



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00156

(22) Data de depozit: 25.02.2014

(41) Data publicării cererii:
30.07.2014 BOPI nr. 7/2014

(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

(54) PROCEDU DE OBȚINERE ȘI UTILIZARE A
IMUNOGLOBULINELOR DE GĂINĂ (IgY)

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a imuno-
globulinelor de găină IgY. Procedeu conform invenției
constă în imunizarea găinilor ouătoare cu un antigen
preparat în prealabil, constând dintr-un amestec de
tulpini bacteriene rezistente la antibiotice, purificarea
parțială a IgY extras din galbenuș, la pH = 5, prin

congelare rapidă, timp de 60 min, la o temperatură de
-40°C, și decongelare rapidă la +20°C, urmată de
concentrarea IgY obținute prin filtrare tangențială.

Revendicări: 5



a 2014 - 00156
25.02.2014

117

DESCRIEREA INVENȚIEI

Titlul

PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI UTILIZAREA IMUNOGLOBULINELOR DE GĂINĂ (IgY)

DOMENIUL TEHNIC

Imunologie, medicina, anticorpi policlonali, tratamente preventive și curative prin imunizare pasivă.

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

STADIUL TEHNICII INCLUSIV BIBLIOGRAFIE

În 1893 Klemperer (1) a publicat că în ou sunt proteine care neutralizează virusuri. În 2004-2006 experți din toată lumea au discutat pentru prima dată oul ca produs farmaceutic (2). S-a discutat despre gălbenuș ca o sursă importantă de imunoglobuline care pot fi folosite în diagnostic, profilaxie și tratament la animale și om. Leslie și Clem în 1969 au demonstrat că IgY este diferit de IgG (2). IgY nu afectează activitatea medicamentelor în tractusul digestiv nici absorbția lor în circulația sângelui și nici activitatea lor în organism. IgY nu produce rezistența microorganismelor pentru care au fost create și nici remanența în organism.

Anticorpii folosiți în prezent pentru cercetare, diagnostic și tratament provin de la mamifere. Aceștia sunt anticorpi monoclonali sau policlonali. Tradițional pentru producerea de anticorpi policlonali sunt folosite animale dintre care calul, oaia, porcul, iepurele, cobaiul. Pentru

anticorpi monoclonali se folosesc animale ca iepurele și șoarecele. Ambele tehnologii au avantaje și dezavantaje (3, 6). Cea mai mare problemă a anticorpilor monoclonali este că multe antigene sunt slab sau nu sunt de loc imunogeni pentru șoarece. S-a constatat că prepararea anticorpilor proveniți de la mamifere necesită tehnologii sofisticate și de multe ori cu un randament scăzut. Tehnologia folosită la mamifere este stresantă atât pentru imunizare cât și pentru prelevarea de sânge ca probă de control și prelevarea de sânge pentru prepararea anticorpilor (3). În ultimii 25 de ani utilizarea găinilor în locul mamiferelor pentru producția de anticorpi a crescut. 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 decât cantitatea de anticorpi produși de către un mamifer de aceeași dimensiune (10). 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 prelatat de la iepure.

Anticorpii de la găina se folosesc cu succes în cercetare, diagnostic și tratamente cu scop profilactic sau curativ. Proteinele sunt mult mai imunogene la păsări decât la mamifere datorită distanței filogenetice dintre păsări și mamifere, iar producția de anticorpi este imediat stimulată la păsări (11). Folosirea găinilor pentru producerea de anticorpi permite reducerea drastică a numărului de animale. Stresul provocat mamiferelor este înlocuit cu recoltarea anticorpilor din ou. În plus, în ou este o cantitate mai mare de anticorpi decât în ser (12).

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

Tabelul #1: Compararea IgG de mamifere față de IgY de găină (Schade et al., 1991)(13)

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	1,400 mg	40, 000 mg
Cantitatea de anticorpi specifici per an	~5% 70 mg	2 ±10% 800 – 4,000 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

MS

IgY are o serie de avantaje printre care:

- 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).
- Complexele 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, cea 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.

În ou se găsesc imunoglobulinele IgA și IgM care ajung în albuș din oviduct, în timp 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).

Fragmentul Fc din IgY are cele mai hidrofobice molecule. Cantitatea de 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.

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



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 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.

Se poate constata uneori că IgY are o afinitate scăzută față de antigene. În acest caz 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 aceste situații se poate ca anticorpii să fie puternic multivalenți la pasăre când se compară cu iepurele, chiar dacă afinitatea este scăzută.

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

Diversitatea anticorpilor 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 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 și recunoașterea de semnal). Astfel că găinile pot produce frecvent anticorpi care vor recunoaște mai mulți epitopi decât anticorpii de mamifere.

S-au făcut eforturi să se purifice IgY din galbenusul ouălor. S-au folosit diferite materiale care să permită separarea proteinelor de biomoleculele insolubile în apă, majoritatea lipide și granule de gălbenuș, folosind Caragennan (14) sau polyethyl glycol (PEG) (15, 16) sau precipitarea prin congelare (17, 18).

Numeroase patente și studii se referă la izolarea întregii populații de anticorpi din gălbenuș inclusiv IgY (ΔFc) folosind diferite tehnologii de extracție a IgY, dintre care precipitare cu sulfat de amoniu, cu PEG, alcool. Există și posibilitatea de a separa faza aposă de componentele lipidice și granulele de galbenus prin congelare la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Există necesitatea de a extrage imunoglobulinele din galbenus printr-o metodă simplă și purificarea lor prin filtrări tangențiale cu scopul de a menține și a proteja structura și activitatea specifică a IgY. În plus există necesitatea preparării imunoglobulinelor specifice față de antigene preparate din celule inactivate rezistente la antibiotice din aceeași specie de



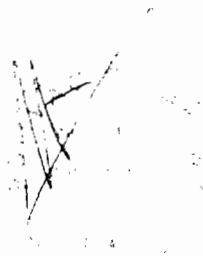
bacterie sau antigene preparate din bacterii provenite de la mai multe specii. Prepararea antigenelor s-a făcut prin amestecul celulelor bacteriene cu un adjuvant care conferă un grad mărit imunogenic care permite obținerea unui titru mare de IgY pentru o perioadă lungă de timp de la găinile imunizate.

