



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00179

(22) Data de depozit: 05.03.2014

(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) **METODĂ DE EVALUARE IMUNOBIOLOGICĂ A ACTIVITĂȚII  
SPECIFICE A IMUNOGLOBULINELOR DE PASĂRE (IgY)**

(57) Rezumat:

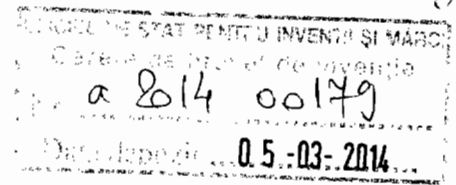
Invenția se referă la o metodă de evaluare imunologică a activității imunoglobulinelor de pasăre IgY. Metoda conform invenției constă în folosirea unui set de evaluare standard, conform protocolului de lucru, pentru evidențierea capacității de inhibare a multiplicării

bacteriene *in vitro* de către IgY specific antigenului, rezultatele fiind vizualizate spectrofotometric.

Revendicări: 13

Figuri: 11



**DESCRIEREA INVENȚIEI****Titlul****METODĂ DE EVALUARE IMUNOBIOLOGICĂ A  
ACTIVITĂȚII SPECIFICE A IMUNOGLOBULINELOR DE  
PASĂRE (IgY)****DOMENIUL TEHNIC**

Invenția de față se referă la o metodă imunologică de testare a capacității de inhibare a multiplicării bacteriilor de către imunoglobulinele de pasăre (IgY) față de antigenul dat.

Invenția se referă la metoda imunologică de testare a capacității de inhibare a multiplicării bacteriilor rezistente parțial sau total la antibiotic.

Invenția se referă la un procedeu de evaluare calitativă și cantitativă a activității imunoglobulinelor IgY specifice antigenului dat

Invenția de față se referă la o metodă de evaluare imunologica *in vitro* a capacității de inhibare specifică a multiplicării bacteriilor de către imunoglobulinele specifice extrase din gălbenușul de ou de la păsări imunizate în prealabil cu antigenul dat. Determinarea diferenței turbidimetrice, automatizat sau prin examen cu ochiul liber, între proba martor și proba de testat se datorează creșterii bacteriilor în mediul de cultură cu IgY-SPF fără anticopri specifice antigenului dat. În probele cu anticorpi specifici, datorită inhibării multiplicării bacteriilor, mediul de cultură se păstrează clar sau are o turbiditate redusă cu minimum 0,200 OD<sub>600</sub>.

Metoda se referă la un set de evaluare IMB-specific PaChi cu ajutorul căruia se poate evidenția activitatea specifică a imunoglobulinelor de pasăre (IgY) asupra antigenului dat.

JK

## DESCRIEREA CUNOȘTIȚELOR ACTUALE ÎN DOMENIU INCLUSIV BIBLIOGRAFIE

Fracțiunile globulinelor serice ale diferitelor tipuri de anticorpi ca IgA, IgM, IgG, pot fi întrebuințate contra antigenelor corespunzătoare, neutralizând specific efectul acestora. Prin antigene se înțeleg antigenele carcinogene, bacteriene, virale și factori bioregulatori de origine vegetală sau animală ca și toxinele sau otrăvurile

După expunerea la un antigen străin, sistemul imun al unui animal va neutraliza efectele bioregulatorie și/sau efectele nocive ale antigenului. Expunerea sistemului imun la antigene se poate face fie spontan, fie prin administrarea intenționată a acestora. Când un animal este vaccinat cu o substanță antigenică rezultă un răspuns imun prin producerea de anticorpi. Acest proces se referă la imunizarea activă a gazdei expusă la antigen. Anticorpii produși în urma unui proces de imunizare activă sunt anticopri homologi la specia de animal dată.

Anticorpii produși de o specie pot fi folosiți la neutralizarea efectelor antigenului corespndent la o altă specie. Aceasta se numește imunizare pasivă. Imunizarea pasivă se constată când un individ dintr-o specie primește o protecție imună de anticorpi produși într-un animal de la o altă specie. Acest proces necesită transferul de anticorpi de la un donator la un recipient. Dacă donatorul și recipientul sunt din aceeași specie atunci anticorpii sunt homologi. Dacă donoatorul și recipientul sunt de la diferite specii, anticoprii sunt numiti heterologi.

Imunizarea pasivă este o metodă eficientă de prevenire și tratament a bolilor. Imunizarea pasivă a omului cu anticorpi heterologi nu e sigura deoarece anticorpii de origine ne-umană sunt străini pentru sistemul imun uman. Expunerea receptorilor sistemului imun la anticorpii de la un donator străin produc reacție anti-imună în receptori contra anticorpilor străini. Răspunsul imun produce boala serului care poate duce la șoc anafilactic și moarte. În contrast cu beneficiile utilizării anticorpilor heterologi, aceste metode de tratament nu sunt folosite din considerente de siguranță.

Este cunoscut faptul că pasarile domestic cum ar fi găinile, curcile și rațele produc anticorpi în sânge și ouă anti factori care produc boli la păsari tot așa de bine ca și anti antigene.

În 1893 Klemperer a descoperit că în ou sunt proteine care neutralizează virusuri.

LeBacq-Verheyden, et al.(9) au analizat cantitativ imunoglobulinele de pasăre Polson, A., et al. (14) au imunizat găini față de numeroase proteine și amestecuri naturale de proteine și au

detectat anticorpi IgY în galbenuşul ouălor Fertel. R., et al., (12) au imunizat găini contra prostaglandinelor și au decelat anticorpii în galbenuş. Jencenius, et al.(13) prezintă o metoda de izolare a IgG (IgY) pentru a fi folosit în imunodiagnsotic. Polson, A., et al. (14) descrie anticorpi izolați din galbenuşul găinilor care au fost imunizate cu o variatate de virusuri de la plante.

În toate aceste referințe sunt relatări doar despre imunoglobulinele de la păsări față de diferite anitigene, nu față de toate antigenele care produc boli la mamifere.

Polson (14) sau Jencenius (13) sugerează să se folosească anticorpii de la găini în loc de anticorpii de la mamifere ca instrument în metodologia de diagnostic. Polson (14) sugerează că este posibil să se protejeze puii de găina nou născuți prin imunizare pasivă contra bolilor față de care mamele lor nu au fost expuse Protecția se poate face prin injectarea puilor cu IgY derivat de la găini care au fost imunizate contra acestor boli.

Jencenius (13) precizează că ouăle de la păsări imunizate pot fi utile pentru tratamentul unor afecțiuni digestive, dacă se poate rezolva problema degradării IgY de către enzimele proteolitice din intestin.

**Bibliografie:**

1. Larsson A, Carlander D (2003) Ups J Med Sci 108: 129
2. Kovacs-Nolan J, Phillips M, Mine Y (2005) J Agric Food Chem 53: 8421–8431.
3. Carlander D, Kollberg H, Wejaker PE, Larsson A (2000). Immunol Res 21: 1–6
4. Carlander D, Stålberg J, Larsson A. Ups J Med Sci. 1999;104(3):179-89
5. Bizanov G and Jonavskiene I (2003) Bull. Vet. inst. Pulawy 47, 403-410
6. Hoon H. Sunwoo\*, Eun N. Lee, Naiyana Gujral and Mavanur R. Suresh. The Open Immunology Journal, 2010, 3, 1-81
7. M. Sărăndan, R. Trif. E. Tîrziu. Lucrări Științifice Medicină Veterinară Vol. XLI, 2 2008, Timisoara
8. Criste Adriana, vol 49 Lucrări științifice seria Zootehnie, Universitatea de Științe agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” Iași, 2006 , pag.9-13
9. LeBacq-Verheyden, et al., Immunology 27:683 (1974)
10. Nestle, G.A. et al., J.Med , 130:1337 (1969)
11. Polson, A., et al., Immunological Communications. 9:495-514 (1980)
12. Fertel, R., et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 102:1028-1033 (1981)
13. Jencenius, et al , Journal of Immunological Methods, 46:363-68 (1981)
14. Polson, A., et al., Immunological Communications, 9:475-493 (1980)
15. Campbell, et al., Journal of immune Milk, 1 3 (1964).
16. Bibliografie prezentată în Cererea de Brevet de invenție nr. A/00156/25.02.2014

**Patente:**

**US 4618589** A Immunoprecipitation assay of immunoglobulins using monoclonal antibodies. Royston Jefferis, Jens Steensgaard.

**European Patent EP0355099** Immunoglobulin Assay Method. Mortimer, Philip Paul and Parry, John Victor

## INVENȚIA PE SCURT

A fost realizat un program special de cercetare pentru structurarea unui set de evaluare a capacității de inhibare a multiplicării bacteriene de către IgY-specific antigenului dat.

Setul a fost realizat pentru a testa tulpini bacteriene izolate de la pacienți în fază clinică și a putea interveni specific și eficient în tratamentul infecției produse de antigeul dat.

Imunoglobulinele specifice din structura seturilor acționează asupra tulpinilor parțial sau total rezistente la antibiotice, pentru care medicina nu mai are opțiuni terapeutice.

Tulpina bacteriană de testat este pusă în contact, în mediul lichid, cu anticopri specifici față de antigenul dat (IgY) sau separat față de IgY-SPF care nu conține anticopri specifici. Probele sunt incubate la 37 °C pentru 24 de ore cât durează testul. Rezultatele se pot interpreta la 4, 8 și respectiv 24 de ore cu ochiul liber sau spectofotometric

În cazul când proba este pozitivă, anticorprii specifici (IgY) blochează multiplicarea bacteriilor, iar mediul de cultură rămâne limpede sau cu un grad de turbiditate diferit în comaprație cu proba martor, sub 0,100 OD<sub>600</sub>.

### DESCRIEREA DETALIATĂ A IDEILOR PREFERATE DIN BREVET

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 multiplicarea bacteriilor, prin neutralizarea efectelor bioregulatorie și/sau nocive ale antigenului. Testul IMV PaChi este monovalent și acționează asupra unui mare de epitopi (multivalență). Testul IMB PaChi evidențiază și prezenta acestor epitopi (15-50%) la alte specii de bacterii. Testul evidențiază capacitatea de inhibiție a IgY-specific față de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice.

#### Principiul metodei

În tuburile de reacție există mediul de cultură lichid pentru bacteriile care urmează să se multiplice la temperatura de 37 °C.

- Un tub care conține glicoproteina extrasă din gălbenușul provenit de la păsări SPF
- Un tub cu mediul de cultură care are în componența sa imuoglobulina specifică anti specia de bacterii sau anti epitopii față de care au fost imunizate găinile.

- Cel de al treilea tub de reacție conține mediul de cultură în care se vor multiplica bacteriile din proba de testat.

Fiecare tub de reacție este însămânțat cu o cantitate egală de bacterii, aproximativ  $5 \times 10^5$ /ml sau echivalentul a 0,055 OD<sub>600</sub>. Probele se incubează la 37 °C și se interpretează prin comparație, cu ochiul liber sau prin spectofotometric. Creșterea bacteriilor fără factori inhibitori permite ca acestea să ajungă la un titru mare și să dea aspectul de turbiditate în mediu. Turbiditatea depinde de mediul de cultură, temperatură și timpul de incubație etc.

În proba de testat, care conține IgY-specific, în cazul când imunoglobulinele găsesc epitopi specifici, blochează activitatea bacteriană, limitat sau total, iar bacteriile nu se mai dezvoltă în mediul de cultură, lichidul rămânând limpede sau cu un grad de turbiditate mai mic decât al probei martor.

