două administrări din același antigen,
pe aceeași cale de administrare la interval de 14 zile.

11 k. La cea de-a doua și respectiv a treia administrare se prelevă sânge pentru
controlul răspunsului imun față de antigenul dat.

13 l. 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
15 la +4°C sau la -20°C.

m. Pentru evaluarea răspunsului imun se folosesc testul ELISA calitativ și cantitativ,
17 testul de imunodifuziune în gel de agar (SPGA), testul de imunodifuziune radiară simplă și
testul IMB-specific. Activitatea anticorpilor extrași din gălbenușul de ou se apreciază folosind
19 fiecare test în parte. Răspunsul imun se verifică prin:

21 - testul de seroprecipitare în gel de agar (SPGA) pentru care se folosesc serul brut
în comparație cu IgY standard. Reacția lineară dintre antigen și seruri trebuie să se unească;

23 - testul SPGA în care se folosesc diluții binare de IgY testate față de antigenul dat.
Se apreciază diluția maximă la care există un răspuns specific și se compară cu etalonul
propriu;

25 - testul ELISA calitativ;
- testul ELISA cantitativ;
27 - testul de proteină BRADFORD;
- testul IMB-specific.

29 n. Se admit în producția de IgY găinile care au răspuns pozitiv la administrarea
antigenului dat.

31 o. Se consideră momentul optim de recoltare a ouălor atunci când se extrage din
gălbenuș 100-200 mg de IgY respectiv 10-20 mg IgY specific.

33 **Exemplul 2**

Extragerea IgY

35 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
37 dat.

39 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 min la temperatura camerei.

41 c. Se corectează pH-ul la 4-7 și se adaugă Thimerosal 0,01%.

43 d. Amestecul se congelează la -20°C/-40°C direct sau în trepte, câte un grad pe minut
folosind azot lichid.

45 e. După congelarea întregului amestec se decongelează la temperatura de +20°C.

47 f. După separarea celor doua faze lichidă și 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 20 kDa pentru a se
reține biomoleculele insolubile în apă, majoritatea lipide și granule de gălbenuș.

RO 129645 B1

h. IgY se conservă la +4°C pentru a se efectua determinările cantitative și calitative de rutină.	1
Determinările cantitative și calitative se fac folosind:	3
- tesul de seroprecipitare în gel de agar (SPGA) Outcherlony;	
- testul SPGA în care se folosesc diluții binare de IgY testate față de antigenul dat;	5
- testul ELISA calitativ;	
- tesutl ELISA cantitativ;	7
- tesul Bradford pentru determinarea proteinei totale;	
- testul IMB-specific.	9
Exemplul 3	
<i>Condiționarea IgY</i>	11
După stabilirea activității de inhibare specifică a multiplicării bacteriilor și conținutul în proteină și respectiv IgY-specific, IgY se condiționează prin:	13
a. filtrarea tangențială folosind casete de 30 kDa. Prin această procedură se face o purificare a IgY prin schimbarea succesivă a soluției de spălare (PBS) la pH 7 din instalația de filtrare;	15
b. concentrarea IgY se efectuează prin filtrarea tangențială eliminând excesul de PBS;	17
c. în soluția de IgY se adaugă Gentamicină sulfat 50 µg/ml;	19
d. IgY preparat conform pct. 3(c) se filtrează prin filtre de 0,45 µm și respectiv 0,22 µm în spații special amenajate, cu aer steril filtrat prin casete cu un randament de 99,997 pentru particule de 0,1 µm într-un spațiu de lucru la standard GMP;	21
e. concentrația optimă de IgY se stabilește în funcție de utilizarea acesteia:	23
- 200 mg de IgY în 80 ml de soluție pentru spălaturi bucale și gargară și/sau administrare orală;	25
- 200 mg de IgY în 8 ml de soluție salină. (PBS) pentru administrare orală la adult;	
- 200 mg de IgY din care 20 mg de IgY specific în 8 ml de soluție salină (PBS) pentru administrări intramusculare, intravenoase, intraperitoneale;	27
- 25 mg de IgY în 2 ml de soluție salină (PBS) pentru administrare orală la copii;	29
- 100 mg IgY în 2 ml de soluție salină (PBS) pentru administrare intranasală.	
f. IgY preparat conform punctul 3(c) se liofilizează 30 ml de soluție IgY în flacoane de 100 ml sau 2000 ml în tăvi de inox;	31
g. IgY preparat conform punctul 3(f) se reconstituie în apă distilată la concentrația de 100 mg IgY per ml și se sterilizează prin filtrare (filtru de 0,22 µm) pentru administrarea intranasală;	33
h. IgY preparat conform punctul 3(f) se amestecă în raport de 20 mg de IgY per gram de gel sau vaselina pentru administrări cutanate;	37
i. IgY preparat conform punctul 3(f) se amestecă în raport de 20 mg de IgY per ml în soluție salină (PBS) pentru utilizarea în setul MB-specific;	39
j. IgY preparat conform punctul 3(f) se amestecă în raport de 20 mg de IgY per ml în soluție salină (PBS) pentru teste serologice dintre care ELISA, SPGA și altele.	41
IgY preparat conform punctul 3(d) și (f) se divizează aseptice în flacoane, fiole sau tuburi corespunzătoare dozajului sau căilor de administrare.	43
Exemplul 4	
<i>Control final al IgY</i>	45
a. pentru forma finală a IgY în soluție pentru administrări parenterale. intranasale, orală se folosesc metodele de control:	47
- sterilitate microbiologică;	

RO 129645 B1

- 1 - stabilirea activității specifice a IgY folosind testul ELISA și SPGA;
- stabilirea conținutului de IgY folosind testul ELISA;
3 - stabilirea activității de inhibare a multiplicării bacteriene folosind testul IMB-specific.
b. pentru forma finală a IgY în gel sau unguent se efectuează controalele de la pct.
5 4(a) după extragerea IgY în apă deionizată din conținutul amestecului;
c. se admit în consum uman numai seriile de IgY-specific care corespund controalelor
7 efectuate conform punctul 4(a) și punctul 4(b).

