



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00179**

(22) Data de depozit: **05/03/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/10/2022** BOPI nr. **10/2022**

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

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

(72) Inventatori:
• **PĂTRAȘCU IONEL-VICTOR**,
CALEA DOROBANȚILOR NR.134-138, 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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**E. N. LEE, H. H. SUNWOO, K. MENNINEN
AND J. S. SIM, "IMMUNOLOGY AND
MOLECULAR BIOLOGY IN VITRO**

**STUDIES OF CHICKEN EGG YOLK
ANTIBODY (IgY) AGAINST SALMONELLA
ENTERITIDIS AND SALMONELLA
TYPHIMURIUM; 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", VOL. 3,
PP. 1-8, 2010; FERNANDO LUIZ TOBIAS,
LUIZE NELI NUNES GARCIA, MILTON
MASAHIKO KANASHIRO, ENRIQUE
MEDINA-ACOSTA, JOAO GATO
BROM-DE-LUNA, CLAUDIA MARIA COSTA
DE ALMEIDA, ROMILDO ROCHA
AZEVEDO JUNIOR, MOSAR LEMOS,
OLNEY VIEIRA-DA-MOTTA, "GROWTH
INHIBITION OF STAPHYLOCOCCUS
AUREUS AND ESCHERICHIA COLI
STRAINS BY NEUTRALIZING IgY
ANTIBODIES FROM OSTRICH EGG
YOLK", BRAZILIAN JOURNAL OF
MICROBIOLOGY,
PP. 544-554, 2012**

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



RO 129677 B1

1 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.

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

5 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
7 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
9 anticorpi. Acest proces se referă la imunizarea activă a gazdei expusă la antigen. Anticorpii
11 produși în urma unui proces de imunizare activă sunt anticopri homologi la specia de animal
dată.

13 Anticorpii produși de o specie pot fi folosiți la neutralizarea efectelor antigenului
corespondent 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
15 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
17 homologi. Dacă donatorul și recipientul sunt de la diferite specii, anticoprii sunt numiți
heterologi.

19 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
21 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
23 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
25 folosite din considerente de siguranță.

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

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

31 **LeBacq-Verheyden, și colab. (LeBacq-Verheyden, și colab., Immunology 27:683**
(1974) au analizat cantitativ imunoglobulinele de pasăre. **Polson, A., și colab., (Polson, A.,**
și colab., Immunological Communications, 9:475-493 (1980)) au imunizat găini față de
33 numeroase proteine și amestecuri naturale de proteine și au detectat anticorpi IgY în
gălbenușul ouălor Fertel, R, și colab., **(Fertel, R, și colab., Biochemical and Biophysical**
Research Communications, 102:1028-1033 (1981)) au imunizat găini contra prostaglandi-
35 nelor și au decelat anticorpii în gălbenuș. Jencenius, și colab., **(Jencenius, și colab.,**
Journal of Immunological Methods, 46:363-68 (1981)) prezintă o metodă de izolare a IgG
37 (IgY) pentru a fi folosit în imunodiagnotic. **Polson, A., și colab., (Polson, A., și colab.,**
Immunological Communications, 9:475-493 (1980)) descrie anticorpi izolați din gălbenușul
39 găinilor care au fost imunizate cu o varietate de virusuri de la plante.

41 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.

43 **Polson (Polson, A., și clab., Immunological Communications, 9:475-493 (1980))**
sau Jencenius (Jencenius, și colab., Journal of Immunological Methods, 46:363-68
45 **(1981))** sugerează să se folosească anticorpii de la găini în loc de anticorpii de la mamifere
ca instrument în metodologia de diagnostic. **Polson (Polson, A., și colab., Immunological**
47 **Communications, 9:475-493 (1980))** sugerează că este posibil să se protejeze puii de

găină 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. 1
3

Jencenius (**Jencenius, și colab., Journal of Immunological Methods, 46:363-68 (1981)**) 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. 5
7

E. N. Lee, H. H. Sunwoo, K. Menninen și J. S. Sim IMMUNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY In Vitro Studies of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium, se referă la un anticorp din gălbenuș de ou (IgY) împotriva *Salmonella enteritidis* sau *Salmonella typhimurium* care a fost găsit la niveluri de activitate specifice crescute prin ELISA. Testul de inhibare a creșterii a fost realizat în mediu lichid iar activitatea specifică de legare a IgY-ului specific pentru *Salmonella* împotriva *Salmonella* a fost evaluată prin observare microscopică. Vizualizarea legării *Salmonella* de IgY au fost realizată prin microscopie de imunofluorescență și microscopie imunoelectronică. 9
11
13
15