IgY-specific poate fi preparat din antigene care provin de la:

- o singură tulpină bacteriană;
- un amestec din mai multe tulpini ale aceleiași specii bacteriene,
- un amestec de antigene provenind de la mai multe specii de bacterii.

Tulpinile bacteriene sunt tulpini de referință ATCC sau tulpini bacteriene izolate, identificate și caracterizate obținute de la pacienții din România, care la controlul de laborator s-au dovedit parțial sau total rezistente la antibiotice.

### **Prepararea mediului de cultură cu IgY SPF**

Se amestecă 20 ml suspensie IgY-SPF cu 20 ml mediu de cultură (TSB sau Bulion nutritiv). Acest amestec se centrifughează la 1100 rpm, 20 minute la 4 °C. Supernatantul obținut se filtrează prin filtru de 0,45 μm (produsele care au fost liofilizate) și apoi sterilizant, prin filtru de 0,22 μm. Se repartizează câte 2 ml per tub.

### **Prepararea mediului de cultură cu IgY-specific**

Procedura de preparare este asemănătoare atât pentru mediul de cultură cu IgY-SPF cât și pentru mediul de cultură cu IgY-specific.

Se amestecă 25 mg de IgY liofilizată cu mediul de cultură TSB sau bulion nutritiv. Amestecul se centrifughează 20 de minute, la 1100 rpm, la temperatura de 22 °C. După centrifugare,

lichidul supernatant se sterilizeaza prin filtrare succesiva prin 0,45  $\mu\text{m}$  și respectiv 0,22  $\mu\text{m}$ .  
Produsul finit se pastreaza la +4 C și se verifică sterilitatea acestuia.

Mediile de cultură în amestec cu imunoglobulinele trebuie să fie sterile bacteriologic.

Se distribuie separat, în condiții aseptice, 2 ml de mediu cu imunoglobuline în tuburi sterile de unică folosință. 3% din recipiente se controlează bacteriologic prin incubare 48 ore la +37 °C.  
Toate probele trebuie să rămână sterile

Tuburile cu mediu care conțin imunoglobuline se individualizează cu etichete autoadezive pe care se menționează: tipul de IgY-specific, data preparării, seria de producție.

Mediul de cultură pentru multiplicarea bacteriilor se repartizează steril. Tuburile sunt indentificate folosind etichete autocolante.

Setul este conceput pentru unică folosință, iar după utilizare se degradează termic.

### **Conținutul trusei IMB PaChi (Foto #1)**

1. Mediu de cultură pentru multiplicarea bacteriilor pentru testare (9,9 ml)
2. Mediu de cultură cu IgY SPF = martor (2 ml)
3. Mediu de cultură cu IgY-specific pentru fiecare specie de bacterii în parte (2 ml)
4. Instrucțiuni de folosire

### **Protocolul de lucru.**

- a. Cultură bacteriană de 24 de ore, izolată și caracterizată, se poate folosi ca atare sau se poate multiplica în mediul din tubul #1 cu etichetă neagră. În acest scop în 9,9 ml de mediu de cultură se pun 0,1 ml din cultură bacteriană de testat. Suspensia bacteriană se omogenizează și se citește densitatea optică la un spectofotometru cu filtru 600 nm. Densitatea optică trebuie sa fie aproximativ 0 05 OD 600 nm.
- b. Din tubul de diluție se repartizează steril câte 2 ml de suspensie bacteriană în fiecare din celelalte 2 tuburi din 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 face cu ochiul liber sau cu spectofotometru cu filtru de 600 nm.





- c. Inhibarea specifică a creșterii bacteriilor se poate observa la 4 și 8 ore de incubație la 37°C. Efectul inhibitor specific al IgY se poate vedea cu ochiul liber când în proba cu IgY-specific mediul de cultură rămâne transparent, iar în proba martor mediul are o turbiditate din ce în ce mai mare la 4, 8 și respectiv 24 de ore

Se consideră o probă pozitivă când există o diferență între turbiditatea probei martor față de proba care conține IgY-specific. În cazul când densitatea optică se evaluează la un spectofotometru, proba este pozitivă când diferența între proba martor și proba cu IgY-specific este mai mare de 0,02 OD 600 nm (Foto #2 și Foto #3)

127

**Exemplul nr. 1****DETERMINAREA EFECTULUI INHIBITOR AL IgY CU AJUTORUL  
KITULUI IMB PaChi ASUPRA TULPINILOR BACTERIENE IZOLATE  
DE LA PACIENȚI (2013).**

Tulpini patogene: *Salmonella* spp. 60269; *Salmonella* BO, 60404; *Salmonella* DO, 60185; *Salmonella* DO, 59924; *Salmonella* DO, 59876; *Klebsiella pneumoniae* (FSBL, MBL) rezistente la antibiotice

Seturi de evaluare IMB-specific PaChi *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*.

**Executarea testului:**

- Se fac pasaje de 24 de ore din fiecare tulpină bacteriană de testat. Se prelevează steril 0,1 ml din fiecare cultură bacteriană de testat și se pun în tubul de diluție; se omogenizează bine, iar apoi se repartizează steril câte 2 ml în fiecare din celelalte tuburi ale kitului IMB PaChi.
- Se prelevează steril câte 0,3 ml din fiecare tub și se citesc valorile extincțiilor la spectofotometru la 600 nm.
- Se termostatează la 37 °C.
- După 4 ore se apreciază turbiditatea tuburilor cu ochiul liber și se pot preleva câte 0,3 ml pentru a se face citirea la specofotometru (dacă este posibil).

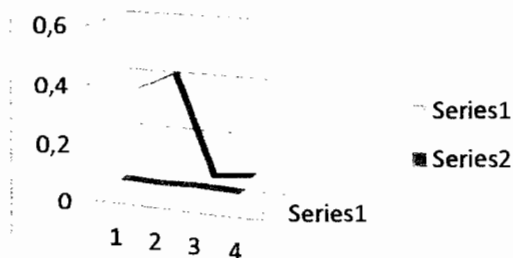
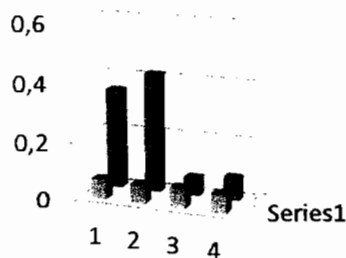
**Rezultate citiri la OD<sub>600</sub> nm**

Proba / Timp	Momentul 0	La 4 ore	
<b>60269 – <i>Salmonella</i> BO</b>			
Martor pozitiv	0.070	0.347	
Martor negativ	0.066	0.414	
IgY <i>Salmonella enteritidis</i>	0.071	0.064	
IgY <i>Salmonella typhimurium</i>	0.067	0.080	
<b>60404 – <i>Salmonella</i> DO</b>			
Martor pozitiv	0.054	0.335	
Martor negativ	0.067	0.406	
IgY <i>Salmonella enteritidis</i>	0.063	0.064	
IgY <i>Salmonella typhimurium</i>	0.062	0.067	

125

<b>60185 – Salmonella DO</b>			
Martor pozitiv	0.056	0.220	
Martor negativ	0.066	0.292	
IgY <i>Salmonella enteritidis</i>	0.063	0.062	
IgY <i>Salmonella typhimurium</i>	0.061	0.079	
<b>59924 – Salmonella DO</b>			
Martor pozitiv	0.061	0.250	
Martor negativ	0.076	0.320	
IgY <i>Salmonella enteritidis</i>	0.074	0.067	
IgY <i>Salmonella typhimurium</i>	0.064	0.060	
<b>59876 – Klebsiella pneumoniae (FSBL . MBL)</b>			
Martor pozitiv	0.115	0.504	
Martor negativ	0.172	0.775	
IgY <i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.105	0.345	

**Grafice formate după 4 ore de incubare la 37 °C**

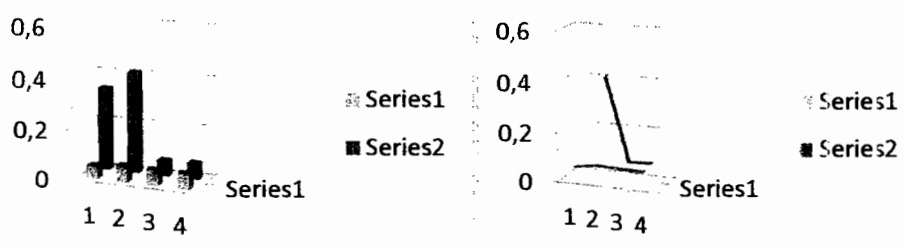


**Grafic #1.1:** 60269 – *Salmonella BO spp.* izolata de la bolnav (*S. enteritidis* sau *S. typhimurium*)

Din care:

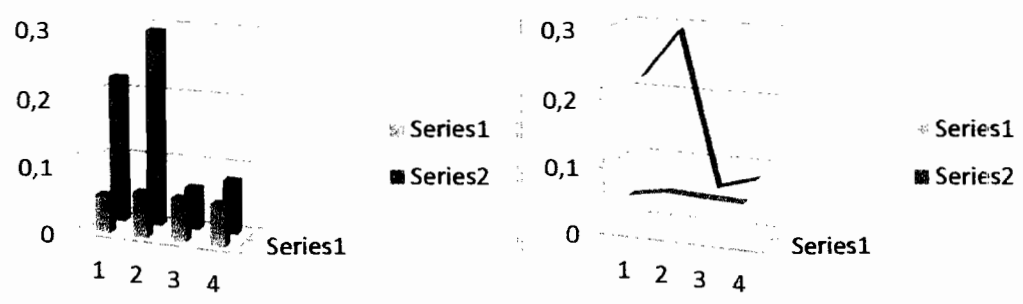
1. Martor pozitiv	0.070	0.347
2. Martor SPF	0.066	0.414
3. IgY <i>Salmonella enteritidis</i>	0.071	0.064
4. IgY <i>Salmonella typhimurium</i>	0.067	0.080

Stampa circulară și semnătură manuală.