Exemplul 5

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 reproducti-
bilității reacției imunoenzimatică 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 (USA) sau comparativ cu un subetalon IgY
preparat la Romvac.

b. godeurile se căptușesc cu 150 μl 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 min la +37°C.

d. se spală de patru ori cu câte 300 μl PBS-Tween folosind o mașină automată de
spălat microplăci.

e. în fiecare godeu se adaugă 200 μl de 1% BSA în PBS-Tween și se incubează 45
min 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 ui IgY standard SIGMA (25, 12,5,
6,25 μg/ml).

i. plăcile sunt incubate la +37°C pentru 90 min.

j. plăcile de spală de patru ori cu PBS-Tween.

k. se adaugă 150 μl IgG anti IgY conjugat cu peroxidază la diluția 1:5000.

l. se adaugă 150 μl TMB și se incubează 5-15 min la temperatura camerei, la
întuneric.

m. se blochează reacția cu 150 μl HCl.

n. reacția se citește la spectofotometru 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 căptușește peste noapte la +4°C sau în 2 h 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 h la +37°C.

f. se spală de 4 ori cu soluție de spălare.

g. se adaugă 100 μl TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min.

RO 129645 B1

h. se adaugă 100 µl soluție de stopare.	1
i. se citește absorbanta reacției la un spectofotometru cu filtru de 450 nm.	
j. interpretarea reacției se face prin controlul godeurilor Blanck unde DO_{450} trebuie să fie maximum de 0,060. În cazul când sunt alte valori reacția nu se alidează.	3
k. se consideră ca reacție pozitivă pentru prezența IgY, diluția la care DO_{450} este de 0.200 sau mai mare.	5
l. În cazul când placa de reacție se validează se compară reacțiile pozitive de la IgY-testat față de IgY standard internațional.	7
m. conținutul în µg/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.	9
Exemplul 6	11
<i>Determinarea conținutului de IgY specific prin testul ELISA</i>	
Activitatea specifică IgY se determină cantitativ față de antigenul reprezentat de celulele întregi bacteriene inactivate și liofilizate conform punctului (1). Placa de reacție se captează 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 5-10 ng de IgY-specific per godeu, per 150 µl.	13
a. se captează 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).	15
b. placa captușită se păstrează 12 h (peste noapte) la +4°C.	17
c. după îndepărtarea lichidului, placa se spală de 3 ori cu soluția de spălare PBS-Tween 20 (2%).	19
d. reacția se blochează cu tampon de fixare, câte 300 µl/godeu și se incubează 30 min la temperatura camerei.	21
e. se înlătură lichidul de blocare.	23
f. placa se usucă 30 min la exicator;	25
g. se repartizează în fiecare godeu 100 µl din suspensia de IgY diluată 1:1000 în diluții binare până la 1:24, conform configurării plăcii. IgY de evaluat se va testa în triplicat.	27
h. se mențin godeul AI și HI ca martori pentru antigen, godeurile BI, CI și DI ca martori negativ de reacție folosind IgY-SPF și godeurile EI, FI și GI ca martor pozitiv de reacție folosind IgY-specific de referință Romvac.	29
i. se incubează placa 2 h la +37°C.	31
j. se spală de 3 ori cu soluție de spălare.	33
k. se adaugă 100 µl de conjugat anti IgG anti pasăre diluat 1:5000, folosind ca diluant tamponul de diluție.	35
l. placa se incubează 2 h la +37°C.	37
m. placa se spală de 4 ori cu soluție de spălare.	39
n. se adaugă 100 µl TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min.	41
o. se adaugă 100 µl soluție de stopare.	43
p. se citește reacția la un spectofotometru la absorbanta 450 nm.	45
q. se validează reacția când reacția din godeurile martor blanck AI și HI au valori mai mici de 0,060 OD, când reacția din godeurile BI, CI și DI martor IgY-SPF (negativ) au valori de 0,060-0,090 OD, iar în godeurile martor pozitiv EI, FI, GI sunt valori de 1,400-1,800 OD.	47
Reproductibilitatea reacției enzimatică în testul ELISA pentru identificare IgY folosind IgG de iepure anti IgY este reprezentată în fig. 2.	

RO 129645 B1

1 Testare IgY standard în diluții successive față de IgG de iepure anti IgY este
reprezentată în fig. 3

3 Evaluarea conținutului IgY din probe prelucrate termic. Diferențele se datorează
conținutului diferit de IgY din probele controlate, comparativ cu subetalonul Romvac.

5 Experiment 6.2. ELISA *Salmonella enteritidis/Salmomlla typhimurnim* este
reprezentată în fig. 4.

7 Raportul optim antigen și IgY la diluția 1:1000
S. enteritidis antigen 10^{-5} 1285 OD
9 *S. typhimurium* antigen 10^{-6} 1134 OD
Pe placă se poate constata reacția dintre antiegn și IgY specific și corelația dintre
11 diluțiile acestora, folosind IgY la diluția de 1:1000.
Se observă în cele două grafice răspunsuri diferite la *S. enteritidis* și *S. typhimurium*.
13 Testul s-a folosit pentru stabilirea raportului optim între antigen și IgY specific care urmează
a fi folosit în testele ELISA.

15 **Experiment 6.3**
IgY anti *Salmonella enteritidis* standard. Reproducibilitatea testului imunoenzimatic
17 folosind imunoglobuline de pasăre (IgY), reprezentat în fig. 5.
IgY specific seria # 004 liofilizat.
19 IgY se reconstituie în apa deionizată și se prepară diluții zecimale.
Placă de reacție se captușește cu IgY.
21 IgY se evidențiază cu ser (IgG) anti IgY marcat cu peroxidază.
Diluția maximă unde s-a identificat IgY SE 004 a fost de 10^{-11} .
23 În acest experiment se poate demonstra reproducibilitatea reacției imune a IgY
folosind testul ELISA.