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 se referă la anticorpii de gălbenuș de ou, numiți IgY care au fost izolați din gălbenușurile de ou ale găinilor imunizate cu *Escherichia coli* enterotoxigenă (ETEC) 987P. S-a găsit activitate specifică de legare a IgY împotriva ETEC 987P. Titrurile de celule întregi au rămas relativ ridicate în timpul perioadei de imunizare (până la 19 săptămâni). Anticorpii IgY au reacționat încrucișat cu alți membri ai Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* și *S. typhimurium* cu 28,3%, 21,1% și respectiv, 19,7%. S-a constatat că IgY specifică cu o concentrație mai mare de 0,54 mg/ml inhibă creșterea ETEC 987P într-un mediu lichid. Diferența în creșterea bacteriană între IgY specifică și nespecifică a fost de 6,1 log CFU/ml după 8 h de incubare. Activitatea specifică de legare a IgY la bacterii a fost evaluată în continuare prin microscopie imunofluorescență și microscopie imunoelectronică, arătând legarea IgY specifică la suprafața bacteriană. Observarea microscopică imunoelectronică a relevat modificări structurale pe suprafața bacteriană legată de IgY specifică. Aceasta demonstrează că activitatea de legare specifică a IgY împotriva celulelor întregi ETEC 987P a dus la inhibarea creșterii efectului ETEC 987P *in vitro*. 17
19
21
23
25
27
29
31
33

Fernando Luiz Tobias, Luize Néli Nunes Garcia, Milton Masahiko Kanashiro, Enrique Medina-Acosta, Joao Gato Brom-de-Luna, Claudia Maria Costa de Almeida, Romildo Rocha Azevedo Junior, Môsar Lemos, Olney Vieira-da-Motta Growth inhibition of Staphylococcus aureus and Escherichia coli strains by neutralizing igy antibodies from ostrich egg yolk Brazilian Journal of Microbiology (2012): 544-551, se referă la creșterea struțului la care există boli în care sunt implicate microorganismele *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*. Pentru a optimiza utilizarea subproduselor de creștere a struțului, pentru dezvoltarea anticorpilor IgY policlonali s-au utilizat ouă nefertilizate de la patru păsări selectate. Păsările au fost imunizate (200 μg/animal) cu enterotoxină C stafilococică recombinată purificată (recSEC) și recRAP sintetic, ambele derivate din *S. aureus* și recBFPA și recEspB implicate în patogenitatea *E. coli*. Au fost realizate două etape de imunizare la intervale de 21 de zile. Probele de sânge și ouă au fost colectate înainte și după etapele de imunizare. Imunoglobulinele de gălbenuș de ou au fost purificate prin precipitare. Alicote IgY purificate de 50 μL au fost incubate în 850 μL bulion BHI 35
37
39
41
43
45
47

RO 129677 B1

1 conținând inoculuri de 50 μ L a cinci tulpini de *S. aureus* și cinci tulpini de *E.coli* timp de patru
ore la 37°C. A fost evaluată inhibarea creșterii urmată de citirea fotometrică (DO550 nm).
3 Preparatul IgY de gălbenuș de ou de la păsările hiperimunizate conține anticorpi care inhibă
în mod semnificativ ($p < 0,05$) creșterea tulpinilor testate. Potențiala utilizare a anticorpilor
5 policlonali IgY de struț ca instrument de diagnosticare și terapeutic este propusă pentru
animalele bolnave.

7 Problema pe care o rezolvă invenția este de a prezenta o metodă de evaluare a
activității specifice a imunoglobulinelor de pasăre IgY specifice, extrase din gălbenușul de
9 ou provenit de la găini imunizate cu un antigen.

11 Metoda de evaluare a activității specifice a imunoglobulinelor de pasăre IgY specifice
extrase din gălbenușul de ou provenit de la găini imunizate cu un antigen, înătură dezavan-
tajele menționate prin aceea că utilizează un set de 3 tuburi astfel: un tub de reacție care
13 conține un mediu de cultură pentru multiplicarea bacteriilor izolate de la pacienți, tulpini rezis-
tente parțial sau total la antibiotice, un tub care conține mediul de cultură cu IgY martor și
15 respectiv un tub care conține mediul de cultură cu IgY specific pentru fiecare specie de bac-
terie de testat, aceste tuburi sunt însămânțate cu o cantitate egală de bacterii, aproximativ
17 5×10^5 /ml sau echivalentul a 0,055 OD₆₀₀, se incubează la temperatura de 37°C, timp de
24 h, după care se citesc rezultatele la 4, 8 și 24 h după incubare, cu ochiul liber sau
19 spectrofotometric, iar un grad de turbiditate față de proba martor sub 0,100 OD_{600 nm} indică
activitate specifică de inhibare a multiplicării bacteriene *in vitro* a IgY.