Bibliografie

1. Klemperer, F. 1893. Ueber natürlich Immunität und ihre verwerthung für die Immunisirungstherapie. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 31:356-382.
2. G. A. Leslie and L.W. Clem "Phylogeny of immunoglobulin structure and function", Journal of Experimental Medicine, Vol. 130, No. 6:1337-1352, 1969
3. Mojca Narat. Production of Antibodies in Chickens. Food Technol. Biotechnol. 41 (2003) 259-267.
4. King:ori A.M. Uses of Poultry Eggs: Egg Albumen and Egg Yolk. Res. J. Poultry Sci. 5(2):9-13, 2012
5. Mine Y., Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious diseases: a review: J. Med. Food.2002; 5(3):159-169.
6. Michael et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. Indian Journal of Science and Technology Vol. 3 No. 4 (Apr. 2010).
7. Carlander D, Kollberg H, Wejåker PE, Larsson A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. Immunol Res. 2000; 21(1):1-6.
8. Larsson A, Carlander D. Oral immunotherapy with yolk antibodies to prevent infections in humans and animals. Ups J Med Sci. 2003; 108(2):129-40.
9. Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S, You J, Wang L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. Biotechnol Adv. 2011 Nov-Dec; 29(6):860-8.
10. Hau J and Hendriksen C (2005) Refinement of polyclonal antibody production by combining oral immunization of chickens with harvest of antibodies from the egg yolk. ILAR. 46, 294 – 299.
11. Bizanov G and Jonavskiene I (2003) Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgY. Bull. Vet. inst. Pulawy. 47, 403-410.
12. Larsson A, Balow RM, Lindahl TL and Forsberg PO (1993) Chicken antibodies: Taking advantage of evolution. A review. Poultry Sci. 72, 1807-1812.
13. Schade R., et al. Chicken Egg Yolk Antibodies. Production and Application" 2000, Springer-Verlag, Lab Manuals, ISBN 3-540-66679-6.
14. Hajime Hatta, Mujo Kim and Takehiko Yamamoto. A Novel Isolation Method for Hen Egg Yolk Antibody. "IgY" Agric. Biol Chem.. 54 (10), 2531-2535. 1990.
15. Polson A, von Wechmar MB, van Regenmortel MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol Commun 1980; 9: 475-93.



16. Polson Alfred. US Patent # 4,550,019. Manufacture and use of fowl egg antibodies. 01, 29, 1985.
17. Hoon H. Sunwoo, Eun N. Lee, Naiyana Gujral and Mavanur R. Suresh. Growth Inhibition of Escherichia coli 987P by Neutralizing IgY Antibodies The Open Immunology Journal 2010, 3, 1-8 11874-2262/10 2010.
18. Akita EM and Nakai S (1993) Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. J. Immunological Methods. 160, 207-214.
19. Aitken ID. The serological response of the chicken to a protein antigen in multiple emulsion oil adjuvant. Immunology 1973; 25(6):957-966.
20. Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G et al. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. Alternatives to laboratory animals 1996;(24):925-934.
21. Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. Journal of food science 1992; 57(32):629-63.
22. Polson A, Coetzer T, Kruger J, von ME, van der Merwe KJ. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. Immunol Invest 1985; 14(4):323-327.
23. Stalberg, J., and A. Larsson. 2001. Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. Ups. J. Med. Sci. 106:99-110.
24. Warr GW, Magor KE, Higgins DA (1995) IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunol Today 16: 392-398.
25. Hatta H, Kim M and Yamamoto T (1990) Novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". Agric. Biol. Chem. 54(10), 2531-2535
26. Diana Pauly, Pablo A. Chacana, [...], and Rüdiger Schade. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. Journal of Visualized Experiments: JoVE. J Vis Exp. 2011: (51):3084.
27. Oudin J. La diffusion d'un antigène dans une colonne de gel contenant les anticorps précipitants homologues: étude quantitative de trois principales variables. C. R. Acad. Sci. 228:1890-2, 1949. (Cited 115 times.)
28. Mancini G, Vaerman J P, Carbonara A O & Heremans J F. A single radial diffusion method for the immunological quantitation of proteins. (Peeters H, ed.) Protides of biological fluids. Amsterdam. The Netherlands: Elsevier. 1964.



Patente privind imunoglobulinele de pasăre (*Gallus domesticus*)

5976519	Yolk antibody-containing hair care product	Nojiri et al.
5814477	Recombinant clostridial toxin protein	Williams et al.
5728813	Antibodies directed against elk ligand	Lyman et al.
5601823	Avian antitoxins to clostridium difficile toxin A	Williams et al.
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.
5340923	Methods for making and purifying antivenoms	Carroll
4550019	Manufacture 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
20070151928	Purification of immunoglobulins	Grunnar Glad et al.
20100121035	Purification of immunoglobulins	Maloisel Jean-Luc
5420253	Method for purifying egg yolk immunoglobulins	Emery Daryll A. Straub D.

INVENȚIA PE SCURT

Formularea pe scurt a soluțiilor tehnice

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 specifice 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-PaChi (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".

Prezenta invenție este pentru a produce IgY 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 antibiotic de aceeași specie de bacterii sau un antigen preparat dintr-un amestec de tulpini de la mai multe specii de bacterii;
- (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) 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 fracțiunea care nu se dizolvă în apă și de granulele de gălbenuș;
- (e) trecerea fracțiunii solubilă în apă prin prefiltre și filtre de 0.45 μm și respectiv 0.22 μm ;
- (f) concentrarea IgY prin filtrare tangențială prin casete de 30 kDa.
- (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 convenabil. Acești anticorpi IgY sunt specifici pentru tulpinile bacteriene existente în mediul înconjurător în România, tulpini care frecvent sunt rezistente la antibiotice.



Anticorpul IgY se poate 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 anticopri specifici față de mai multe specii de bacterii patogene izolate de la om.

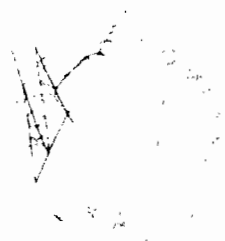
- (h) Încă un obiectiv al invenției este să se asigure o nouă imunoglobulină pentru testele de laborator folosind IgY-specific purificat. IgY-specific se folosește la evaluarea calitativă și cantitativă a sensibilității bacteriilor patogene izolate de la pacienții bolnavi în baza căror rezultate se stabilește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

DESCRIEREA SUMARĂ A PROCEDURILOR

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

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

- (a) Identificarea și măsurarea conținutului de proteină prin Coomassie Blue
- (b) IgY-specific identificat prin imunodifuziune în gel de agar față de IgY standard internațional (USA);
- (c) IgY-specific identificat prin testul de imunodifuziune radiară în gel de agar față de IgG anti IgY de iepure
- (d) IgY-specific identificat prin testul ELISA folosind IgG anti IgY de iepure
- (e) IgY-specific determinat cantitativ prin testul ELISA față de IgY standard internațional
- (f) IgY-specific identificat prin testul de inhibiție a multiplicării bacteriene (IMB-PaChi) folosind cultură de bacterii standard ATCC
- (g) IgY-specific identificat prin testul de inhibiție a multiplicării bacteriene (IMB-PaChi) folosind cultură de bacterii standard ATCC și evaluat prin determinarea spectrofotometrică a turbidității 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);



108

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

FLUXUL TEHNOLOGIC

Izolare, identificare și caracterizare germeni patogeni specifici - control



Preparare antigene - control



Imunizare găini - control



Extragere IgY - control



Condiționare IgY - control



IgY liquid
(concentrat
100%)

IgY uscat

Produce
ROMVAC

IgY uscat
(capete)

IgY în
suspensie

PROCEDURĂ

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 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).