25 ELISA EC și KP 006-08/11/2013
Martori
27 Blank A1 și A7
Ser negativ IgY: H # 1 și 2, H # 7 și 8.
29 Titrare în diluții zecimale coloanele # 1, 2, 3 (EC) și # 78,9, (KP).
Titrare în diluții binare coloanele # 1, 2, 3 (EC) și 10, 11, 12 (KP).
31 Titru pentru *E.coli*: 1:64000 și *K. pneumoniae* 1:32000
Grafic # 2. Diluții binare. Titru ELISA 1:32000 Grafic # 1 Diluții binare. Titru ELISA
33 1:64000
Titru pentru *E. coli*: 1:64000 și *K. pneumomae* 1:32000

35 **Exemplul 7**
Determinarea IgY prin SPGA
37 **Testul de imunodifuziune în gel de agar Oucelony pentru evidențierea IgY nespecific**
Principiu
39 Testul ID se bazează pe migrarea în gelul de agar a antigenului (IgY) și anticorpilor
(ser de iepure anti IgY) care la locul de contact se combină specific și formează un precipitat
41 care se vizualizează sub forma unei linii de precipitare.
Prepararea gelului de agar
43 Pentru efectuarea testului se prepară un gel de agar/agaroză 1% preparat în tampon
PBS cu azidă (NaCl 0,1 M, tampon fosfat 0,01 M pH 7,2 cu azidă de Na 0,02%).
45 Amestecul se fierbe la baia marină până la completa dizolvare a agarului și apoi se
filtrează printr-un tampon de vată. Gelul de agar se folosește imediat sau se poate păstra la
47 frigider (+4/+8°C) cel mult 2 luni din momentul preparării, în flacoane cu dop sau în tuburi cu
câte 17 ml de gel (cantitatea necesară pentru a turna o placă cu diametrul de 90 mm).

RO 129645 B1

<i>Pregătirea plăcilor pentru reacție</i>	1
În plăci Petri din plastic cu diametru de 90 mm se toarnă 17 ml agar la temperatura de 45-60°C. Plăcile se lasă pentru solidificare la temperatura camerei. Cu o matriță se taie seturi de câte 7 godeuri (unul central și 6 periferice) cu diametru de 5 mm și la distanță de 3 mm între ele. Se îndepărtează rondelele de agar din fiecare godeu prin aspirare. Plăcile se lasă în continuare la temperatura camerei timp de cel puțin 30 min deoarece lichidul existent în godeuri poate să dilueze reagenții, acesta fiind obligatoriu aspirat înainte de umplerea godeurilor cu reagenți.	3 5 7
<i>Repartizarea reagenților și incubarea plăcilor de agar:</i>	9
- în godeul central se repartizează 40 μl ser de iepure anti-IgY, iar în godeurile 1, 3 și 5 se repartizează câte 40 μl IgY de referință. În godeurile 2, 4 și 6 se repartizează câte 40 μl IgY de testat. Prin acest aranjament, fiecare IgY de examinat se află lângă IgY Etalon, fapt care ușurează interpretarea specificității liniilor de precipitare. Umplerea godeurilor cu reagenți trebuie să fie adecvată și uniformă până la dispariția meniscurilor. Reagenții nu trebuie să depășească nivelul superior al godeurilor din agar. După umplere, plăcile se lasă pe masa de lucru timp de câteva minute pentru a reduce riscul de pierdere și amestecare a reagenților. Plăcile se acoperă cu capacul și apoi se păstrează la temperatura camerei în atmosferă umedă;	11 13 15 17
- pentru determinarea titrului IgY de testat, se fac diluții de la 1:2 la 1:2048, repartizând fiecare diluție în godeurile laterale; în godeul central se repartizează serul de iepure anti IgY.	19 21
În reacție se folosesc martori IgY-SPF sau IgY de referință Romvac, al căror conținut este cunoscut și IgY-standard internațional (USA).	23
<i>Citirea și interpretarea rezultatelor</i>	
Reacțiile de imunodifuziune se citesc și interpretează la 24 h de la efectuare, cu ajutorul unui fascicul puternic de lumină proiectat oblic pe fundul plăcii de reacție. Linia pozitivă de control se ia în considerare pentru citirea testului. Dacă nu apare o linie de control distinctă, testul nu este validat și trebuie să fie repetat. Se pot observa următoarele tipuri de reacții:	25 27 29
- <i>Reacții pozitive:</i> liniile de precipitare date de IgY Etalon se unesc cu liniile de precipitare date de IgY de testat;	31
- <i>Reacții negative:</i> liniile de precipitare date de IgY Etalon ating godeul cu proba de testat fără a se îndoi. IgY de testat nu prezintă linie de precipitare;	33
- IgY testat în diluții prezintă reacție intensă de precipitare, în funcție de titrul său, la una din diluțiile efectuate (de exemplu: la 1:32 = titrul optim). Se poate stabili titrul - minim la IgY la ultima diluție care mai prezintă linie de precipitare (de exemplu: 1:2048).	35
- <i>Reacții nespecifice:</i> linii de precipitate care nu se continuă cu liniile date de IgY Etalon, ci se întretaie cu aceste linii.	37
Rezultatele obținute în ID sunt coroborate cu valorile testelor ELISA, Bredford și 1MB-specific sunt reprezentate în fig. 6 în care:	39
Goodeul central: IgY de iepure anti IgY	41
Godeul nr. 1 IgY standard (USA), o singură linie de precipitare	
Godeurile nr. 2 și 3 IgY-specifice anti <i>S. enteritidis</i> și <i>S. typhimurum</i>	43
Godeul nr. 4 IgY-specific anti <i>E. coli</i>	
Godeul nr. 5 IgY specific anti <i>Bacillus anthracis</i>	45
Godeul nr. 6 IgY-specific anti <i>Klebsiella pneumoniae</i>	

RO 129645 B1

1 Exemplul 8

3 *Determinarea conținutului de IgY folosind testul de imunodifuziune radiară simplă Mancini*

5 Imunidifuziuna radiară simplă (IDRS) a fost acceptată ca un mijloc sigur de determi-
7 nare cantitativă a antigenului și/sau a serului folosind un reagent etalon (27, 28). Folosind
IDRS se poate confirma cu mare acuratețe conținutul de proteină din IgY față de IgG de
iepure anti IgY. În acest scop se recomandă gelul preparat din geloză sau agar iar testul se
realizează în următoarele etape:

- 9 a. prepararea amestecului de agaroză 1% în PBS conținând azidă de sodiu 0,05%;
 - 11 b. se încălzește agaroză la 80-90°C;
 - 13 b1. se include în agaroză 0,33 ml IgG anti IgY per gram de agaroză;
 - 15 c. se răcește agaroză 45-50°C și amestecul cu IgG anti IgY 0,33 ml/ml de agaroză;
 - 17 d. se păstrează la 45-50°C un mililitru de agaroză;
 - 19 e. se toarnă agaroză în placa de unică folosință 4 ml/6 cm diametru;
 - 21 f. se răcește placa la temperatura camerei;
 - 23 g. se perforază godeuri cu diametrul de 6 mm la distanțe de minimum 20 mm;
 - 25 h. se repartizează 0,30 ml de agar cald în fiecare godeu;
 - 27 i. se răcește placa cu agar la temperatura camerei;
 - 29 j. se repartizează 30 μl de IgY brut și în diluții succesive 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 în PBS în
godeurile practicate în geloză;
 - 31 k. se păstrează plăcile de reacție la temperatura camerei, în mediu umed și citirea
reacției la 24, 48 și 72 h;
 - 33 l. colorarea agarului cu Coomassie Blue:
 - se fixează geloză cu metanol cu 10% acid acetic pentru 30 min la temperatura
camerei. Se înlătură soluția de fixare;
 - se colorează gelul cu 10 volume de colorant Coomassie Blue, timp de o oră la
temperatura camerei. (Soluția de colorant se poate refolosi);
 - se decolorează gelul în 10 volume de decolorant la temperatură camerei timp de
30 min;
 - se repeta decolorarea;
 - se înmoaie gelul 15 min în 1-2% glicerol în apă deionizată;
 - gelul este gata de fotografiat;
 - concomitant se măsoară diametrul fiecărui cerc de precipitare;
 - calcularea echivalentului în miligrame de proteină (IgY) per ml de soluție se face
diametrul cercului de reacție minus diametrul godeului, împărțit la doi (grosimea din ambele
părți) și înmulțit cu 3,3 coeficient de corecție pt. cantitatea de IgY testat per godeu față de
serul de referință. Rezultatul se poate exprima grafic, în funcție de diluțiile folosite pentru IgY.
- Scopul experimentului: Testarea prin IDR a serului de iepure anti IgY față de IgY
- 39 - Antigen: Supematant IgY (S2C1 din 11.06.2012)
 - 41 - Ser pozitiv: ser iepure anti IgY (01.10.2012)
- Rezultate de mai jos sunt reprezentate în fig. 7.

Diluția de IgY	Diametrul	mg/ml
Brut		19,8
1/1	12	9,9
1/2	10,3	7,095
1/4	8,3	3,795

RO 129645 B1

Exemplul 9	1
<i>Determinarea conținutului de proteine folosind testul Bradford</i>	
Testul Bradford se folosește pentru determinarea conținutului proteic în diverse produse biologice printre care și suspensii de IgY.	3
Tehnica Bradford se bazează pe legarea colorantului Coomassie Brilliant Blue G-250 de proteine, ceea ce duce la formarea unui complex proteină-colorant. Acesta are un coeficient de extincție mare conducând astfel la o mare sensibilitate în măsurarea proteinei.	5
Legarea colorantului de proteină este un proces foarte rapid (aproximativ 2 min), iar complexul proteină-colorant rămâne dispersat în soluție pentru aproximativ 1 h. Testul se efectuează la pH acid, maximul de absorbție înregistrându-se la aproximativ 595 nm.	7
Concentrația proteinelor se determină prin comparație cu răspunsul standardului, care poate fi în funcție de natura proteinei testate: albumină serică (BSA), gammaglobulină bovină (BGG) sau imunoglobulină de pasăre (IgY standard).	9
<i>a. Reactivi:</i>	
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich);	15
- Acid orto-fosforic 85% (Merck) Alcool etilic 95% (Chimopar);	
- Albumină serică bovină (Sigma);	17
- IgY standard (Sigma);	
<i>b. Aparatură și materiale:</i>	19
- Cititor de plăci ELISA;	
- Plăci ELISA;	21
<i>c. Prepararea reactivului Bradford</i>	
Soluția stock: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 se dizolvă în 50 ml alcool etilic 95%, se adaugă 100 ml de acid orto-fosforic, apoi se diluează cu apă distilată la volum fix de 200 ml. Se filtrează soluția prin hârtie de filtru (Whatman #1 sau echivalent). Colorantul astfel preparat este stocat în flacon brun, la +4°C și este stabil timp de cel puțin 6 luni.	23
Reactivul Bradford de lucru se prepară diluând soluția stock cu apă distilată în raport 1:5. Acesta se poate păstra la +4°C și este stabil timp de cel mult 7 zile.	25
<i>d. Prepararea soluțiilor standard de proteină</i>	27
- Soluția stoc de proteină standard: se dizolvă 0,2 g din materialul de referință (BSA) în același tampon folosit pentru prepararea soluției de testare și se completează la volum fix de 100 ml. Soluția astfel obținută are o concentrație de 2 mg/ml. Soluția standard IgY se prepară ca la punctul (d).	29
- Soluțiile standard de lucru: se diluează porțiuni din soluția stoc cu același tampon pentru a obține cinci până la șapte diluții etalon cu concentrații cuprinse între 1 și 1500 μg de proteină per ml.	31
<i>e. Prepararea soluției test</i>	33
- Se dizolvă o cantitate adecvată de proteină de testat în tampon astfel încât să se obțină o soluție cu o concentrație cuprinsă în intervalul de concentrații ale soluțiilor standard de lucru.	35
f. Pe placa ELISA se repartizează 25 u.1 probă sau standard în godeuri separate, în replicate.	37
g. Se adaugă 300 μl reactiv Bradford - soluție de lucru și se agită ușor 30 s. Se evită spumarea, care produce erori la citirea absorbantei. Se incubează 10 min la temperatura camerei, la întuneric.	39
h. Se măsoară absorbanta la 595 nm față de martor (tampon); se citește în decurs de 60 min.	41
	43
	45
	47

RO 129645 B1

1 i. Testarea curbei de calibrare. Pentru trasarea curbei etalon se prepară șapte soluții
de lucru cu concentrații de: 62,5; 125; 250; 500; 750; 1000; 1500 μg BSA sau IgY/ml. Fiecare
3 punct de pe curbă se testează în quadruplicat. Variația densității optice a complexului
Coomassie Brilliant Blue G-250-proteină în funcție de concentrația standardului de proteină
5 este prezentată în fig. 1, precum și în imaginea din foto 1. Ecuația drepte de regresie
obținută pentru curba etalon este $y = 1,0017x + 0,0083$.