21 Prin aplicarea invenției se obține avantajul producerii unor imunoglobuline specifice
pentru care medicina nu mai are opțiuni terapeutice.

23 Invenția de față se referă la o metodă de evaluare imunologică *in vitro* a capacității
de inhibare specifică a multiplicării, bacteriilor de către imunoglobulinele specifice extrase
25 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
27 proba de testat se datorează creșterii bacteriilor în mediul de cultură cu IgY-SPF fără
anticopri specifiți antigenului dat în probele cu anticorpi specifiți, datorită inhibării multiplicării
29 bacteriilor, mediul de cultură se păstrează clar sau are o turbiditate redusă cu minimum
0,200 OD₆₀₀.

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

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

37 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
39 dat.

41 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 antineul dat.

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

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

RO 129677 B1

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 comparație cu proba martor, sub 0,100 OD ₆₀₀ .	1 3
Setul de testare specific este setul standard folosit pentru evaluarea activității de inhibare specifică a multiplicării bacteriene <i>in vitro</i> 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. Setul de testare specifică este un test monovalent și acționează asupra unui număr mare mare de epitopi (multi-valență). Setul de testare specifică evidențiază și prezența acestor epitopi (15-50%) la alte specii de bacterii. Testul evidențiază capacitatea de inhibiție a IgY-specific față de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice.	5 7 9 11
<i>Principiul metodei</i>	
În tuburile de reacție există mediul de cultură lichid pentru bacteriile care urmează să se multiplieze la temperatura de 37°C.	13
Un tub care conține glicoproteina extrasă din gălbenușul provenit de la păsări SPF.	15
Un tub cu mediul de cultură care are în componența sa imunoglobulina specifică anti specia de bacterii sau anti epitopii față de care au fost imunizate găinile.	17
Cel de al treilea tub de reacție conține mediul de cultură în care se vor multiplica bacteriile din proba de testat.	19
Fiecare tub de reacție este însământat cu o cantitate egală de bacterii, aproximativ 5 x 10 ⁵ /ml sau echivalentul a 0,055 OD ₆₀₀ . Probele se incubează la 37°C și se interpretează prin comparație, cu ochiul liber sau prin spectrofotometrie. 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.	21 23
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.	25 27
IgY-specific poate fi preparat din antigene care provin de la:	29
- o singură tulpină bacteriană;	
- un amestec din mai multe tulpini ale aceleiași specii bacteriene;	31
- 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.	33 35
<i>Prepararea mediului de cultură cu IgY SPF</i>	
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 min la 4°C. Supernatantul obținut se filtrează prin filtru de 0,45 μm (produsele care au fost liofilizate) și apoi sterilizate, prin filtru de 0,22 μm. Se repartizează câte 2 ml per tub.	37 39
<i>Prepararea mediului de cultură cu IgY-specific</i>	41
Procedura de preparare este asemănătoare atât pentru mediul de cultură cu IgY-SPF cât și pentru mediul de cultură cu IgY-specific.	43
Se amestecă 25 mg de IgY liofilizată cu mediul de cultură TSB sau bulion nutritiv. Amestecul se centrifughează 20 de min, la 1100 rpm, la temperatura de 22°C. După centrifugare, lichidul supernatant se sterilizează prin filtrare succesivă prin 0,45 μm și respectiv 0,22 μm. Produsul finit se păstrează la +4°C și se verifică sterilitatea acestuia.	45 47

RO 129677 B1

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

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

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

9 Setul este conceput pentru unică folosință, iar după utilizare se degradează termic.
10 Conținutul setului de testare specific (foto 1)

11 1. Mediu de cultură pentru multiplicarea bacteriilor pentru testare (9,9 ml).

12 2. Mediu de cultură cu IgY SPF = martor (2 ml).

13 3. Mediu de cultură cu IgY-specific pentru fiecare specie de bacterii în parte (2 ml).