1. Prepararea antigenului.

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 minute sunt liofilizate în flacoane de 10 ml, câte 4 ml 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 600 (OD_{600}) 1.00 și se amestecă cu 45 μ l de adjuvant QS21.

2. Imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF

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 PaChi. 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.

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.

În prezenta invenție se folosește ca adjuvant QS21. Se poate folosi și alte tipuri de adjuvanți dintre care adjuvant Freund complet sau adjuvant 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 tirtu mare pentru o perioadă lungă de timp. 12 luni cât a ținut experimentul, adjuvantul QS21 are un rol important în prepararea anticorpilor specifici.

3. Extragerea și purificarea parțială a anticorpilor

Procedura de extracție a fracțiunii solubile în apă la pH 5 prin care se recoltează majoritatea anticorpilor 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 $-22\text{ }^{\circ}\text{C}/-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ și decongelarea rapidă la $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

În prezenta invenție gălbenușul se separă de albuș, spalând 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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sau în soluție apoasă tamponată la pH 5 considerat un factor important în purificarea parțială a anticorpilor. Congelarea rapidă a amestecului de gălbenuș la $-22\text{ }^{\circ}\text{C}/-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ și decongelarea rapidă la $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 adauga în fracțiunea proteică recoltată Thimerosal 1:10000.

Supernatantul recoltat din amestec se filtrează prin prefiltre EKS2 și EKS1, după care este conservat la $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ în timp ce se fac determinări cantitative și calitative. Determinările cantitative se referă la conținutul proteic facut la substanța uscată după liofilizare, prin testul Bradford, imunodifuziune radiară, ELISA și IMB-specific PaChi. Determinarea calitativă se face prin testul de imunodifuziune în gel de agar, ELISA, imuno-electroforeză.

4. Purificarea, evaluarea și concentrarea anticorpilor.

După evaluările cantitative și calitative ale seriei de IgY preparat se face o filtrare tangentială pentru eliminarea particulelor de peste 200 kDa după care se trece printr-o altă 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.

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 PaChi.

IgY-specific obținut prin prezenta invenție nu reacționează cu sistemul complement și nici cu factorul reumatoid din serurile de mamifere. În aceste condiții invenția oferă un nou 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.

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

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 IMB-specific PaChi, în 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 și în bulionul folosit în testul IMB-specific PaChi. Toate testele menționate mai sus folosesc interacțiunea între anticorp/antigen.

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 sau agaroză.

- (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;
- (b) Se practică orificii cu diametru diferit (4-6mm) în gelul solidificat la distanțe de minimum 10 mm;
- (c) Se prepară diluțiile de antigen în soluție tampon fosfat (PBS) la pH 6-8;



- (d) Se repartizează 40 µl de antigen în fiecare godeu;
- (e) Se incubează placa în mediu umed la +37 °C timp de 24 de ore
- (f) Se constată difuziunea radiară și se măsoară, comparând-o cu diametrul probelor martor de control. Concentrația de antigen se calculează prin corelația lineară log10.

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 administrează per os pentru afecțiuni digestive, per os cu gargarisme pentru afecțiuni pulmonare sau cu alte localizări în organismul uman, intranasal pentru afecțiuni pulmonare, 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.

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

- (a) Se izolează bacteria patogenă care produce afecțiunea digestivă;
- (b) Se stabilește specificitatea și acțiunea inhibitorie asupra bacteriilor izolate de către IgY-specific folosind testul IMB-specific PaChi;
- (c) Se administrează oral doza prestabilită unică sau fracționată de minimum 200 mg de IgY sau 20 mg de IgY specific 4-6 zile consecutiv;
- (d) Tratamentul cu IgY-specific se poate face folosind și antibiotic a cărui activitate va fi potențializată de 5-10 ori;
- (e) Se urmărește evoluția clinică și prezența bacteriilor patogene în conținutul intestinal;
- (f) 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.
- (g) 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.
- (h) 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.

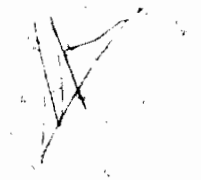


MODELE RECOMANDATE DE FOLOSIRE A INVENȚIEI

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

Exemplul 1

- (a) Fiecare tulpină bacteriană va fi însoțită de certificatul de calitate emis de o instituție autorizată;
- (b) Fiecare tulpină va fi conservată la $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 4000 rpm la $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- (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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- (e) Peleta rezultată la pct.(c). se resuspendă la volumul initial în 0,4% formol în PBS și se incubează peste noapte la $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Formolul se elimină prin centrifugare 15 minute la 4000 rpm la $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bacteriile inactivate se resuspendă în PBS și se liofilizează. După liofilizare flacoanele se conservă la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- (f) Antigenul se prepară folosind 500 μg de celule/ml inactivate sau 3-4,5 μg de proteină/ml care se reconstituie în 0,5 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;
- (g) Antigenul este un amestec de tulpini din cadrul aceleiași specii de bacterii sau un amestec de tulpini bacteriene;
- (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 confecționată cu furajare și adăpare automată. Fiecare găină este individualizată prin matriculare la ambele aripi;
- (i) Găinile sunt imunizate intramuscular, în patru puncte diferite cu 2 ml din antigenul dat preparat ca la pct1. (f);
- (j) După prima administrare găinile primesc alte două administrări din același antigen, pe aceeași cale de administrare la interval de 14 zile;
- (k) La cea de-a doua și respectiv a treia administrare se prelevă sânge pentru controlul răspunsului imun față de antigenul dat;



- (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 la +4°C sau la -20 °C.
- (m) Pentru evaluarea răspunsului imun se folosesc testul ELISA calitativ și cantitativ, testul de imunodifuziune în gel de agar (SPGA), testul de imunodifuziune radiară simplă și testul IMB-specific PaChi. Activitatea anticorpilor extrași din gălbenușul de ou se apreciază folosind fiecare test în parte. Răspunsul imun se verifică prin:
- 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.
 - 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.
 - Testul ELISA calitativ
 - Testul ELISA cantitativ
 - Testul de proteină BRADFORD
 - Testul IMB-specific PaChi
- (n) Se admit în producția de IgY găinile care au răspuns pozitiv la administrarea antigenului dat.
- (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.