7 j. *Validarea metodei*. Testarea standardului în quadruplicat trebuie să conducă la
rezultate reproductibile. Sensibilitatea testului este apreciată ca fiind corespunzător în
9 condițiile în care un conținut de 62,5 μg proteină/ml în probă dă un semnal de 0,095 unități
de absorbantă și este reprezentată în fig. 8.

11 k. Metoda Bradford de determinare a proteinei este o metodă sensibilă,
reproductibilă, asigurând un interval confortabil de liniaritate a semnalului: 1-750 μg/mL.
13 Metoda Bradford prezintă avantajul unei bune stabilități a reactivului de culoare (Coomassie
Brilliant Blue G-250). Testele efectuate prin metoda Bradford necesită cantități foarte mici
15 de probă (25 μl). Rezultatele se pot citi la 10 min de la inițierea reacției de culoare.

Exemplul 10

17 *Determinarea inhibiției multiplicării bacteriene folosind testul IMB-specific este*
reprezentată în fig. 9

19 1. IMB este setul standard folosit pentru evaluarea activității de inhibare specifică a
multiplicării bacteriene *in vitro* a imunoglobulinelor (IgY). La baza acestui test este
21 capacitatea anticorpilor specifici de a inhiba, de a neutraliza, multiplicarea bacteriilor. Testul
IMV este monovalent și acționează asupra unui singur grup de epitopi care se găsesc la o
23 singură specie bacteriană. Testul IMB evidențiază și prezența acestor epitopi (15-50%) la
alte specii de bacterii. Testul evidențiază capacitatea de inhibiție a IgY-specific față de tulpini
25 bacteriene sensibile sau rezistente la antibiotice.

27 2. Conținutul trusei IMB.

a. mediul de cultură pentru multiplicarea bacteriilor pentru testare;

b. mediul de cultură cu IgY SPF martor negativ;

29 c. mediul de cultură cu IgY-specific pentru tulpina bacteriană de testat

31 3. Protocolul de lucru.

a. suspensia bacteriană de testat se multiplică în mediul din tubul #1 cu etichetă
neagră. În acest scop în 9,9 ml mediu de cultură se pun 0,1 ml din cultura bacteriană de
33 testat. Cultura se incubează la 37°C pentru 4, 6 sau 24 h;

b. din suspensia bacteriană preluată de la termostat după 4, 6 sau 24 h se iau 0,1 ml
și se amestecă cu 9,9 ml de mediu de cultură, se omogenizează și se citește densitatea
optică la un spectofotometru cu filtru de 600 nm. Densitatea optică trebuie să fie aproximativ
37 0,05 OD₆₀₀;

c. din tubul de diluție se repartizează steril câte 2 ml de suspensie bacteriană în
39 fiecare din cele 2 tuburi rămase în trusă. Probele se incubează la 37°C cu agitare
permenentă. Citirea rezultatelor se poate face la 4 și 8 h de incubație. Citirea finală se face
41 la 24 h de incubație. Citirea se poate face cu ochiul liber și cu un spectofotometru cu filtru
de 600 nm;

d. inhibarea specifică a creșterii bacteriilor se poate observa la 4 și 8 h de incubație
43 la 37°C. Citirea finală se face după 24 h de incubație la 37°C. Efectul inhibitor specific al IgY
45 se poate vedea cu ochiul liber când în proba cu IgY mediul de cultură rămâne transparentă,
iar în proba martor pozitiv mediul are o turbiditate din ce în ce mai mare la 4, 8 și respectiv
47 24 h;

RO 129645 B1

e. se consideră o probă pozitivă când există o diferență vizibilă cu ochiul liber între turbiditatea din proba martor față de proba care conține IgY-specific. În cazul când densitatea optică se evaluează la un spectofotometru proba este pozitivă când diferența între probele martor și proba cu IgY specific este mai mare de 0,1 la OD 600 nm;

f. se consideră un efect optim de inhibiție a multiplicării bacteriene când la 24 h de incubație la 37°C este blocată creșterea bacteriilor, iar valoarea densității optice este de 0,060 OD₆₀₀;

g. se poate aprecia eficiența IgY-specific în funcție de cantitatea de germeni inhibată. În aceste condiții se poate organiza conduita terapeutică folosind o doză unică sau mai multe doze pe zi.

Coloanele albastre sunt IgY-specific polivalent la zero ore (#1) la 4 h (#2) și respectiv la 24 h (#3). Coloanele roșii reprezintă creșterea bacteriilor în mediul de cultură martor cu IgY-SPF la zero ore (#1), la 4 și respectiv la 24 h (#2 și #3) așa cum este reprezentat în fig. 9.

Experiment pentru controlul capacității de inhibare a creșterii bacteriilor de către IgY-specific anti *Salmonella enteritidis*, în comparație cu acțiunea IgY-SPF în proba martor. Pe coloana 1 există o probă la care activitatea de inhibiție a durat 4 h. Pe coloana 2 inhibiția specifică este definitivă. Pe coloana 3 sunt înregistrate valorile probei martor unde creșterea nu este inhibată.

Inhibarea multiplicării bacteriene MB-specific Staphylococcus aureus, tulpini rezistente la antibiotice este reprezentată în Fig. 10.