14 4. Instrucțiuni de folosire

15 Protocolul de lucru.

16 a. Cultură bacteriană de 24 h, izolată și caracterizată, se poate folosi ca atare sau se
17 poate multiplica în mediul din tubul 1 cu etichetă neagră. În acest scop în 9,9 ml de mediu
18 de cultură se pun 0,1 ml din cultură bacteriană de testat. Suspensia bacteriană se omogeni-
19 zează și se citește densitatea optică la un spectofotometru cu filtru 600 nm. Densitatea
20 optică trebuie să fie aproximativ 0,05 OD 600 nm.

21 b. Din tubul de diluție se repartizează steril câte 2 ml de suspensie bacteriană în
22 fiecare din celelalte 2 tuburi din trusă. Probele se incubează la 37°C cu agitare permanentă.
23 Citirea rezultatelor se poate face la 4 și 8 h de incubație. Citirea finală se face la 24 h de
24 incubație. Citirea se face cu ochiul liber sau cu spectofotometru cu filtru de 600 nm.

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

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

33 În continuare se prezintă 11 exemple de realizare în legătură cu figurile care
34 reprezintă:

35 - fig. 1, determinarea efectului inhibitor al IgY cu ajutorul setului de testare asupra
36 tulpinilor bacteriene izolate de la pacienți (2013);

37 - fig. 2, decelarea efectului inhibitor al IgY anti *Staphylococcus aureus* asupra
38 multiplicării bacteriene folosind setul de testare;

39 - fig. 3, controlul activității de inhibare specifică a multiplicării bacteriilor folosind setul
40 de testare;

41 - fig. 4, controlul activității de inhibiție specifică al setului de testare specific la diferite
42 serii de IgY-specific;

43 - fig. 5, inhibarea multiplicării bacteriene folosind IgY-specific și setul de testare;

44 - fig. 6, testarea concomitentă a trei tulpini diferite de *Klebsiella pneumoniae* izolate
45 de la pacienți din SVB, tulpini rezistente la antibiotice;

46 - fig. 7, controlul efectului de inhibiție a multiplicării bacteriilor folosind IMB-specific
47 anti *S. aureus*;

RO 129677 B1

- fig. 8, inhibarea multiplicării salmonelelor de către IgY anti *S. enteritidis* și IgY anti *S. typhimurium*; 1

- fig. 9, testarea inhibării multiplicării bacteriene sub influența IgY specific a tulpinilor bacteriene izolate de la pacienți și a tulpinilor de referință (ATCC); 3

- fig. 10, imagini foto pentru setul de testare specifică pentru diferite tulpini bacteriene izolate de la pacienți. 5

Exemplul 1 - Determinarea efectului inhibitor al IgY cu ajutorul setului de testare asupra tulpinilor bacteriene izolate de la pacienți (2013) 7

Tulpini patogene: *Salmonella* spp. 60269; *Salmonella* BO, 60404; *Salmonella* DO, 60185; *Salmonella* DO, 59924; *Salmonella* DO, 59876; *Klebsiella pneumoniae* (FSBL, MBL) rezistente la antibiotice. 9

Seturi de evaluare *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*. 11

Executarea testului: 13

- se fac pasaje de 24 h 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 setului de testare; 15

- se prelevează steril câte 0,3 ml din fiecare tub și se citesc valorile extincțiilor la spectrofotometru la 600 nm; 17

- se termostatează la 37°C; 19

- după 4 h se apreciază turbiditatea tuburilor cu ochiul liber și se pot preleva câte 0,3 ml pentru a se face citirea la spectrofotometru (dacă este posibil). 21

Rezultate citiri la OD₆₀₀ nm 23

Proba/Timp	Momentul 0	La 4 h
60269 - <i>Salmonella</i> BO		
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
60404 - <i>Salmonella</i> DO		
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
60185 - <i>Salmonella</i> DO		
Martor pozitiv	0,056	0,220
Martor negativ	0,066	0,292
TgY <i>Salmonella enteritidis</i>	0,063	0,062
IgY <i>Salmonella typhimurium</i>	0,061	0,079

RO 129677 B1

Tabel (continuare)

Proba/Timp	Momentul 0	La 4 h
59924 - <i>Salmonella DO</i>		
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
59876 - <i>Klebsiella pneumoniae</i> (FSBL , MBL)		
Martor pozitiv	0,115	0,504
Martor negativ	0,172	0,775
IgY <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 2 - Decelarea efectului inhibitor al IgY anti *Staphylococcus aureus* asupra multiplicării bacteriene folosind setul de testare specific

Tulpina bacteriană *Staphylococcus aureus* 64980 (MRSA)/06.01.2014, set de testare specific.