**Grafic #1.2: 60404 – Salmonella DO**

1. Martor pozitiv	0.054	0.335
2. Martor negativ	0.067	0.406
3. IgY <i>Salmonella enteritidis</i>	0.063	0.064
4. IgY <i>Salmonella typhimurium</i>	0.062	0.067

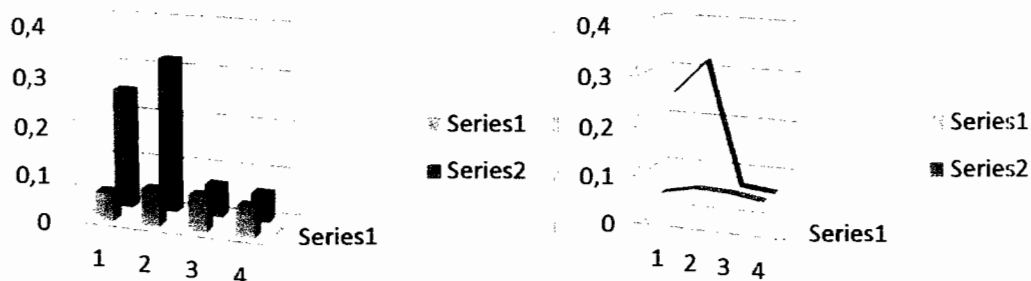


**Grafic #1.3: 60185 – Salmonella DO**

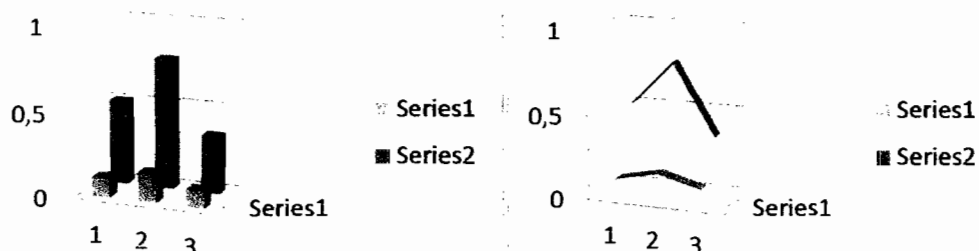
1. Martor pozitiv	0.056	0.220
2. Martor negativ	0.066	0.292
3. IgY <i>Salmonella enteritidis</i>	0.063	0.062
4. IgY <i>Salmonella typhimurium</i>	0.061	0.079



*[Handwritten signature]*

Grafic #1.4: 59924 – *Salmonella DO*

Martor pozitiv	0.061	0.250
Martor negativ	0.076	0.320
IgY <i>Salmonella enteritidis</i>	0.074	0.067
IgY <i>Salmonella typhimurium</i>	0.064	0.060

Grafic #1.5: 59876 – *Klebsiella pneumoniae* (FSBL . MBL)

1. Martor pozitiv	0.115	0.504
2. Martor negativ	0.172	0.775
3. IgY anti <i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.105	0.345

Se observă că IgY anti *K. pneumoniae* la diluția folosită nu acționează puternic asupra acestei tulpini de *K. pneumoniae*. În astfel de cazuri se mărește doza de IgY specific și se reduc intervalele de administrare a IgY. În cazul pacienților infectați cu salmonele se vede clar influența puternică de inhibare a IgY asupra creșterii bacteriilor.



**Exemplul nr. 2**

**DECELAREA EFECTULUI INHIBITOR AL IgY ANTI *Staphylococcus aureus* ASUPRA MULTIPLICĂRII BACTERIENE FOLOSIND SETUL IMB-SPECIFIC PaChi**

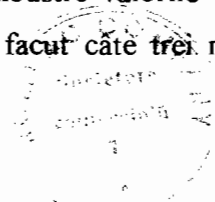
*Tulpina bacteriană Staphylococcus aureus* 64980 (MRSA) / 06.01.2014, set IMB-specific PaChi.

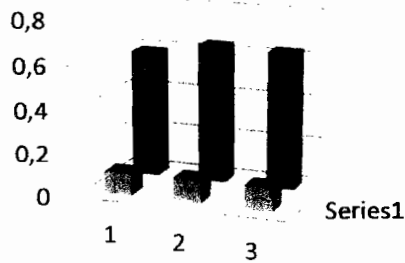
Pregătirea tulpinii de lucru *Staphylococcus aureus*: se pasează în mediu TSB, în raport 1:10 și se incubează la 37 °C timp de 24 de ore. Din cultura bacteriană de 24 de ore se iau 0,1 ml și se amestecă în tubul de diluție din kitul IMB PaChi (9, 9ml TSB). Din suspensie se iau câte 2 ml și se repartizează în celelalte tuburi din kit. Se fac citirile la 0, 4, și 24 ore atât cu ochiul liber, cât și la spectofotometru. De asemenea, se va face o titrare în plăci Petri la momentul 0 și la 4 ore, prin efectuarea diluțiilor zecimale pornind de la IgY anti *Staphylococcus aureus* din kitul IMB PaChi. Se lasă plăcile la termostat 24 de ore. După 24 de ore se fac numărătorile.

Rezultatele citirii spectofotometrice la OD 600 nm

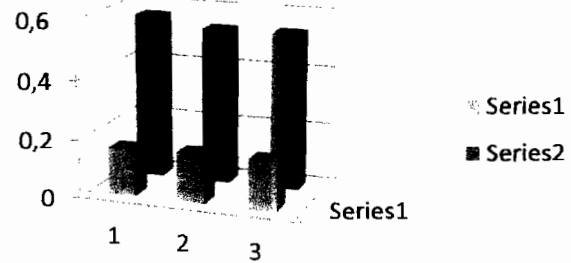
Proba / Timp	Momentul 0	La 4 ore	La 24 de ore
<b><i>Seria 3 din (16.10.2013) – Staphylococcus aureus</i></b>			
Martor pozitiv	0.103	0.588	
	0.107	0.642	
	0.108	0.631	
Martor negativ	0.162	0.568	
	0.168	0.535	
	0.168	0.537	
IgY <i>Staphylococcus aureus</i>	0.075	0.079	
	0.075	0.076	
	0.078	0.079	

Grafic #1 Marotr fără IgY (mediul de cultură). Coloanele albastre valorile OD la 0 ore și coloanele roșii valorile la 4 ore. În acest experiment s-au făcut câte trei replicare pentru reproductibilitate.





Grafic #2.1

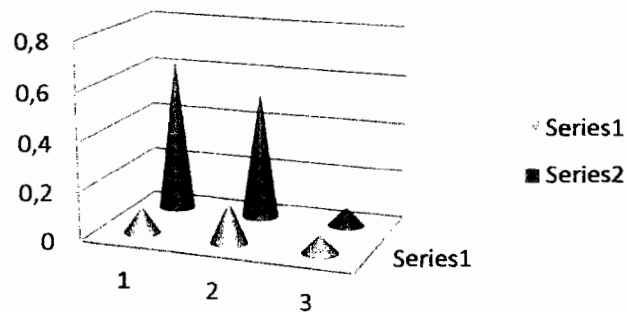


Grafic #2.2

**Grafic #2.1.** Martor negativ IgY (mediul de cultură). Coloanele albastre valorile OD la 0 ore și coloanele roșii valorile la 4 ore. În acest experiment s-au făcut câte trei replicare pentru reproductibilitate.

**Graficul #2.2.** Martor care conține mediul de cultură cu IgY SPF fără anticorpi specifici anti *S. aureus*.

Graficul #2.3: Rezultate comparative



Grafic #2.3

1. Martor reprezentat de mediul de cultură însămânțat la 0 și 4 ore
2. Martor care conține IgY SPF
3. Probă IgY-specific anti *S. aureus*

Școala Națională de Științe  
 Medicale și Farmaceutice  
 "Carol Davila" București  
 Departamentul de Microbiologie  
 Științific  
 1408  
 1408

120

**Exemplul #3**

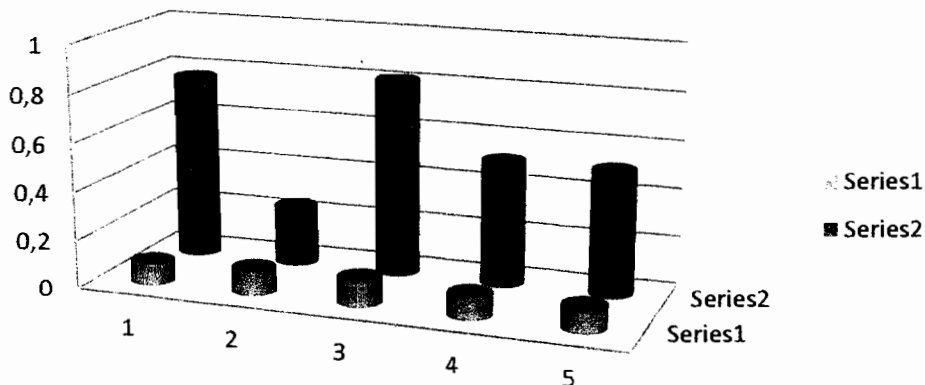
**CONTROLUL ACTIVITĂȚII DE INHIBARE SPECIFICĂ A  
MULTIPLICĂRII BACTERIILOR FOLOSIND SETUL IMB-SPECIFIC  
PaChi**

Tulpini bacteriene patogene, rezistente la antibiotic: *E. coli* (27104), *Staphylococcus aureus* 64980 (MRSA) / 12.12.2013, *Salmonella enteritidis* 60269, *Salmonella typhimurium* 56123, riană *Klebsiella pneumoniae* 59876;

IgY S.a. Seria 03, IgY E.c.+S.e. Seria 01, IgY K.p. + S. typh. Seria 01

**REZULTATE (Grafic #3.1)**

TULPINI/ IMB	IgY	Martor pozitiv	Martor negativ	Timp
<i>E. coli</i> 27104 (Foto #3.1)	0,090	0,087	0,146	0 ore
	0,088	0,776	0,814	4 ore
<i>St. aureus</i> 64980 (Foto #3.4 și #3.6)	0,103	0,117	0,161	0 ore
	0,105	0,249	0,278	4 ore
<i>S. enteritidis</i> 60269 (Foto #3.2)	0,090	0,107	0,144	0 ore
	0,110	0,821	1,016	4 ore
<i>S. typhimurium</i> 56123 (Foto #3.3)	0,091	0,101	0,150	0 ore
	0,096	0,521	0,579	4 ore
<i>K. pneumoniae</i> 59876 (Foto #3.5)	0,091	0,103	0,145	0 ore
	0,123	0,580	0,710	4 ore



**Grafic #3.1:** 1 *E. Coli*; 2 *Staphylococcus aureus*; 3 *Salmonella enteritidis*; 4 *Salmonella typhimurium*; 5 *Klebsiella pneumoniae*

Stampa și semnătură



Coloanele colorate în albastru reprezintă valorile probelor cu IgY specific.

Coloanele rosii și verzi reprezintă martorii de reacție.

De la stânga la dreapta, prima coloană reprezintă citirile la 0 ore, iar a doua coloană la 4 ore.

La *S. aureus* creșterea e mai lentă. La 8 și 24 de ore diferența este foarte mare. În acest caz IgY specific rămâne la aceeași valoare (0,045 OD).

- În acest model experimental s-a realizat un amestec de IgY care au fost testate pentru fiecare bacterie în parte. În acest caz se face un amestec de IgY (poly) care se poate administra pacientului imediat după prelevarea probei, la internare, în momentul când s-a prezentat la spital. fără să se știe ce tip de infecție are. Rezultatele se obțin după 48 sau chiar 96 de ore. Între timp se face tratamentul cu IgY polivalent. Amestecul se va face în funcție de experiența celor din spital și de frecvență reală a infecțiilor bacteriene (primele 7, 8 sau 10 tulpini bacteriene).
- Acest IgY bacterian se poate oferi în iaurt fiecărui pacient care se internează în spital, preventiv ca să se evite infecțiile intraspitalicești!
- Se poate administra și în clinicile cu copii bolnavi de cancer unde cel mai frecvent se fac infecții intraspitalicești!!

Foto #3.6: Tubul nr. 4 (dreapta) este cu IgY-specific anti *S. aureus*. Restul tuburilor sunt martor. Se vede clar, la 4 ore de incubație la 37 °C o diferență mare între tubul 4 unde IgY-specific inhibă creșterea bacteriilor și tuburile martor. Testul se poate citi la 4 ore. În plus pentru tesul IMB PaChi se poate folosi o cultură de bacterii la 4 ore de incubație la 37 °C. În acest caz timpul de control se scurtează de la 48 de ore la 8 ore!!! În plus setul de poate lăsa la incubație la 37 °C până la 24 de ore pentru o confirmare finală.