Proba/timp	Martor pozitiv	Martor negativ	IgY SA Etalon Romvac	IgY SA seria 02	IgY SA seria 03	IgY SA seria 04	IgY SA seria 05
0 h	0,102	0,145	0,085	0,128	0,091	0,092	0,089
4 h	0,130	0,150	0,089	0,127	0,120	0,092	0,088
24 h	1,037	1,283	0,812	0,955	0,088	0,093	0,089

Linia albastră este graficul creșterii la 24 h de incubație la 37°C în proba martor. Linia roșie este inhibiția produsă de IgY anti SA seria 03/2013.

În graficul 2 sunt martorii de testare: martor negativ (mediul de cultură) și martorul pozitiv (mediul de cultura cu IgY SPF).

RO 129645 B1

Revendicări

1

3

1. Procedeu de obținere a imunoglobinelor IgY de găină prin imunizarea găinilor cu un antigen format dintr-un amestec de tulpini bacteriene rezistent la antibiotice din cadrul aceleiași specii de bacterii, **caracterizat prin aceea că**, amestecul de imunoglobuline specifice IgY este extras din galbenușul de ou al găinilor imunizate cu respectivul antigen în apă ionizată, la pH 5 prin congelare rapidă timp de 60 min la -40°C și decongelare rapidă la +20°C, purificarea prin filtrare tangențială prin casete de 200 kDa și casete de 30k Da.

5

7

9

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, antigenul este un amestec de tulpini bacteriene inactivate cu un adjuvant cu rol de stimul antigenic pentru obținerea unui titru mare de IgY.