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

Rezultatele citirii spectofotometrice la OD 600 nm și sunt reprezentate în graficele din fig. 2.

Proba/Timp	Momentul 0	La 4 h	La 24 h
Seria 3 din (16.10.2013) - <i>Staphylococcus aureus</i>			
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	

RO 129677 B1

Graficul 2.1 din fig. 2: Martor fără IgY (mediul de cultură). Coloanele albastre valorile OD la 0 h și coloanele roșii valorile la 4 h. În acest experiment s-au făcut câte trei replicare pentru reproductibilitate. 1
3

Graficul 2.2. din fig. 2, Martor care conține mediul de cultură cu IgY SPF fără anticorpi specifici anti *S. aureus*. 5

Graficul 2.3 din fig. 2: Rezultate comparative

În care: 7

1. Martor reprezentat de mediul de cultură însămânțat la 0 și 4 h
2. Martor care conține IgY SPF 9
3. Probă IgY-specific anti *S. aureus*

Exemplul 3 - Controlul activității de inhibare specifică a multiplicării bacteriilor folosind setul de testare 11

Tulpini bacteriene patogene, rezistente la antibiotic: *E. coli* (27104), *Staphylococcus aureus* 64980 (MRSA)/12.12.2013, *Salmonella enteritidis* 60269, *Salmonella typhimurium* 56123, *Klebsiella pneumoniae* 59876; 13
15

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

Rezultate (Grafic 3.1 din fig. 3) 17

Tulpini/IMB	IgY	Martor pozitiv	Martor negativ	Timp	
<i>E. coli</i> 27104 (foto 3.1)	0,090	0,087	0,146	0 ore	19
	0,088	0,776	0,814	4 ore	21
<i>S. aureus</i> 64980 (foto 3.4 și 3.6)	0,103	0,117	0,161	0 ore	23
	0,105	0,249	0,278	4 ore	25
<i>S. enteritidis</i> 60269 (foto 3.2)	0,090	0,107	0,144	0 ore	27
	0,110	0,821	1,016	4 ore	27
<i>S. typhimurium</i> 56123 (foto 3.3)	0,091	0,101	0,150	0 ore	29
	0,096	0,521	0,579	4 ore	31
<i>K. pneumoniae</i> 59876 (foto 3.5)	0,091	0,103	0,145	0 ore	33
	0,123	0,580	0,710	4 ore	33

Graficul 3.1, în care: 35

1. *E. Coli*; 37
2. *Staphylococcus aureus*;
3. *Salmonella enteritidis*; 39
4. *Salmonella typhimurium*;
5. *Klebsiella pneumoniae* 41

Coloanele colorate în albastru reprezintă valorile probelor cu IgY specific. 43

Coloanele roșii și verzi reprezintă martorii de reacție.

De la stânga la dreapta, prima coloană reprezintă citirile la 0 h, iar a doua coloană la 4 h. 45

RO 129677 B1

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

3 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
5 administra pacientului imediat după prelevarea probeleor, 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
7 chiar 96 h. Între timp se face tratamentul cu IgY polivalent. Amestecul se va face în funcție
de experiența celor din spital și de frecvența reală a infecțiilor bacteriene (primele 7, 8 sau
9 10 tulpini bacteriene).

11 Acest IgY bacterian se poate oferi în iaurt fiecărui pacient care se internează în spital,
preventiv ca să se evite infecțiile intraspitalicești.

13 Se poate administra și în clinicile cu copii bolnavi de cancer unde cel mai frecvent se
fac infecții intraspitalicești.

15 Foto 3.6: Tubul nr. 4 (dreapta) este cu IgY-specific anti *S. aureus*. Restul tuburilor
sunt martor. Se vede clar, la 4 h 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 h. În plus
17 pentru setul de testare se poate folosi o cultură de bacterii la 4 h de incubație la 37°C în
acest caz timpul de control se scurtează de la 48 h la 8 h!!! În plus setul de poate lăsa la
19 incubație la 37°C până la 24 h pentru o confirmare finală.

21 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 spectrofoto-
metru. În cazul citirii de la momentul 0, valoarea medie a rezultatelor obținute la spectrofoto-
23 metru 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 h a generat următoarele rezultate: martor negativ 0,547,
25 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.