Efectul inhibitor se vede foarte clar în tubul în care este prezentă imunoglobulina IgY-specifică, atât cu ochiul liber cât și în urma rezultatelor care au fost obținute la spectrofotometru. În cazul citirii de la momentul 0, valoarea medie a rezultatelor obținute la spectrofotometru este de 0,166 la martorul negativ pe când la cel pozitiv este de 0,106, iar la IgY este de 0,076. Citirea probelor la 4 ore a generat următoarele rezultate: martor negativ 0,547, martor pozitiv 0,620 și IgY 0,078. Diferența este 0,381 la martorul negativ, 0,514 la martorul pozitiv și 0,003 la IgY

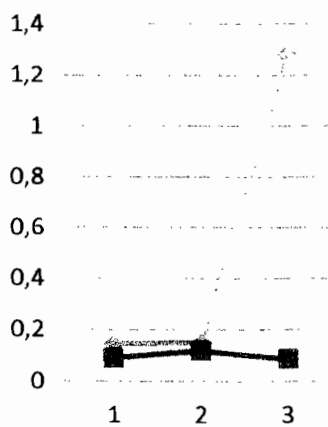
Efectul inhibitor al imunoglobulinei IgY anti *S. aureus* este prezent.

**Exemplul #4**

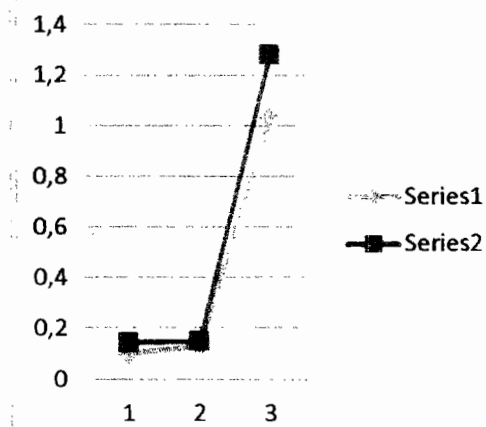
**CONTROLUL ACTIVITĂȚII DE INHIBIȚIE SPECIFICĂ A IMB  
PACHI LA DIFERITE SERII DE IgY-SPECIFIC**

IgY anti *Staphylococcus aureus* seriile etalon 02, 03, 04 și 05 (Grafic #4.1 - #4.6)

Proba/ Timp	02	03	IgY S.a. Etalon Romvac	IgY S.a. seria 02	IgY S.a. seria 03	IgY S.a. seria 04	IgY S.a. seria 05
0 ore	0.102	0.145	0.085	0.175	0.091	0.092	0.089
4 ore	0.130	0.150	0.085	0.127	0.120	0.092	0.088
24 ore	1.037	1.283	0.085	0.058	0.088	0.093	0.089



**Grafic #4.1:** IgY-SPF vs. IgY-*S.aureus* seria S.a. 03



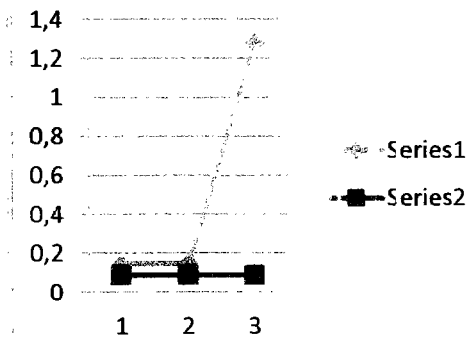
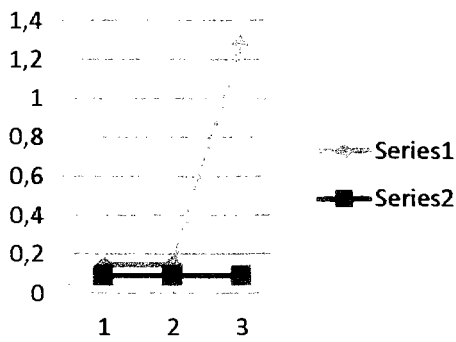
**Grafic #4.2:** Creștere la 24 h martori

Graficul #4.1: Martor IgY SPF (linia albastră) în comaprație cu IgY-specific seria 03/2013. Linia albastră este graficul creșterii la 24 ore de incubație la 37 °C. Linia roșie demonstrează inhibiția produsă de IgY anti *S. aureus* seria 03/2013.

În Graficul #4.2 sunt martorii de testare: mediul de cultură + *S. aureus* și mediul de cultură cu IgY SPF + *S. aureus*.

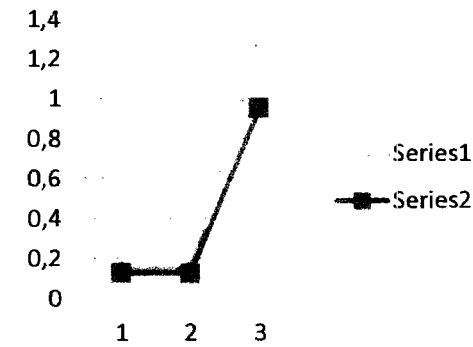
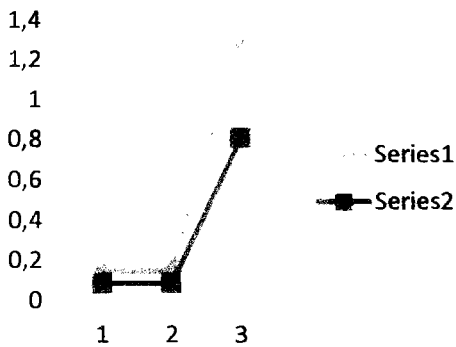
Stampa și semnătura:

18



Grafic #4.3: Seria S.a. 04

Grafic #4.4: Seria S.a. 05



Grafic #4.5: Seria etalon IgY S.a.

Grafic #4.6: Seria IgY S.a seria 02/2013

Nu toate seriile de IgY sunt la fel. Activitatea specifică a IgY cu privire la inhibarea creșterii bacteriene se poate controla numai cu testul IMB-specific PaChi. Nu se poate exprima activitatea specifică a IgY față de antigenul dat folosind testele de imunoprecipitare sau imunoenzimatic, deoarece acestea nu exprimă acțiunea de neutralizare a efectelor bioregulatorie și/sau efectele nocive ale antigenului.

Stampa circulară și semnătură în colțul din dreapta jos al paginii.

## Exemplul #5

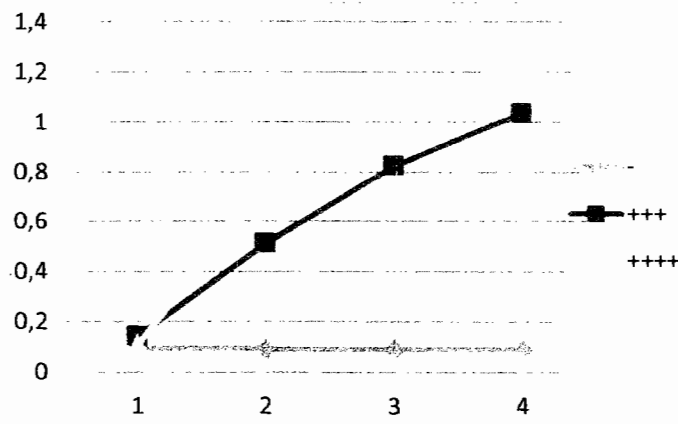
## INHIBAREA MULTIPLICĂRII BACTERIENE FOLOSIND IgY-SPECIFIC ȘI TESTUL IMB-SPECIFIC PaChi

Tulpini de referință ATCC și tulpini bacteriene izolate de la pacienți rezistente la antibiotice.

Control cu ochiul liber și spectrofotometric la 0, 4, 8 și 24 de ore.

Exprimarea grafică a multiplicării bacteriilor la 0, 4, 8 și 24 de ore.

### *Staphylococcus aureus* ATCC 29213



**Grafic #5.1:** Multiplicare *S. aureus* ATCC 29213 la 0, 4, 8 și 24 de ore (Foto #5.1)

OD 600 (densitate optică) pe verticală

Timpul exprimat în ore pe orizontală

1. = momentul zero de incubație la +37 °C

2. = 4 ore de incubație la 37 °C

3. = 8 ore de incubație la 37 °C

4. = 24 ore de incubație la 37 °C

Linia neagră: mediul de cultură cu IgY-specific anti *S. aureus*

Linia roșie: mediul de cultură cu *S. aureus*

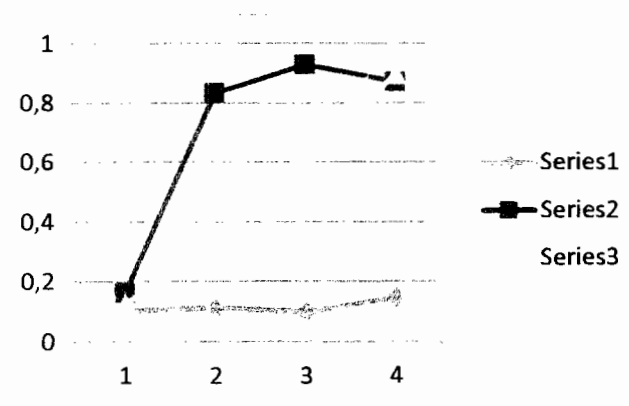
Linia verde: mediul de cultură cu IgY SPF nespecific

Staphylococcus aureus ATCC 29213

115

20

*E. coli* ATCC 25922



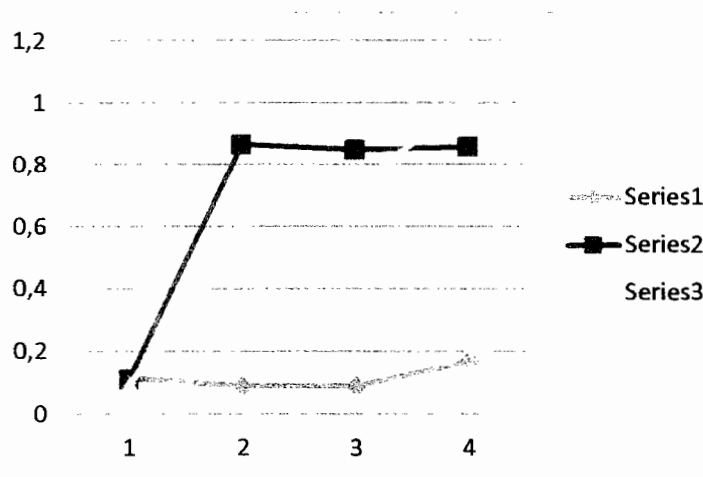
**Grafic #5.2:** Multiplicare *E. coli* ATCC 25922 la 0, 4, 8 și 24 de ore (Foto #5.2)

Linia albastră: IgY specific anti *E. coli*

Linia roșie: IgY SPF nespecific

□ : mediul de cultură cu *E. coli*

*Salmonella typhimurium* ATCC 14028



**Grafic #5.2:** Multiplicare *S. typhimurium* ATCC 14028 la 0, 4, 8 și 24 de ore (Foto #5.3)

Linia albastră: IgY specific anti *S. typhimurium*

Linia roșie: martor mediu de cultură lichid cu *Salmonella typhimurium*

□ : martor IgY SPF nespecific

**Comentarii:**

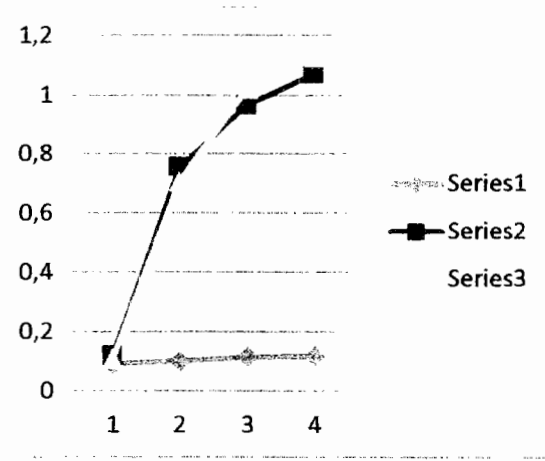
1. Curba înregistrată pentru mediul de cultură lichid cu *Salmonella typhimurium* arată formarea platoului de creștere la 2 h de incubație.