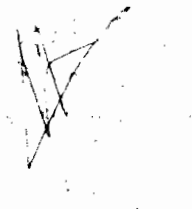
Exemplul 2

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 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.
- (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 de seroprecipitare în gel de agar (SPGA) Outcherlony.
- testul SPGA în care se folosesc diluții binare de IgY testate față de antigenul dat:
- testul ELISA calitativ;
- testul ELISA cantitativ;
- testul Bradford pentru determinarea proteinei totale;
- testul IMB-specific PaChi



Exemplul 3

Condiționarea IgY

După stabilirea activității de inhibare specifică a multiplicării bacteriilor și conținutul în proteină și respectiv IgY-specific, IgY se condiționează prin:

- (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:
- (b) Concentrarea IgY se efectuează prin filtrarea tangențială eliminând excesul de PBS;
- (c) În soluția de IgY se adaugă Gentamicină sulfat 50 µg/ml;
- (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;
- (e) Concentrația optimă de IgY se stabilește în funcție de utilizarea acesteia:
 - 200 mg de IgY în 80 ml de soluție pentru spălături bucale și gargară și/sau administrare orală;
 - 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;
 - 25 mg de IgY în 2 ml de soluție salină (PBS) pentru administrare orală la copii;
 - 100 mg IgY în 2 ml de soluție salină (PBS) pentru administrare intranasală;
- (f) IgY preparat conform pct. 3(c) se liofilizează 30 ml de soluție IgY în flacoane de 100 ml sau 2000 ml în tăvi de inox.
- (g) IgY preparat conform pct. 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.
- (h) IgY preparat conform pct. 3(f) se amestecă în raport de 20 mg de IgY per gram de gel sau vaselina pentru administrări cutanate;
- (i) IgY preparat conform pct. 3(f) se amestecă în raport de 20 mg de IgY per ml în soluție salină (PBS) pentru utilizarea în setul IMB-specific PaChi.
- (j) IgY preparat conform pct. 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;

IgY preparat conform pct. 3(d) și (f) se divizează aseptice în flacoane, fiole sau tuburi corespunzătoare dozajului sau căilor de administrare.



Exemplul 4

Control final al IgY

- (a) Pentru forma finală a IgY în soluție pentru administrări parenterale, intranazale, orală se folosesc metodele de control:
- Sterilitate microbiologică;
 - Stabilirea activității specifice a IgY folosind testul ELISA și SPGA;
 - Stabilirea conținutului de IgY folosind testul ELISA;
 - Stabilirea activității de inhibare a multiplicării bacteriene folosind testul IMB-specific PaChi.
- (b) Pentru forma finală a IgY în gel sau unguent se efectuează controalele de la pct. 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 efectuate conform pct.4(a) și pct. 4(b).



98

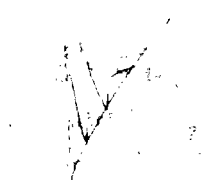
Exemplul 5

(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 reproductibilității 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 μ l IgG iepure anti IgY la concentrația de 3,75 μ g/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 μ l PBS-Tween folosind o mașină automată de spălat microplăci.
- (e) În fiecare godeu se adaugă 200 μ l 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 μ l IgY specific sau IgY SPF (25, 12,5, 6,25 μ g/ml) în PBS;
- (h) În paralel se adaugă în triplicat câte 150 μ l IgY standard SIGMA (25, 12,5, 6,25 μ g/ml);
- (i) Plăcile sunt incubate la +37 °C pentru 90 de minute;
- (j) Plăcile se spală de patru ori cu PBS-Tween;
- (k) Se adaugă 150 μ l IgG anti IgY conjugat cu peroxidază la diluția 1:5000;
- (l) Se adaugă 150 μ l TMB și se incubează 5-15 minute la temperatura camerei, la întuneric
- (m) Se blochează reacția cu 150 μ l 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 căptușește 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;
- (g) Se adaugă 100 μl TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min;
- (h) Se adaugă 100 μl soluție de stopare;
- (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 validează.
- (k) Se consideră ca reacție pozitivă pentru prezența IgY, diluția la care DO_{450} este de 0.200 sau mai mare.
- (l) În cazul când placa de reacție se validează se compară reacțiile pozitive de la IgY-testat față de IgY standard internațional.
- (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.



Exemplul 6

Determinarea conținutului de IgY specific prin testul ELISA

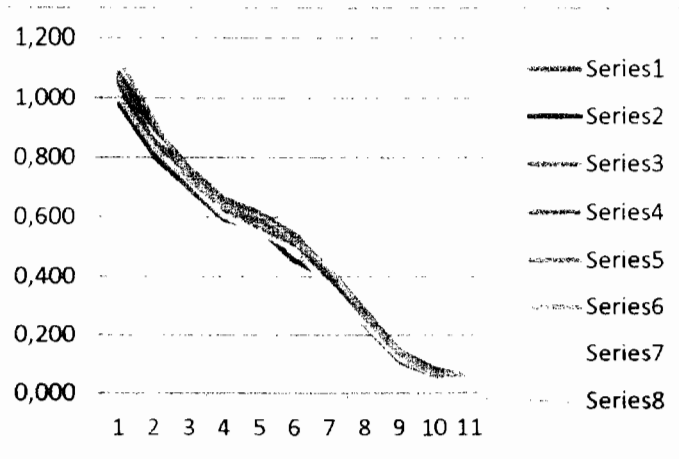
Activitatea specifică IgY se determină cantitativ față de antigenul reprezentat de celulele întregi bacteriene inactivate și liofilizate conf. pct. (1). Placa de reacție se căptușește cu antigen, iar IgY-specific se testează în triplicate, în diluții succesive binare de la diluția 1:1000, în triplicat. 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 5-10 ng de IgY-specific per godeu, per 150 μ l.