11

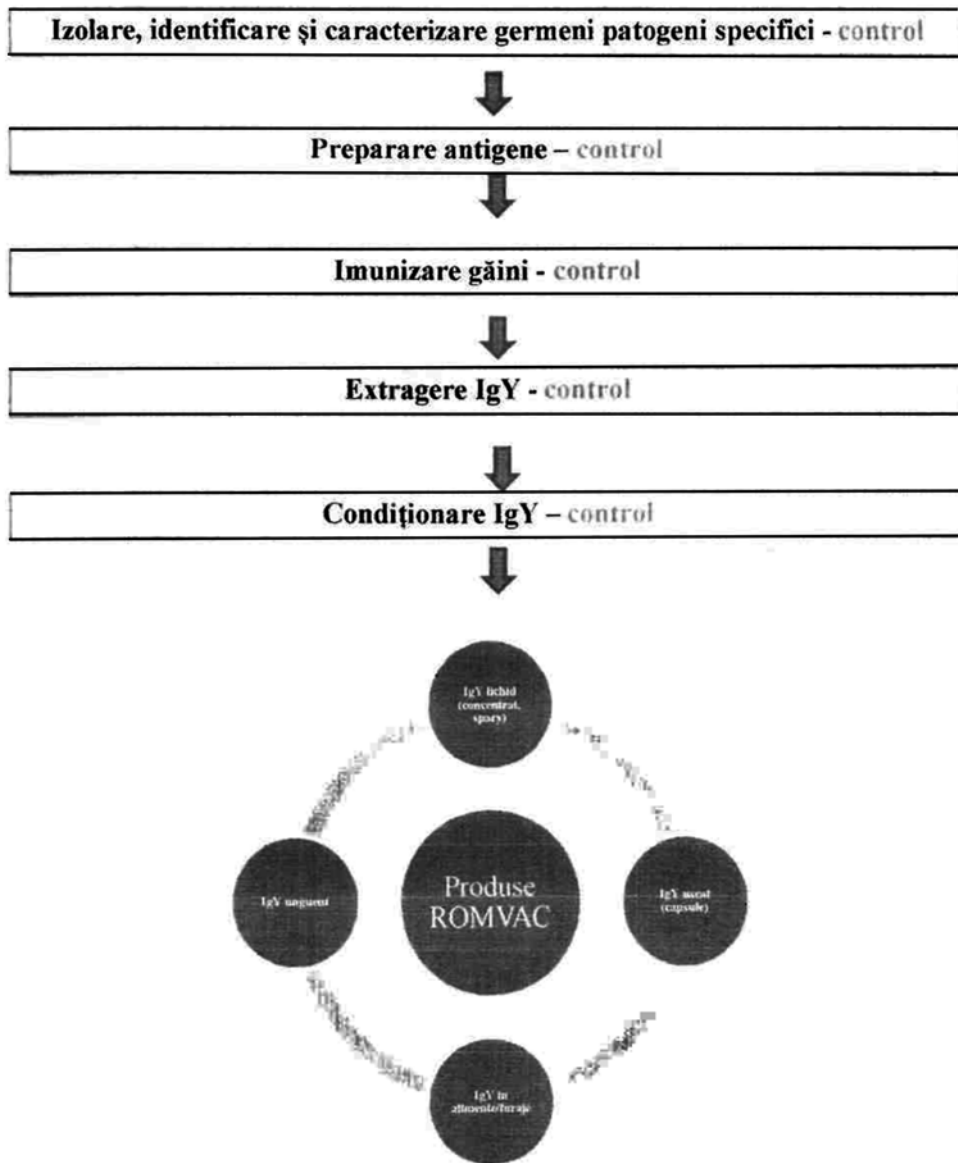


Fig. 1

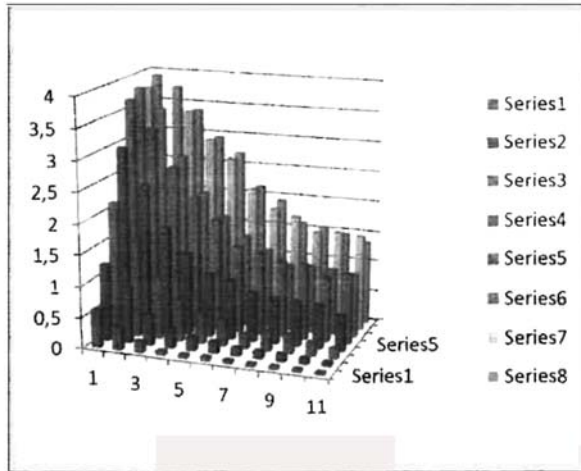
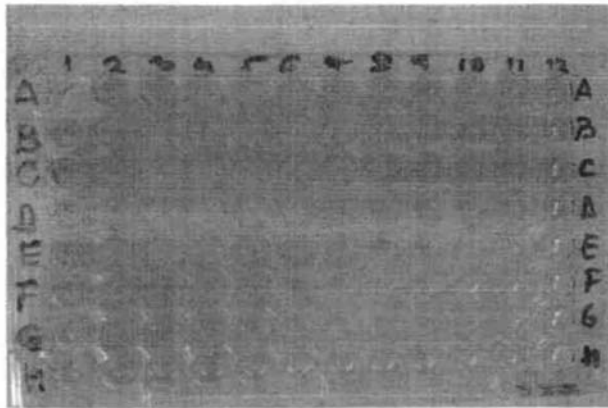
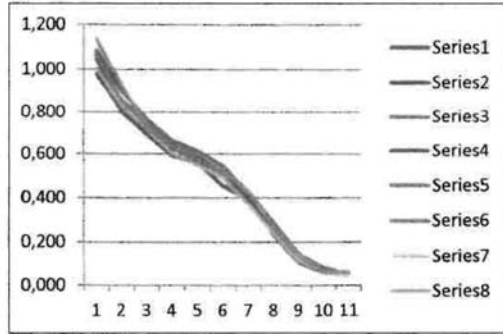


Fig. 2

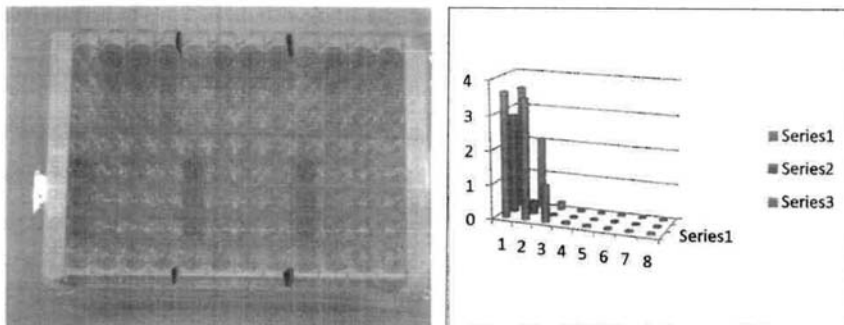


Fig. 3

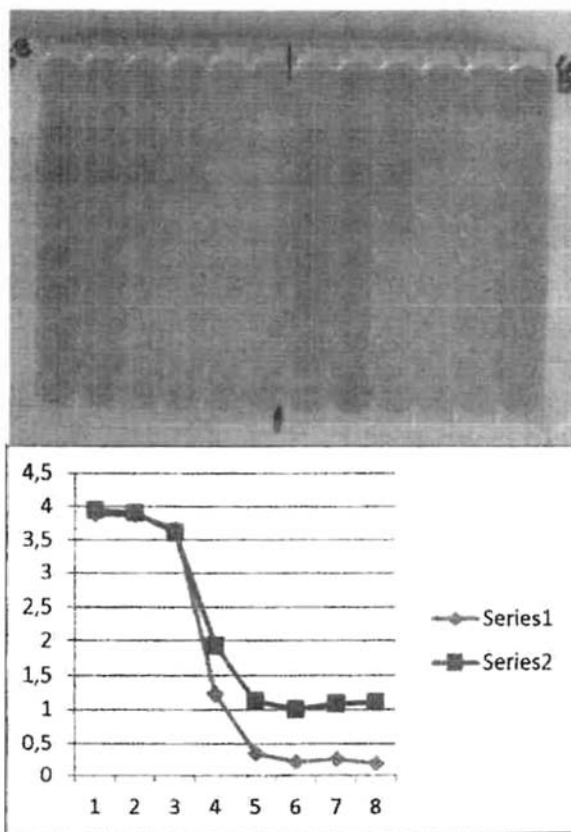


Fig. 4

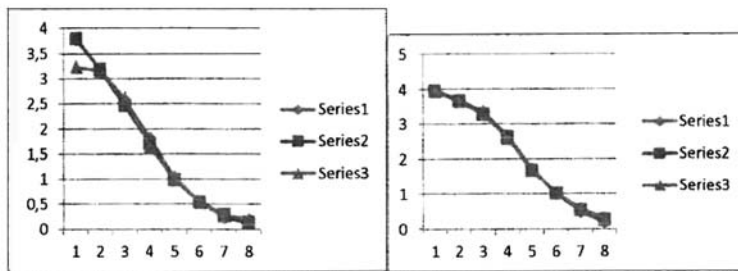
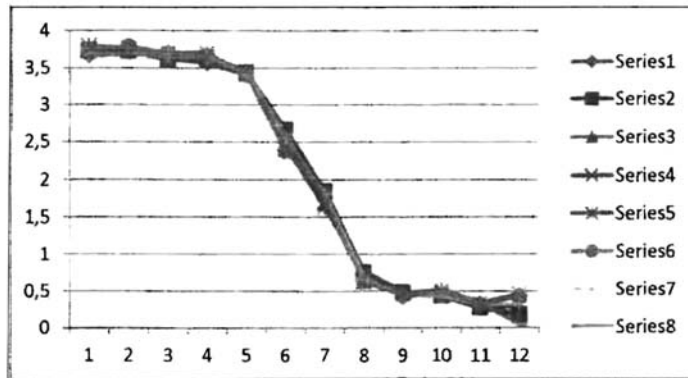
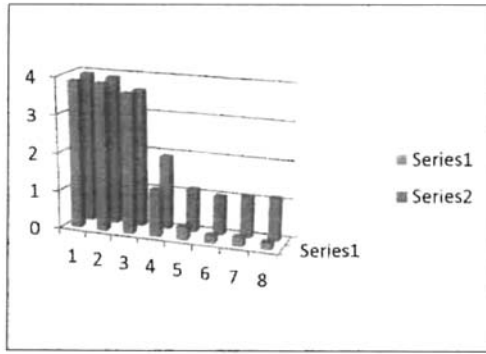