2. În tubul martor care conține IgY nespecific (IgY SPF) rata de creștere a bacteriilor este mai mare decât la tubul martor cu mediu de cultură deoarece în substratul nutritiv există și proteină care compune IgY SPF.
3. La proba de IgY-specific *E. coli* la 24 de ore se vede că germeii încep să se multiplice și în mediul în care imunoglobulina inhibă specific acest fenomen.
4. Momentul în care se constată un proces de multiplicare a bacteriilor în proba cu IgY-specific anti *E. coli* este dovada activității de inhibare a multiplicării bacteriene folosind setul IMB-specific PaChi
5. Inhibiția specifică a multiplicării bacteriilor se poate citi și cu ochiul liber la 4 ore de incubație. În aceste condiții se permite specialistului să aibă o intervenție mai rapidă asupra pacientului.

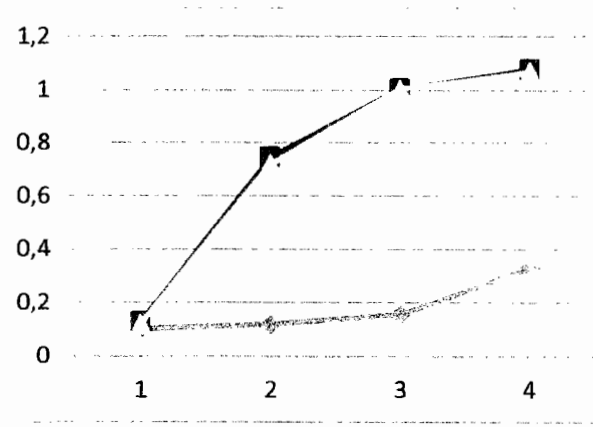
### Exemplul nr 6

## TESTAREA CONCOMITENTA A TREI TULPNI DIFERITE DE *Klebsiella pneumoniae* IZOLATE DE LA PACIENȚI DIN SVB, TULPINI REZISTENTE LA ANTIBIOTICE

Trusă IMB PaChi cu IgY specific anti *Klebsiella pneumoniae*

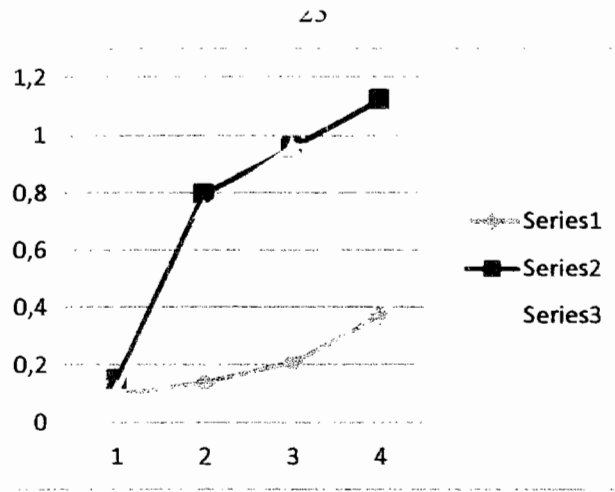


Grafic #6.1: *Klebsiella pneumoniae* proba #55717 (Foto #6.1)



Grafic #6.2: *Klebsiella pneumoniae* proba #55826 (Foto #6.2)

Stampa circulară și semnătură manuală.



**Grafic #6.3: *Klebsiella pneumoniae* proba #57533 (Foto #6.3)**

Linia : IgY specific anti *Klebsiella pneumoniae*

Linia roșie: IgY SPF martor

Linia : mediul de cultură lichid însămânțat

#### **Comentarii:**

În aceste experimente se poate constata reacția uniformă a matorului IgY SPF și a mediului de cultură lichid.

Experimentele KP 57533 și KP 55826 sunt cele mai edificatoare din acest program. Se vede clar că activitatea bacteriilor nu este distrusă în totalitate și că la 24 de ore se înregistrează un început de multiplicare a acestora în mediul cu IgY-specific anti KP. În astfel de situații sub control de laborator se poate crește cantitatea de IgY-specific și se pot scurta intervalele de administrare a IgY.



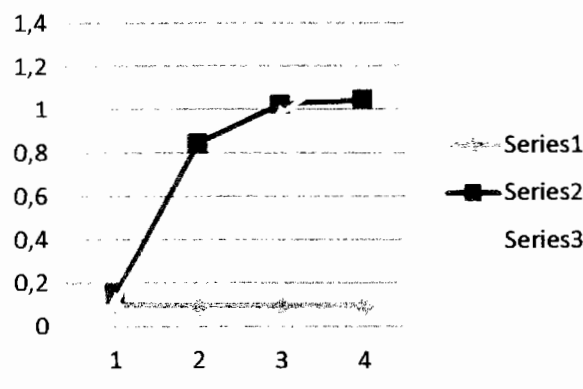


## Exemplul nr. 7

## CONTROLUL EFECTULUI DE INHIBIȚIE A MULTIPLICĂRII BACTERIILOR FOLOSIND IMB-SPECIFIC ANTI *S. aureus*

Tulpina patogenă izolată de la om, rezistentă la antibiotic *Staphylococcus aureus* 64980

IgY-specific anti *S. aureus*



**Grafic #7.1:** Inhibiția dezvoltării *Staphylococcus aureus* 64980, tulpina patogenă izolată de la om, rezistentă la antibiotic

Linia albastră: IgY specific anti *S. aureus*

Linia roșie: IgY SPF martor pozitiv

Linia : mediu de cultură lichid

Inhibiția specifică a multiplicării bacteriilor se poate constata de la 4 ore de incubație și se menține constant pe toată perioada de control de 24 de ore și după aceasta 30 de zile cât a ținut experimentul (Foto 7.1).

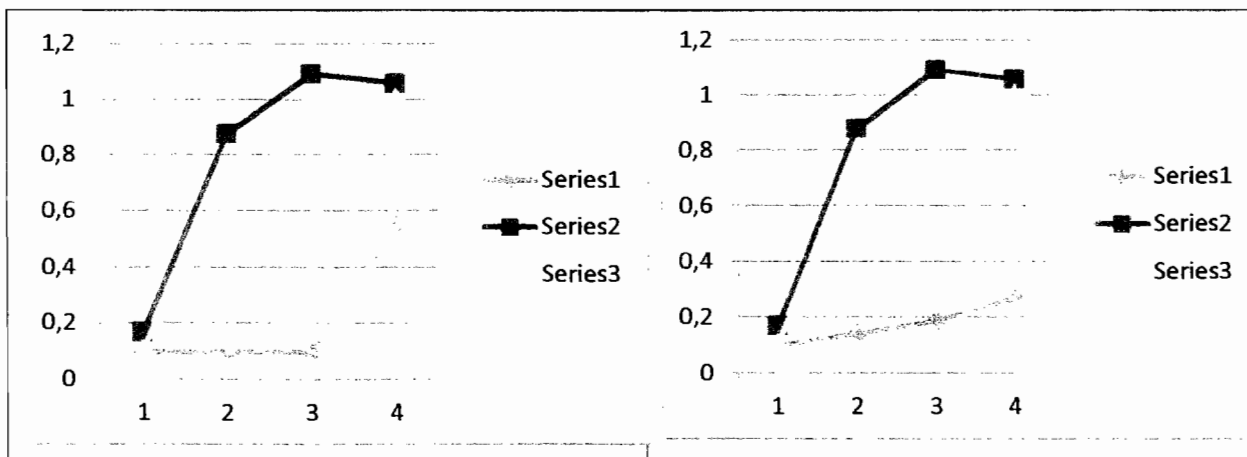


Exemplul nr. 8

INHIBAREA MULTIPLICĂRII SALMONELELOR DE CĂTRE IGY  
ANTI *S. enteritidis* ȘI IGY ANTI *S. typhimurium*

Trusă cu IgY anti *Salmonella enteritidis* și IgY anti *Salmonella typhimurium*

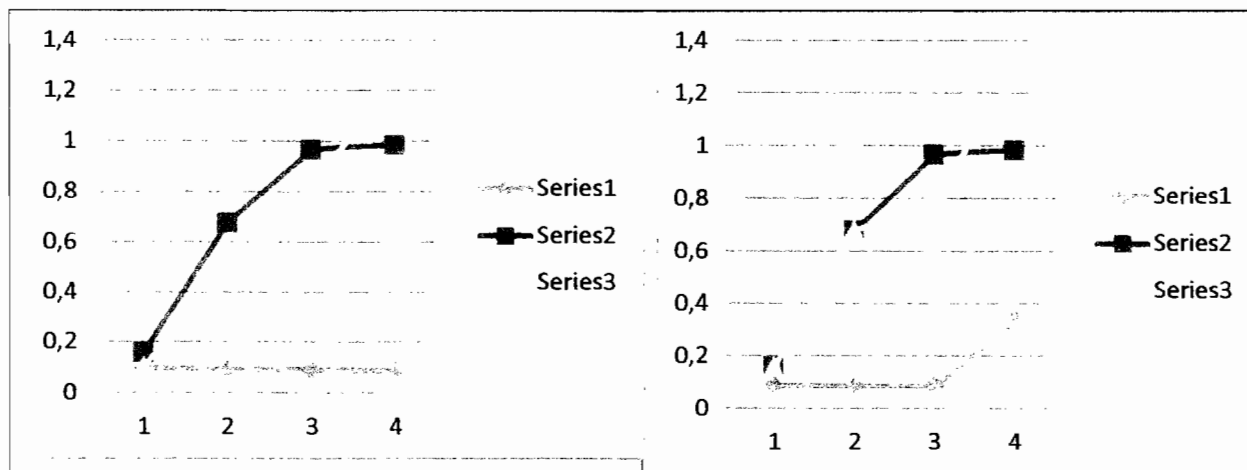
*Salmonella* spp.#57685



Grafic #8.1: IgY anti *Salmonella enteritidis*

Grafic #8.2: IgY anti *Salmonella typhimurium*

*Salmonella* spp. # 56123



Grafic #8.3: IgY anti *Salmonella enteritidis*

Grafic #8.4: IgY anti *Salmonella typhimurium*

Se constată diferențe antigenice între *S. enteritidis* și *S. typhimurium*, privind inhibarea multiplicării în vitro. Test efectuat cu seturi IMB-specifice PaChi. Inhibiția specifică a multiplicării bacteriilor a fost totală la *Salmonella* spp. # 56123 și parțial la *Salmonella* spp. sau *Salmonella typhimurium*.