- (a) Se căptușește o placă ELISA cu 150 μ l din suspensia de bacterii liofilizate la 1,67 -1,70 μ g de celule per ml sau 10 μ g de proteină bacteriană per ml în tampon carbonat-bicarbonat (0,05 M, pH 9.6):
- (b) Placa captușită se pastrează 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 μ 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 μ l 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;
- (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 μ l 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 μ l TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min.
- (o) Se adaugă 100 μ l soluție de stopare;
- (p) Se citește reacția la un spectrofotometru la absorbanța 450 nm.
- (q) Se validează reacția când 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

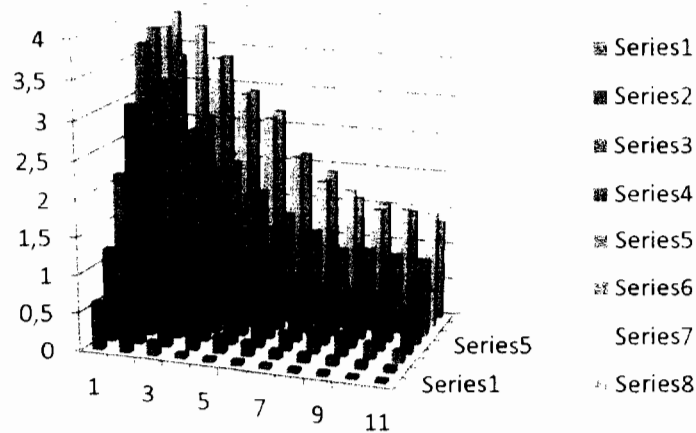


Handwritten signature

valori de 0,060-0,090 OD, iar în godeurile martor pozitiv E1, F1, G1 sunt valori de 1,400-1,800 OD.

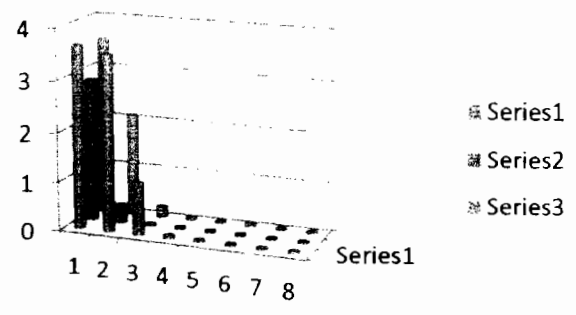
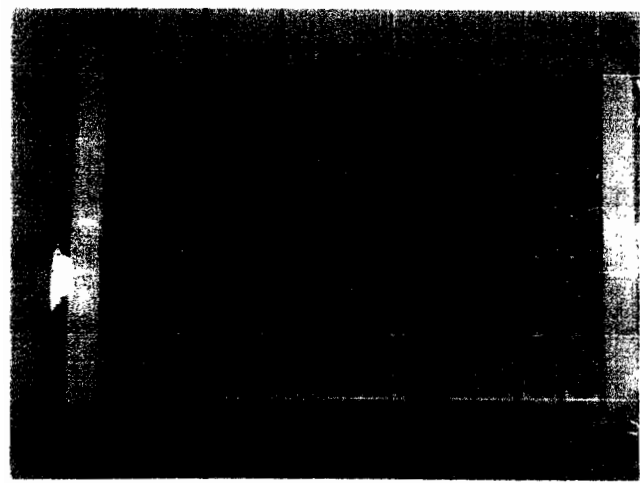


Reproductibilitatea reacției enzimatică în testul ELISA pentru identificare IgY folosind IgG de iepure anti IgY.



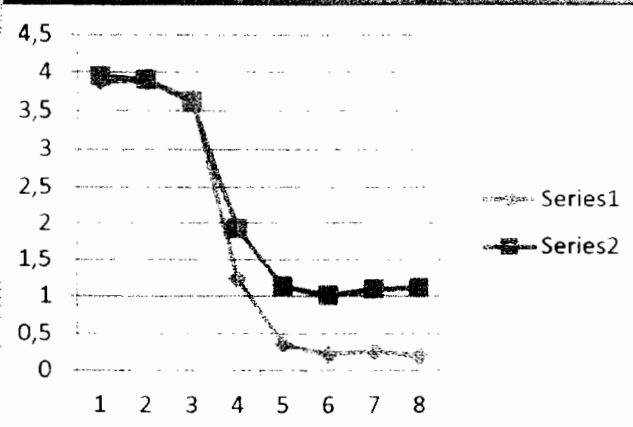
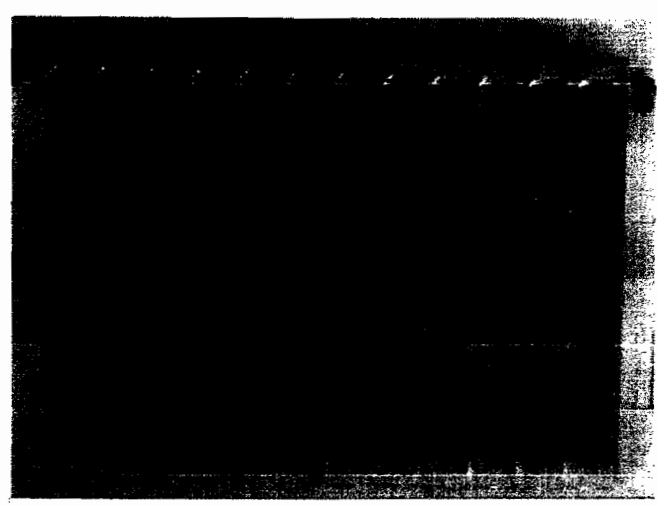
Handwritten signature

Testare IgY standard Romvac, în diluții successive față de IgG de iepure anti IgY.



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

Experiment 6.2. ELISA *Salmonella enteritidis* / *Salmonella typhimurium*



IgY specific seria #004 liofilizat.

IgY se reconstituie în apa deionizată și se prepară diluții zecimale

Placă de reacție se căptușește cu IgY.

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} .

În acest experiment se poate demonstra reproductibilitatea reacției imune a IgY folosind testul ELISA.

ELISA EC și KP 006-08/11/2013

Martori:

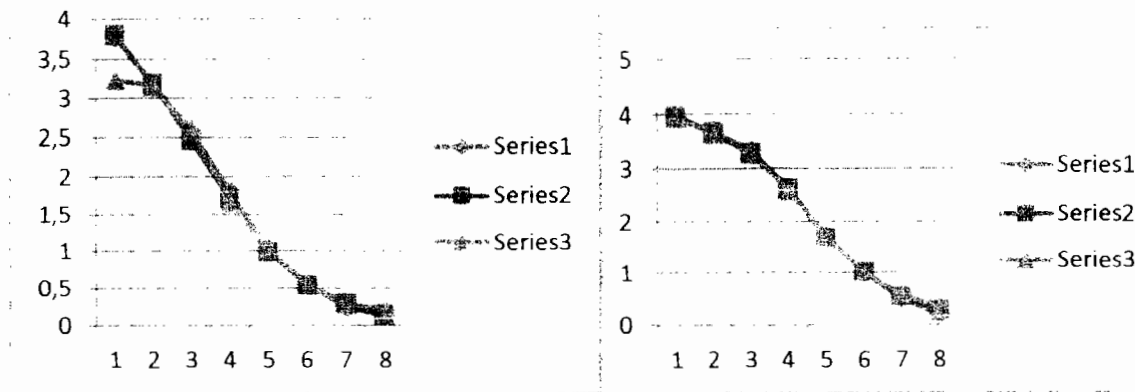
Blank A1 și A7

Ser negativ IgY: H # 1 și 2, H# 7 și 8

Titrare în diluții zecimale coloanele # 1,2,3 (EC) și # 7,8,9, (KP)