Fig. 5

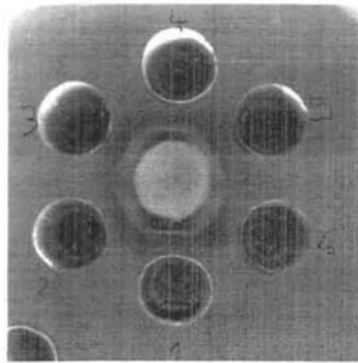


Fig. 6

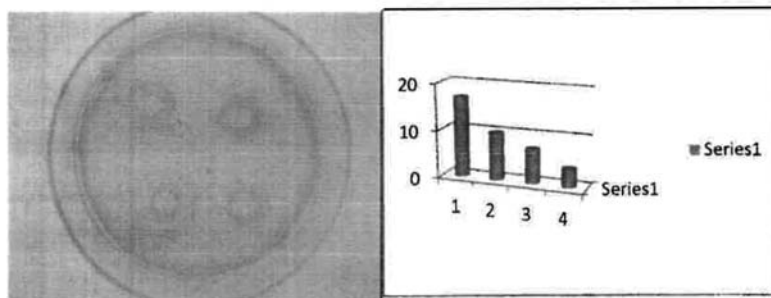


Fig. 7

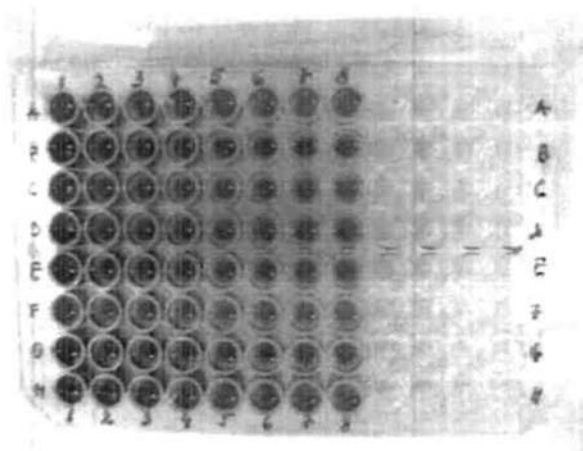
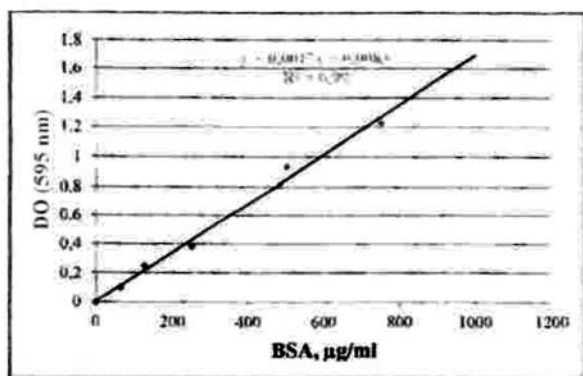
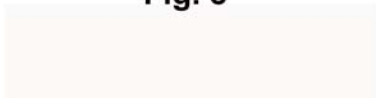


Fig. 8



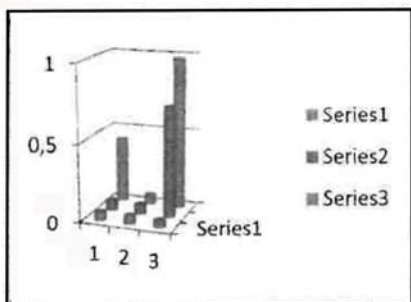
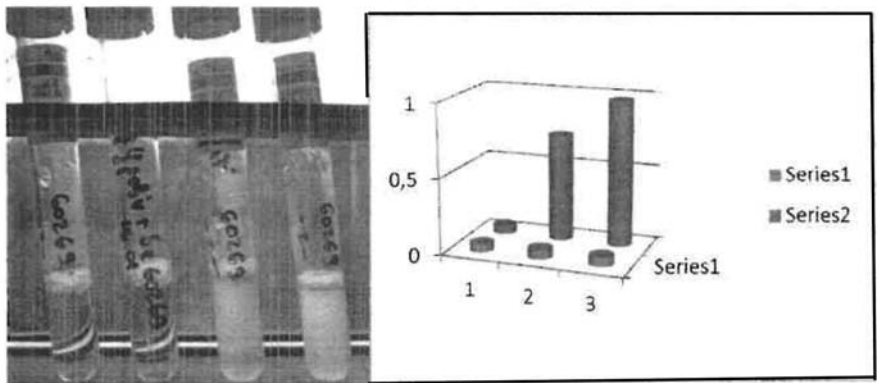


Fig. 9

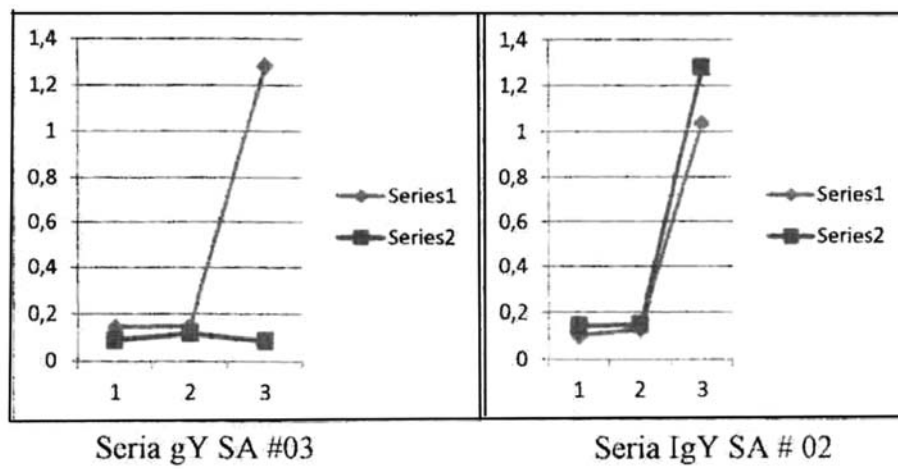


Fig. 10