**Exemplul nr. 9**

**TESTAREA INHIBARII MULTIPLICĂRII BACTERIENE SUB  
INFLUENȚA IGY SPECIFIC A TULPINILOR BACTERIENE IZOLATE  
DE LA PACIENȚII ȘI A TULPINILOR DE REFERINȚĂ (ATCC)**

**MATERIALE ȘI METODE**

**1. Materiale**

Pipete de unică folosință de 1 ml  
Tuburi de unică folosință de 14 ml  
Plăci ELISA  
Pipete monocanal  
Vârfuri sterile de 1000 µl

**2. Substanțe și reagenți:**

Bulion nutritiv Hi Media lot 0000162760  
Set IMB PaChi

**3. Tulpini bacteriene**

*Staphylococcus aureus* 64980 (MRSA)  
*E.coli* 56637 (ESBL)  
*Klebsiella pneumonia* 55717  
*Klebsiella pneumonia* 55826  
*Klebsiella pneumoniae* 57533  
*Salmonella* sp. DO 56123  
*Salmonella* sp. BO 57985  
*Salmonella* sp. DO 57415

**4. Tulpini de colecție**

*Salmonella typhimurium* ATCC 14028  
*Staphylococcus aureus* ATCC 29213  
*E.coli* ATCC 25922

**5. IgY-specific liofilizat**

IgY anti *St. aureus* (seria 03/ 16.10.2013)  
IgY anti *S. typh.* - *K. pneumoniae* (seria 01/12.11 2013)  
IgY anti *E. coli* - *S. Enteritidis* (seria 01/ 12.11.2013)

## REZULTATE:

Tulpini / IMB	Ore incubare	IgY specific	IgY SPF	Mediu + cultură	Interpretare
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0	0,097	0,147	0,115	0
	4	0,094	0,516	0,753	POZITIV
	8	0,092	0,827	1,099	POZITIV
	24	0,092	1,040	1,232	POZITIV
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0,103	0,163	0,127	0
	4	0,113	0,834	0,326	POZITIV
	8	0,101	0,930	0,610	POZITIV
	24	0,150	0,873	0,898	POZITIV
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	0	0,116	0,112	0,094	0
	4	0,091	0,864	0,609	POZITIV
	8	0,092	0,848	0,731	POZITIV
	24	0,172	0,857	1,002	POZITIV
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 55717	0	0,094	0,122	0,112	0
	4	0,103	0,756	0,707	POZITIV
	8	0,117	0,967	1,024	POZITIV
	24	0,120	1,073	1,130	POZITIV
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 55826	0	0,101	0,129	0,122	0
	4	0,120	0,747	0,722	POZITIV
	8	0,158	1,008	1,007	POZITIV
	24	0,335	1,080	1,071	POZITIV
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 57533	0	0,097	0,151	0,115	0
	4	0,141	0,799	0,748	POZITIV
	8	0,212	0,962	0,965	POZITIV
	24	0,376	1,125	0,974	POZITIV
<i>E. coli</i> 56637	0	0,100	0,154	0,116	0
	4	0,095	0,774	0,544	POZITIV
	8	0,096	0,973	0,787	POZITIV
	24	0,104	1,016	1,734	POZITIV
<i>Salmonella spp.</i> IgY anti <i>S. enteritidis</i> 57685	0	0,098	0,170	0,110	0
	4	0,098	0,879	0,746	POZITIV
	8	0,097	1,094	1,002	POZITIV
	24	0,556	1,059	1,009	POZITIV
IgY anti <i>S. typhimurium</i>	0	0,101	0,170	0,110	0
	4	0,141	0,870	0,746	POZITIV
	8	0,189	1,094	1,002	POZITIV
<i>Salmonella spp.</i> IgY anti anti <i>S. enteritidis</i> 56123	24	0,270	1,059	1,009	POZITIV
	0	0,100	0,160	0,108	0
	4	0,095	0,679	0,461	POZITIV
	8	0,094	0,969	0,805	POZITIV
IgY anti <i>S. typhimurium</i>	24	0,088	0,986	1,273	POZITIV
	0	0,090	0,160	0,160	0
	4	0,086	0,679	0,679	POZITIV
	8	0,089	0,969	0,805	POZITIV
	24	0,336	0,986	1,273	POZITIV

Imagini 5:15:00 2014-03-01 10:15:00 setul IM: 10:15:00

Belor dia

**Concluzii:**

1. IgY-specific preparat conform tehnologiei descrise în Cererea de brevet nr A/00156/25.02.2014 inhibă specific multiplicarea bacteriilor
2. Setul IMB-specific PaChi permite evaluarea activității IgY-specific față de tulpinile bacteriene standard ATCC
3. Setul IMB-specific PaChi acționează specific asupra tulpinilor bacteriene patogene rezistente la antibiotice izolate de la pacienți.
4. Utilizarea setului IMB-specific PaChi permite evaluarea cu ochiul liber sau spectrofotometrică a activității IgY-specific după 4 ore de incubație la 37 °C.
5. Setul IMB-specific PaChi poate fi folosit pentru stabilirea conduitei terapeutice după 4 ore de la utilizare
6. Imunoglobulinele Y specifice preparate la ROMVAC se pot folosi în tratamentul bolnavilor infectați cu bacterii patogene pentru care s-a dovedit că acționează specific în baza rezultatelor obținute prin folosirea setului IMB-specific PaChi

## Exemplul nr. 10

**INHIBAREA *IN VITRO* A MULTIPLICĂRII BACTERIILOR<sup>a)</sup>  
FOLOSIND TESTUL IMB-SPECIFIC PaChi.**

Specie bacteriană	Experiment #	Izolot #	Set IMB PaChi	Inhibare <sup>c)</sup>
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	57985	anti <i>S. enteritidis</i>	++++
			anti <i>S. typhimurium</i>	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	55717	anti <i>Klebsiella pneumoniae</i>	++++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	55826		++++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	57533		++++
<i>Salmonella spp.</i>	5	57415	anti <i>S. enteritidis</i>	++++
			anti <i>S. typhimurium</i>	++++
<i>Salmonella spp.</i>	6	57985	anti <i>S. enteritidis</i>	++++
			anti <i>S. typhimurium</i>	+++
<i>Salmonella spp.</i>	7	56123	anti <i>S. enteritidis</i>	++++
			anti <i>S. typhimurium</i>	+++
<i>Salmonella enteritidis</i>	8	57415	anti <i>S. enteritidis</i>	++++
			anti <i>S. typhimurium</i>	+++
<i>Salmonella enteritidis</i>	9	57983	anti <i>S. enteritidis</i>	++++
			anti <i>S. typhimurium</i>	+++
<i>Salmonella enteritidis</i>	10	57415	anti <i>S. enteritidis</i>	++++
			anti <i>S. typhimurium</i>	+++
<i>Salmonella spp.</i>	11	56123	anti <i>S. enteritidis</i>	++++
			anti <i>S. typhimurium</i>	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	64980	anti <i>St. aureus</i>	++++
<i>Escherichia coli</i>	13	566123	anti <i>E. coli</i>	++++

<sup>a)</sup> Tulpini bacteriene izolate de la pacienți. Tulpini rezistente la toate antibioticele folosite în spital.

<sup>b)</sup> Set de control specific al inhibării multiplicării bacteriene *in vitro*

<sup>c)</sup> Evaluarea inhibării se face prin comparare cu tuburile inartor din setul IMB PaChi. Inhibarea multiplicării bacteriilor se evidențiază prin reducerea turbidității din tubul cu IgY-specific comparativ cu martorii. Acest control se face cu ochiul liber la 8 și 24 de ore.

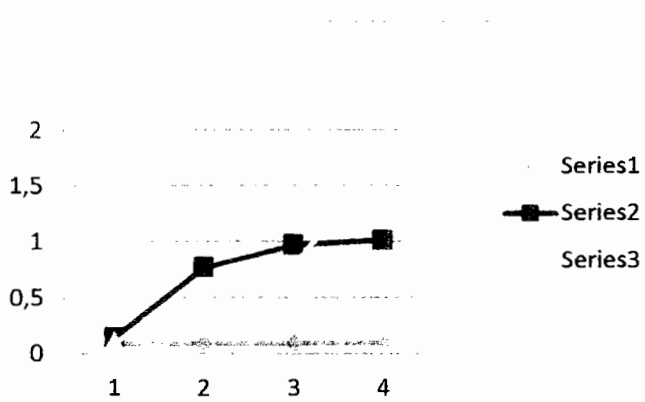
105

### Exemplul nr. 11

**DETERMINAREA EFECTULUI INHIBITOR SPECIFIC ASUPRA BACTERIILOR *Escherichia coli* TULPINA # 56637 DE CĂTRE IGY SPECIFIC ANTI *E. coli*, FOLGSIND TESTUL IMB-SPECIFIC PaChi**

(Foto 11.1)

Procedura de lucru este cea recomandată.

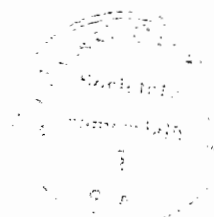


Grafic #11.1

● : IgY specific anti *E. coli*

■ : Mediul de cultură lichid

▲ : Linia roșie: IgY SPF martor



## REVENDICĂRI

### Titlul


# METODĂ DE EVALUARE IMUNOBIOLOGICĂ A ACTIVITĂȚII SPECIFICE A IMUNOGLOBULINELOR DE PASĂRE (IgY)

**Cerere: să se recunoască ca noutate și să fie protejată prin brevet în România:**

- 1 O metodă imunologică potrivit căreia se face evaluarea activității specifice a imunoglobulinelor aviare (IgY), extrase din gălbenușul provenit de la găini imunizate cu antigenul dat.
- 2 O metodă imunologică potrivit căreia se poate face determinarea activității specifice a anticorpilor IgY asupra antigenului dat.
- 3 O metodă potrivit căreia se face evaluarea imunologică a activității anticorpilor IgY asupra bacteriilor patogene rezistente parțial sau total la antibiotice.
- 4 O metodă potrivit căreia se poate controla procedura de tratament în funcție de activitatea specifică a anticorpilor proveniți de la găini imunizate cu antigenul dat.
- 5 Un set de evaluare potrivit căruia se poate evidenția activitatea specifică a imunoglobulinelor de pasăre (IgY) *in vitro*.
- 6 Metoda revendicată la pct. 1 poate fi folosită prin citirea rezultatelor cu ochiul liber sau spectrofotometric
  - a) folosind un material care conține anticorpi heterologi contra numitului antigen, anticorpi obținuți din oul păsărilor domestice imunizate față de numitul antigen, se poate stabili dacă acționează specific față de antigenul dat și modul în care inhibiția multiplicării bacteriilor permite ca aceste imunoglobuline să fie folosite activ în tratamentul preventiv sau curativ.
  - b) folosind o metodă imunologică prin care să se poată stabili dacă anticorpii acționează specific asupra bacteriilor inhibând parțial sau total multiplicarea acestora
  - c) folosind o metodă imunologică pentru a stabili activitatea specifică a IgY după administrare la numitul mamifer față de numitul antigen.



- 7 Metoda revendicăată la pct. 1 potrivit căreia numitul antigen este o specie de bacterie rezistentă la antibiotic izolată de la pacienți din România.
- 8 Metoda revendicăată la pct. 1 potrivit căreia numitul antigen este o combinație de tulpini bacteriene rezistene la antibiotice de la aceeași specie de bacterii izolate de la diferiți pacienți din România.
- 9 Metoda revendicăată la pct. 1 potrivit căreia numitul antigen este o combinație de specii bacteriene rezistene la antibiotice provenite de la diferiți pacienți din România.
- 10 Metoda revendicăată la pct. 1 potrivit căreia numita imunizare pasivă este preventivă.
- 11 Metoda revendicăată la pct. 1 potrivit căreia numita imunizare pasivă este curativă.
- 12 Metoda revendicăată la pct. 1 potrivit căreia pasărea domestică este numită găină (*Gallus domesticus*).
- 13 Metoda revendicăată la pct. 1 potrivit căreia numitul anticorp este purificat din oul numitei păsări domestice.