Titrare în diluții binare coloanele #1, 2, 3 (EC) și 10, 11, 12 (KP)

Titru pt. E.coli: 1:64.000 și *K. pneumoniae*: 1:32.000



Grafic # 2. Diluții binare. Titru ELISA 1:32.000 Grafic # 1. Diluții binare. Titru ELISA 1:64.000

Exemplul 7

Determinarea IgY prin SPGA

Testul de imunodifuziune în gel de agar Oucarlony pentru evidențierea IgY nespecific

Principiu:

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 care se vizualizează sub forma unei linii de precipitare.

Prepararea gelului de agar:

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%).

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 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).

Pregătirea plăcilor pentru reacție:

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 minute deoarece lichidul existent în godeuri poate să dilueze reagenții, acesta fiind obligatoriu aspirat înainte de umplerea godeurilor cu reagenți.

Repartizarea reagenților și incubarea plăcilor de agar:

- 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.

- 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.

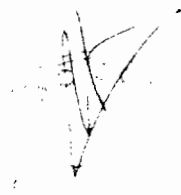
În reacție se folosesc martori IgY-SPF sau IgY de referință Romvac, al căror conținut este cunoscut și IgY-standard internațional (USA).

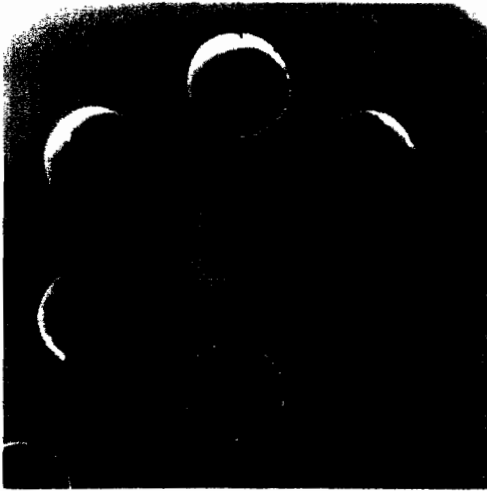
Citirea și interpretarea rezultatelor:

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:

- *Reacții pozitive:* liniile de precipitare date de IgY Etalon se unesc cu liniile de precipitare date de IgY de testat.
- *Reacții negative:* liniile de precipitare date de IgY Etalon ating godeul cu proba de testat fără a se îndoii. IgY de testat nu prezintă linie de precipitare.
- IgY testat în diluții prezintă reacție intensă de precipitare, în funcție de titrul său, la una din diluțiile efectuate (de ex la 1:32 = titrul optim). Se poate stabili titrul minim la IgY la ultima diluție care mai prezintă linie de precipitare (de ex. 1:2048).
- *Reacții nespecifice:* linii de precipitare care nu se continuă cu liniile date de IgY Etalon, ci se întretaie cu aceste linii.

Rezultatele obținute în ID sunt coroborate cu valorile testelor ELISA, Bredford și IMB-specific PaChiu.





Goodeul central: IgY de iepure anti IgY

Godeul nr 1 IgY standard (USA), o singură linie de precipitare

Godeurile 2 și 3 IgY-specifice anti *S. enteritidis* și *S. typhimurium*

Godeul nr 4 IgY-specific anti *E. coli*

Godeul nr 5: IgY specific anti *Bacillus anthracis*

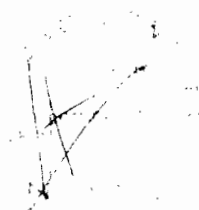
Godeul nr. 6 IgY-specific anti *Klebsiella pneumoniae*

Exemplul 8

Determinarea conținutului de IgY folosind testul de imunodifuziune radiară simplă Mancini.

Imunodifuziunea radiară simplă (IDRS) a fost acceptată ca un mijloc sigur de determinare 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:

- (a) prepararea amestecului de agaroză 1% în PBS conținând azidă de sodiu 0,05%;
- (b) se încălzește agaroză la 80–90 °C;
 - (b1) se include în agaroză 0,33 ml IgG anti IgY per gram de agaroză;
- (c) se răcește agaroză 45–50 °C și amestecul cu IgG anti IgY 0,33 ml/ml de agaroză;
- (d) se păstrează la 45–50 °C un mililitru de agaroză;
- (e) se toarnă agaroză în placa de unică folosință 4ml/6 cm diametru;
- (f) se răcește placa la temperatura camerei;
- (g) se perforază godeuri cu diametrul de 6 mm la distanțe de minim 20 mm;
- (h) se repartizează 0.30 ml de agar cald în fiecare godeu;
- (i) se răcește placa cu agar la temperatura camerei;
- (j) se repartizează 30 μl de IgY brut și în diluții successive 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 în PBS în godeurile practicate în geloză;
- (k) se păstrează plăcile de reacție la temperatura camerei, în mediu umed și citirea reacției la 24, 48 și 72 de ore;
- (l) colorarea agarului cu Coomassie Blue:
 - se fixează geloză cu metanol cu 10% acid acetic pentru 30 de minute 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 de minute;
 - se repeta decolorarea;
 - se înmoaie gelul 15 minute în 1-2% glicerol în apă deionizată;
 - gelul este gata de fotografiat.



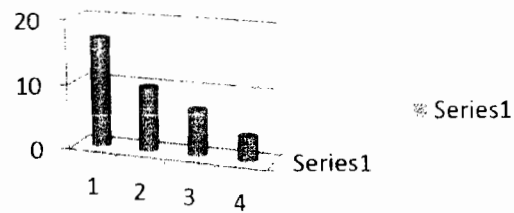
- concomitant se măsoară diametrul fiecărui cerc de precipitare;
- calcularea echivalentului în miligrame de proteină (IgY) per ml de soluție se face: diametrul cercului de reacție minus diametrul godeului, împățit la doi (grosimea din ambele părți) și înmulțit cu 3,3 coeficient de corecție pt. cantitatea 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

- ANTIGEN: Supernatant IgY (S2C1 din 11.06.2012)
- SER POZITIV: ser iepure anti IgY (01.10.2012)

Rezultate

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



[Handwritten signature]

Exemplul 9

Determinarea conținutului de proteine folosind testul Bradford

Testul Bradford se folosește pentru determinarea conținutului proteic în diverse produse biologice printre care și suspensii de IgY.