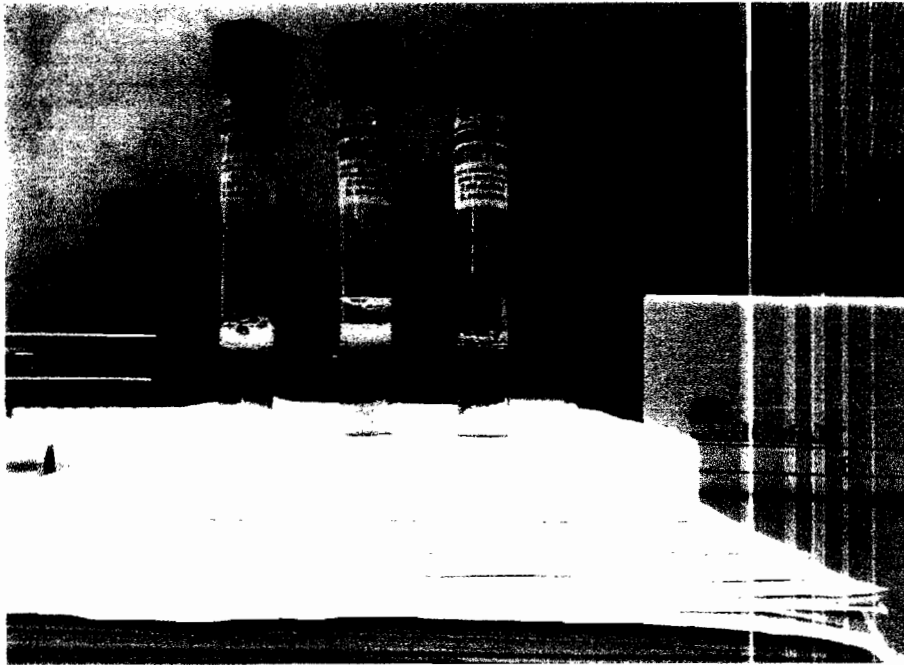


Foto #1. Set IMB PaChi înainte de utilizare

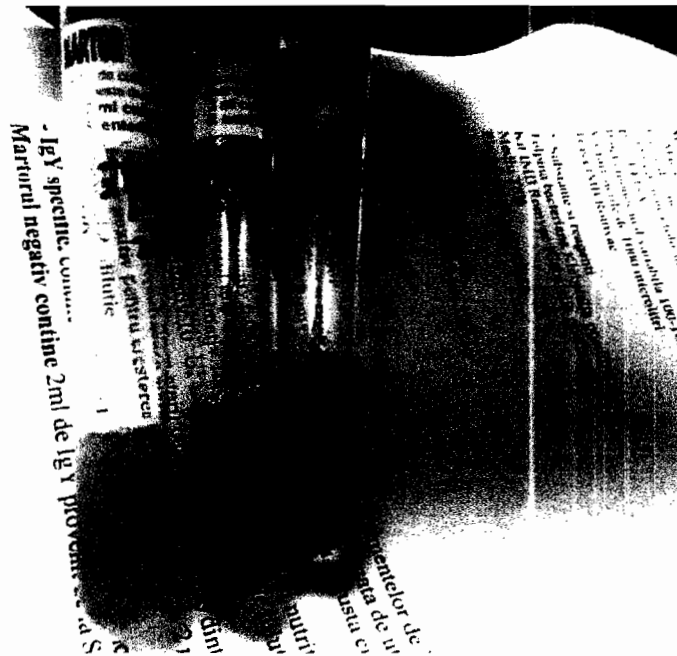
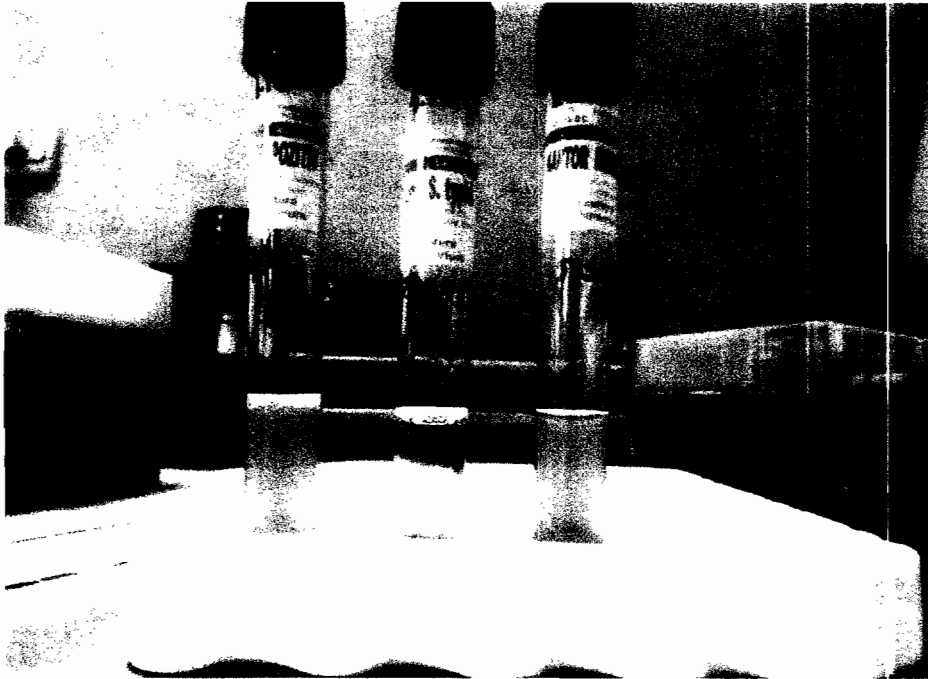


Foto #2. Test pozitiv IMB pentru *Salmonella enteritidis* la 8 ore de incubatie

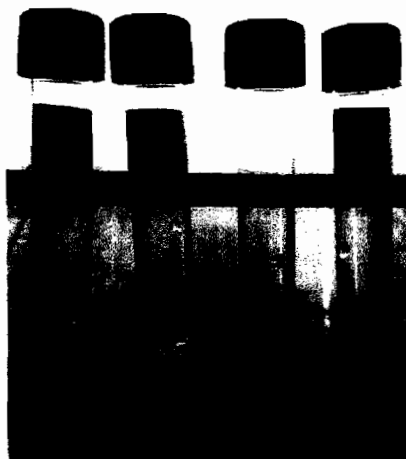
MC COM  
Societate  
comercială  
S.A.



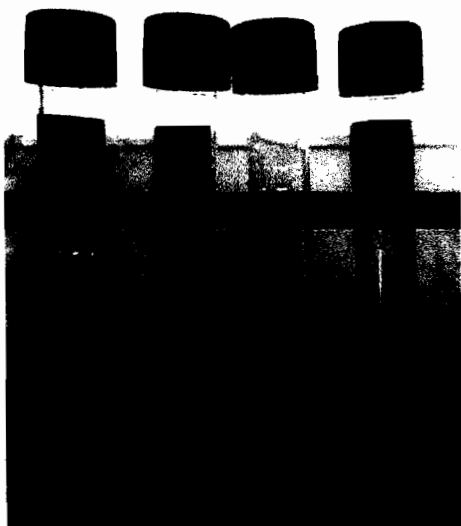
**Foto #3** Test pozitiv IMB PaChi în care inhibiția multiplicării bacteriilor este parțială la 8 ore de incubație.

SC COMPANIA  
Societate  
Comercială  
S.A.

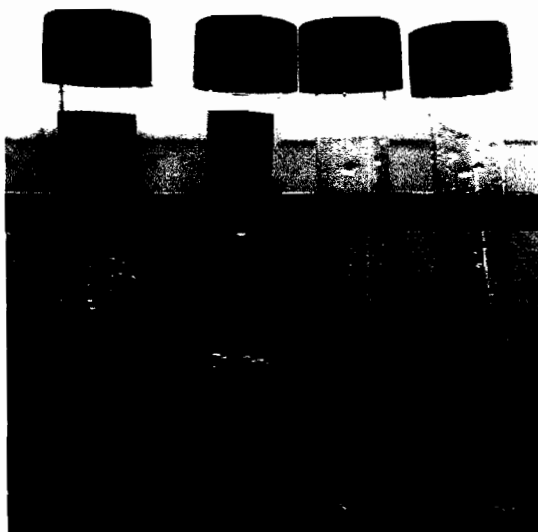
**EXEMPLUL 3**



**Foto #3.1:** Inhibiție *E. coli* după 4 ore



**Foto #3.2:** Inhibiție *S. e.* după 4 ore



**Foto #3.3:** Inhibiție *S. typh.* după 4 ore



4

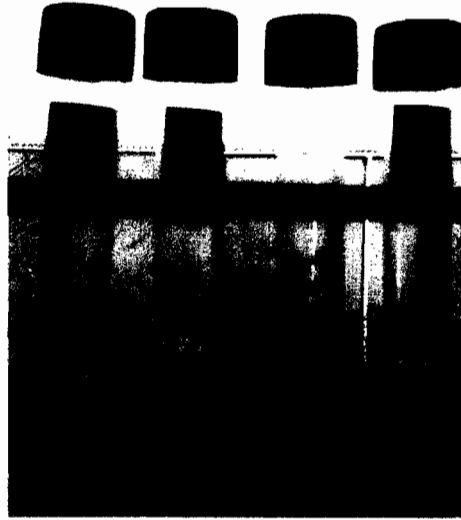


Foto #3.4: Inhibiție *S. aureus*. după 4 ore

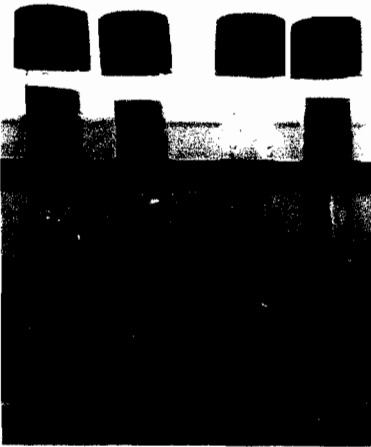


Foto #3.5: Inhibiție *K. pneumoniae* după 4 ore

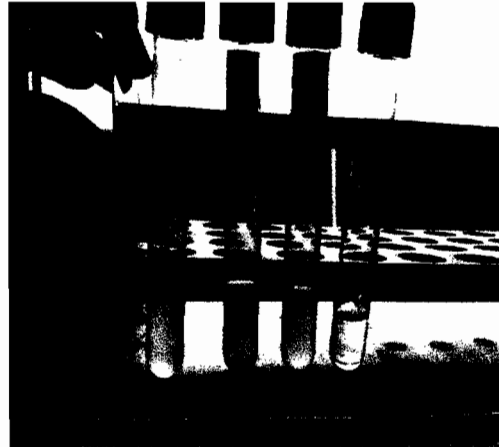
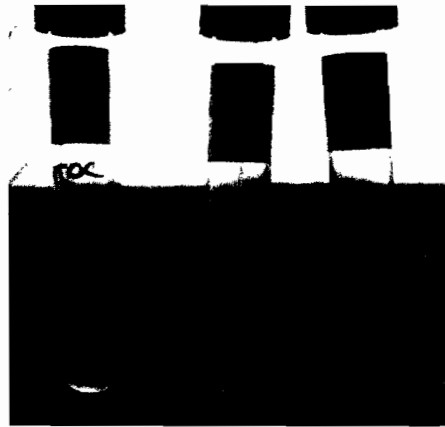


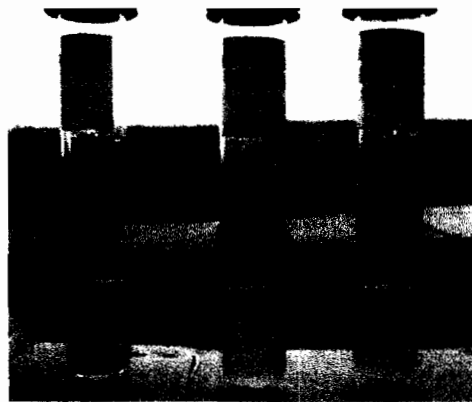
Foto #3.6: Inhibiție *S. aureus* după 4 ore

1985 COD  
Societate  
Generale  
S.A.

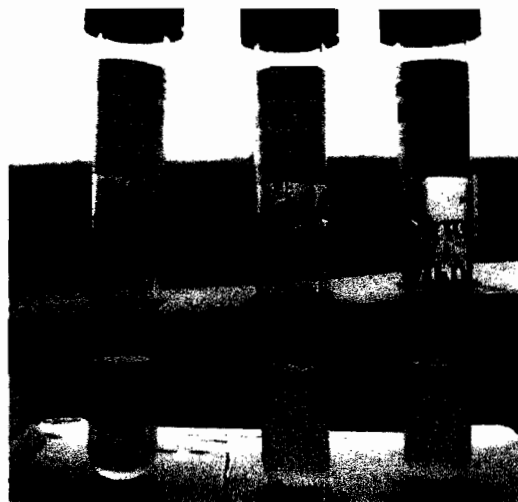
**EXEMPLUL 5**



**Foto #5.1:** Inhibare multiplicare *Staphylococcus aureus* ATCC 29213



**Foto #5.2:** Inhibare multiplicare *E. coli* ATCC 25922



**Foto #5.3:** Inhibare multiplicare *S. typhimurium* ATCC 14028

SCS COMPTON  
Societate  
comerciala  
S.A.

### EXEMPLUL 6

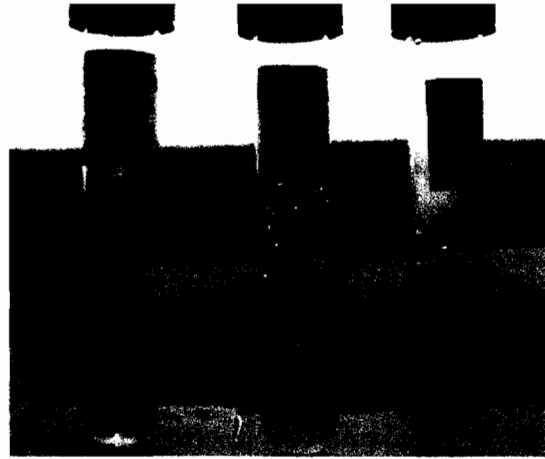


Foto #6.1: Inhibare multiplicare *K. pneumoniae* proba #55717

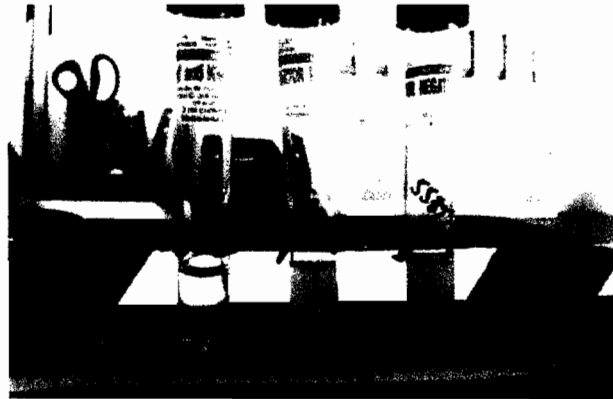


Foto #6.2: Inhibare multiplicare *K. pneumoniae* proba #55826

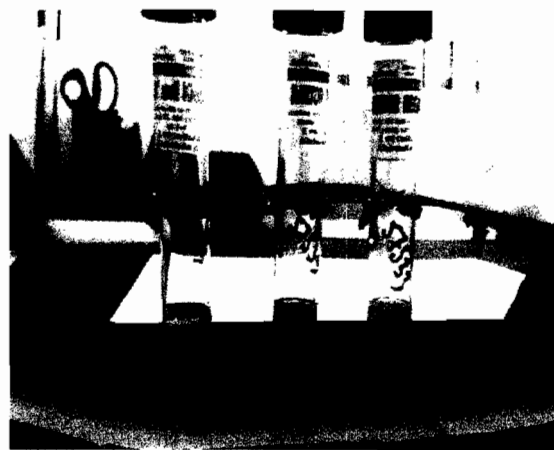


Foto #6.3: Inhibare multiplicare *K. pneumoniae* proba #57533

RO COMMERCIAL  
Societate  
Comerciala  
1  
0.2.

### EXEMPLUL 7

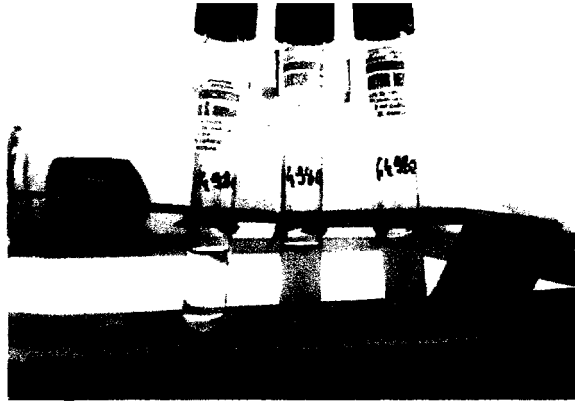


Foto #7.1: Inhibare multiplicare *Staphylococcus aureus* tulpina patogenă izolată de la om, rezistentă la antibiotic



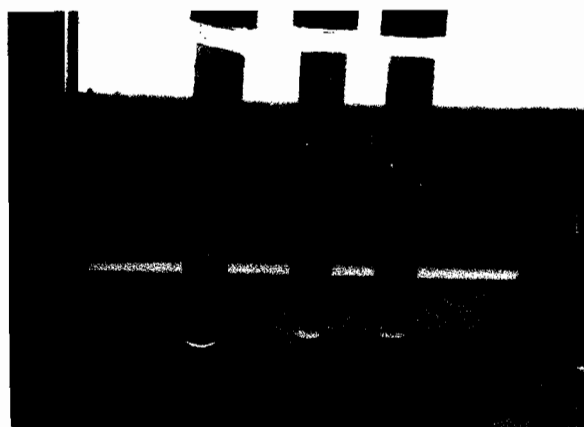


95

**EXEMPLUL 9**



**Foto #9.1: *S. aureus* ATCC 29213    *S. typhimurium* ATCC 14028**



**Foto #9.2: *E. coli* ATCC 25922**



**Foto #9.3: *Klebsiella pneumoniae* 55717    *E. coli* 56637**

SCOP  
Societate  
Comerciala

gy

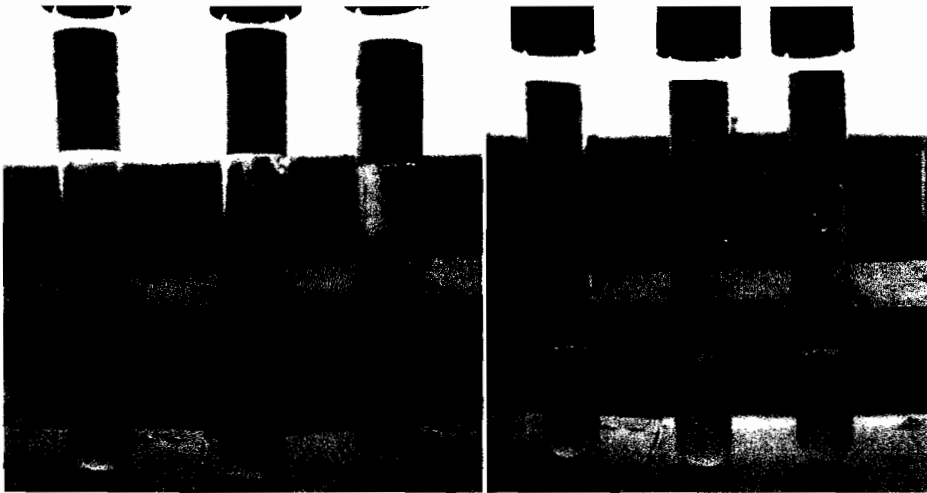


Foto #9.4: *Klebsiella pneumoniae* 55824      *Klebsiella pneumoniae* 57533

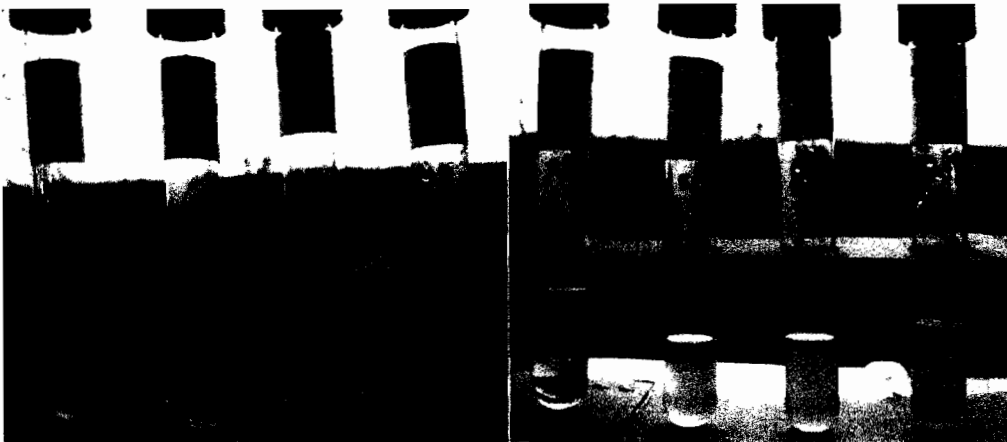


Foto #9.5: *Salmonella* spp. 57985      *Salmonella* spp. 56123

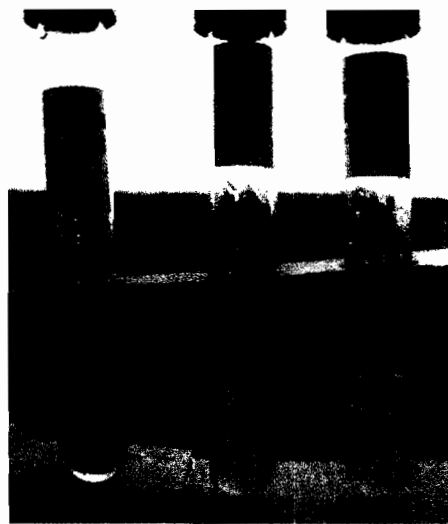


Foto #9.6: *Staphylococcus aureus* 64980



93

## EXEMPLUL 11



**Foto 11.1:** Efect inhibitor specific asupra bacteriilor *Escherichia coli* tulpina # 56637 de către IgY-specific anti *E. coli*

Stampa circulară și semnătură manuscrită.