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. Legarea colorantului de proteină este un proces foarte rapid (aproximativ 2 min), iar complexul proteină-colorant rămâne dispersat în soluție pentru aproximativ 1 oră. Testul se efectuează la pH acid, maximul de absorbție înregistrându-se la aprox. 595 nm. 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).

(a) Reactivi:

- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich)
- Acid orto-fosforic 85% (Merck)
- Alcool etilic 95% (Chimopar)
- Albumină serică bovină (Sigma)
- IgY standard (Sigma)

(b) Aparatură și materiale:

- Cititor de plăci ELISA
- Plăci ELISA

(c) Prepararea reactivului Bradford

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. Reactivul Bradford de lucru se prepară diluând soluția stoc cu apă distilată în raport 1:5. Acesta se poate păstra la +4 °C și este stabil timp de cel mult 7 zile.

(d) *Prepararea soluțiilor standard de proteină*

- 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 pct. (d).
- 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.

(e) *Prepararea soluției test*

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.

- (f) Pe placa ELISA se repartizează 25 μl probă sau standard în godeuri separate, în replicare.
- (g) Se adaugă 300 μl reactiv Bradford – soluție de lucru și se agită ușor 30 secunde. Se evită spumarea, care produce erori la citirea absorbantei. Se incubează 10 minute la temperatura camerei, la întuneric.
- (h) Se măsoară absorbanta la 595 nm față de martor (tampon); se citește în decurs de 60 min.
- (i) Testarea curbei de calibrare. Pentru trasarea curbei etalon se prepara șapte soluții de lucru cu concentrații de: 62.5; 125; 250; 500; 750; 1000; 1500 μg BSA sau IgY/ml. Fiecare 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 este prezentată în fig. 1., precum și în imaginea din foto 1. Ecuația dreptei de regresie obținută pentru curba etalon este $y = 1,0017x + 0,0083$.
- (j) *Validarea metodei.* Testarea standardului în quadruplicat trebuie să conducă la rezultate reproductibile. Sensibilitatea testului este apreciată ca fiind corespunzător în condițiile în care un conținut de 62.5 μg proteină/ml în probă dă un semnal de 0,095 unități de absorbantă.



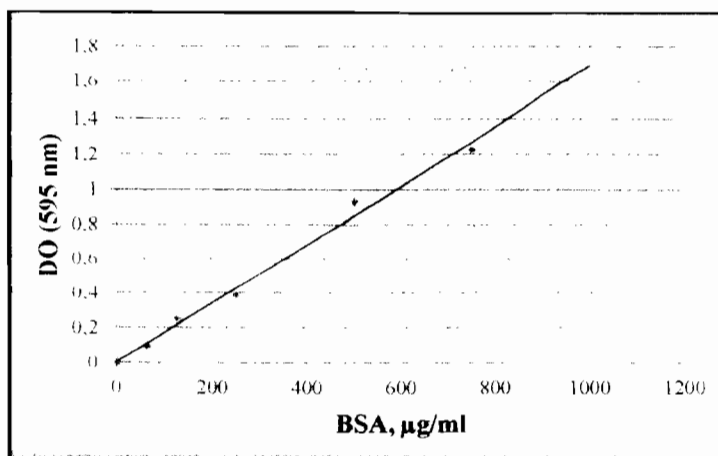


Fig.1. Curba de calibrare

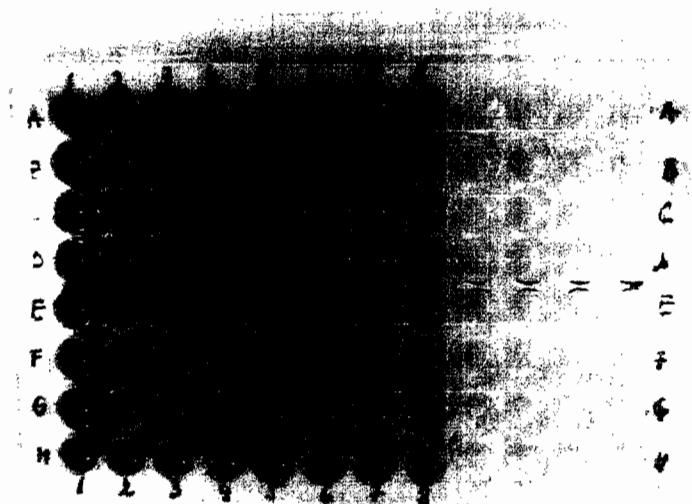


Foto 1. Imagine placă – curba de calibrare

1 - maritor reactivi; 2 - 62,5 µg/mL BSA; 3 - 125 µg/mL BSA;

4 - 250 µg/mL BSA; 5 - 500 µg/mL BSA; 6 - 750 µg/mL BSA;

7 - 1000 µg/mL BSA; 8 - 1500 µg/mL BSA

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



Exemplul 10

Determinarea inhibiției multiplicării bacteriene folosind testul IMB-specific PaChi

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

(2) Conținutul trusei IMB PaChi.

- (a) mediul de cultură pentru multiplicarea bacteriilor pentru testare.
- (b) mediul de cultură cu IgY SPF martor negativ
- (c) mediul de cultură cu IgY-specific pentru tulpina bacteriană de testat

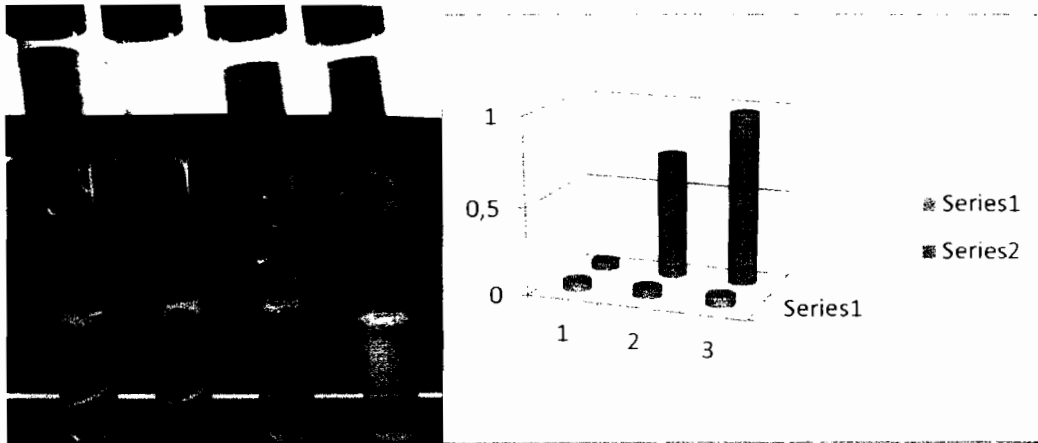
(3) Protocolul de lucru.

- (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 testat. Cultura se incubează la 37 °C pentru 4, 6 sau 24 ore.
- (b) din suspensia bacteriană preluată de la termostat după 4, 6 sau 24 de ore 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 0,05 OD600.
- (c) din tubul de diluție se repartizează steril câte 2 ml de suspensie bacteriană în fiecare din cele 2 tuburi rămase în trusă. Probele se incubează la 37 °C cu agitare permanentă. Citirea rezultatelor se poate face la 4 și 8 ore de incubație. Citirea finală se face la 24 ore 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 ore de incubație la 37°C. Citirea finală se face după 24 de ore de incubație la 37 °C. Efectul inhibitor specific al IgY se poate vedea cu ochiul liber când în proba cu IgY mediul de cultură

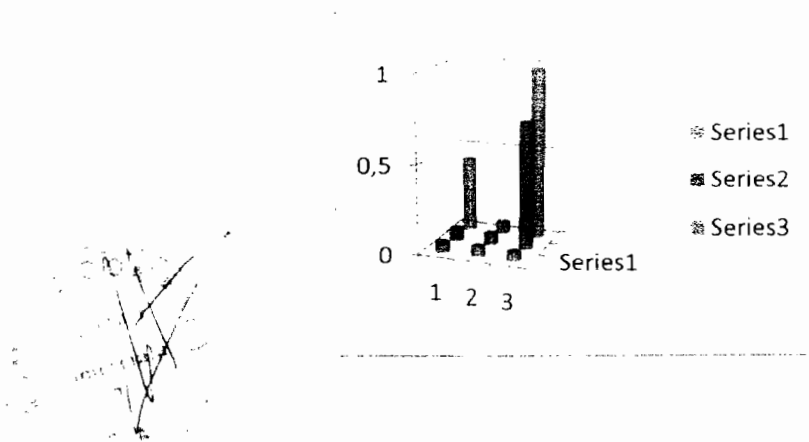


ramâne transparentă, iar în proba martor pozitiv mediul are o turbiditate din ce în ce mai mare la 4, 8 și respectiv 24 de ore.

- (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 spectrofotometru 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 de ore de incubație la 37 °C este blocata 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.

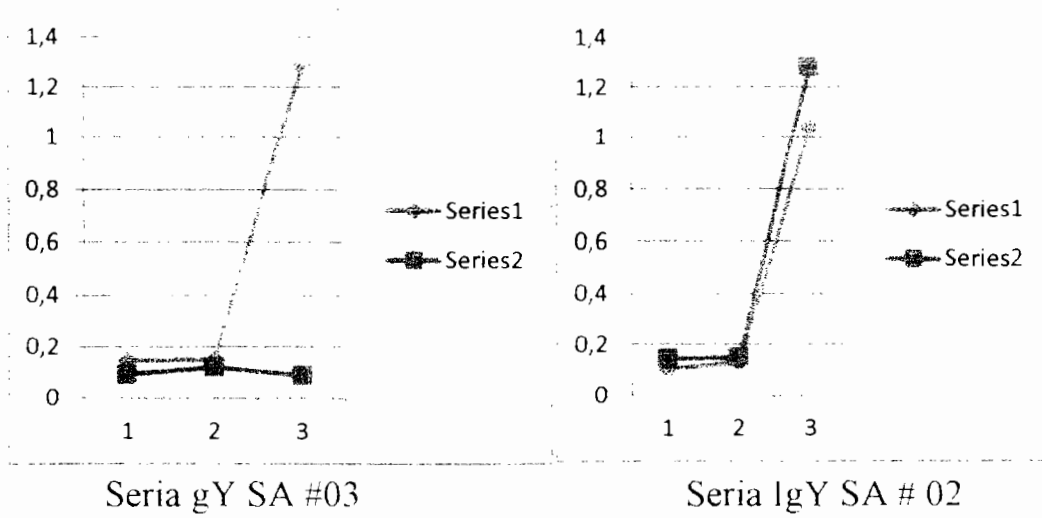


Coloanele albastre sunt IgY-specific polyvalent la zero ore (#1) la 4 ore (#2) și respectiv la 24 de ore (#3). Coloanele roșii reprezintă creșterea bacteriilor în mediul de cultura martor cu IgY-SPF la zero ore (#1), la 4 și respectiv la 24 de ore (#2 și #3).



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 ore. 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 PaChi *Staphylococcus aureus*, tulpini rezistente la antibiotice



Proba/ Timp	Martor pozitiv	Martor negativ	IgY SA Platon Romyac	IgY SA seria 02	IgY SA seria 03	IgY SA seria 04	IgY SA seria 05
0 ore	0.102	0.145	0.085	0.125	0.091	0.092	0.089
4 ore	0.130	0.150	0.085	0.125	0.120	0.092	0.088
24 ore	1.037	1.283	0.512	0.530	0.088	0.093	0.089

Linia albastra este graficul creșterii la 24 de ore 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).

REVENDICĂRI

Titlul

PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI UTILIZAREA IMUNOGLOBULINELOR DE GĂINĂ (IgY)

1. Metoda de preparare IgY, metodă care se caracterizează prin aceea că se obține un amestec de imunoglobuline specifice (IgY) prin imunizarea găinilor ouătoare cu un antigen format dintr-un amestec de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice din cadrul aceleiași specii de bacterii sau un antigen format dintr-un amestec de specii de bacterii rezistente la antibiotice izolate de la pacienți din România, extras din gălbenușul găinilor imunizate cu numitul antigen în apă deionizată, la pH 5, prin congelare rapidă 60 de minute la -40 °C și decongelare rapidă la +20 °C și purificat prin filtrare tangențială prin casete de 200 kDa și casete de 30 kDa.
2. Revendicarea metodei de la punctul 1, se caracterizează prin aceea că antigenul este un amestec de tulpini bacteriene rezistente la antibiotic din cadrul aceleiași specii.
3. Revendicarea metodei de la punctul 1, se caracterizează prin aceea 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 aceea că antigenul conține un amestec de bacterii inactivate în amestec cu un adjuvant QS21 care este suportat foarte bine de găinile inoculate intramuscular.
5. Revendicarea metodei de la punctul 1, care caracterizează prin aceea că antigenul conține un amestec de bacterii inactivate în amestec cu un adjuvant QS21 care conferă un stimul antigenic foarte bun în organismul găinilor imunizate obținându-se un titru al IgY mare.