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

29 **Exemplul 4** - Controlul activității de inhibiție specifică a setului de testare la diferite
serii de IgY-specific

31 IgY anti *Staphylococcus aureus* seriile etalon 02, 03, 04 și 05 (graficul 4.1-4.6 din
fig. 4)

33 Proba/ 35 Timp	Martor IgY SPF	Martor mediu + S.a.	IgY S.a. Etalon Romvac	IgYS.a seria 02	IgY S.a. seria 03	IgY S.a. seria 04	IgY S.a. seria 05
37 0 h	0,102	0,145	0,085	0,128	0,091	0,092	0,089
4 h	0,130	0,150	0,089	0,127	0,120	0,092	0,088
39 24 h	1,037	1,283	0,812	0,955	0,088	0,093	0,089

41 În graficul 4.1 din fig 4: Martor IgY SPF (linia albastră) în comparație cu IgY-specific
43 seria 03/2013. Linia albastră este graficul creșterii la 24 h de incubație la 37°C. Linia roșie
demonstrează inhibiția produsă de IgY anti *S. aureus* seria 03/2013.

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

RO 129677 B1

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

Exemplul 5 - Inhibarea multiplicării bacteriene folosind IgY-specific și setul de testare specific

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 h.

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

Staphylococcus aureus ATCC 29213

OD 600 (densitate optică) pe verticală

Timpul exprimat în ore pe orizontală

1 = momentul zero de incubație la +37°C

2 = 4 h de incubație la 37°C

3 = 8 h de incubație la 37°C

4 = 24 h de incubație la 37°C

Linia albastră: 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

Linia albastră: IgY specific anti *E. coli*

Linia roșie: IgY SPF nespecific

Linia verde: mediul de cultură cu *E. coli*

Linia albastră: IgY specific anti *S. typhimurium*

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

Linia verde: 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 h se vede că germenii încep să se multiplie 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 de testare specific.

5. Inhibiția specifică a multiplicării bacteriilor se poate citi și cu ochiul liber la 4 h de incubație. În aceste condiții se permite specialistului să aibă o intervenție mai rapidă asupra pacientului.

Exemplul 6 - Testarea concomitentă a trei tulpini diferite de *Klebsiella pneumoniae* izolate de la pacienți din SVB, tulpini rezistente la antibiotice

Setul de testare specific anti *Klebsiella pneumoniae* este prezentat în fig. 6. în care:

Linia albastră: IgY specific anti *Klebsiella pneumoniae*

Linia roșie: IgY SPF martor

Linia: mediul de cultură lichid însămânțat

Comentarii:

RO 129677 B1

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

3 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
5 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
7 intervalele de administrare a IgY.

**Exemplul 7 - Controlul efectului de inhibiție a multiplicării bacteriilor folosind setul de
9 testare specific anti *S. aureus***

Tulpina patogenă izolată de la om, rezistentă la antibiotic *Staphylococcus aureus*
11 64980

IgY-specific anti *S. aureus* este prezentată în Fig. 7.

13 Linia albastră: IgY specific anti *S. aureus*

Linia roșie: IgY SPF mator pozitiv

15 Linia verde: mediu de cultură lichid

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

19 **Exemplul 8 - Inhibarea multiplicării salmonelelor de către IgY anti *S. enteritidis* și IgY
anti *S. typhimurium***

21 setul de testare cu IgY anti *Salmonella enteritidis* și IgY anti *Salmonella typhimurium*
Salmonella sep. 57685 este prezentată în Fig. 8.

23 Se constată diferențe antigenice între *S. enteritidis* și *S. typhimurium*, privind
inhibarea multiplicării *in vitro*. Test efectuat cu setul de testare specific. Inhibiția specifică a
25 multiplicării bacteriilor a fost totală la *Salmonella spp.* 56123 și parțial la *Salmonella spp.* sau
Salmonella typhimurium.

27 **Exemplul 9 - Testarea inhibării multiplicării bacteriene sub influența IgY specific a
tulpinilor bacteriene izolate de la pacienții și a tulpinilor de referință (ATCC)**

29 Materiale și metode

1. Materiale

31 Pipete de unică folosință de 1 ml

Tuburi de unică folosință de 14 ml

33 Plăci ELISA

Pipete monocanal

35 Vârfuri sterile de 1000 μl

2. Substanțe și reactivi:

37 Bulion nutritiv Hi Media lot 0000162760

Setul de testare specific

39 3. Tulpini bacteriene

Staphylococcus aureus 64980 (MRSA)

41 *E. coli* 56637 (ESBL)

Klebsiella pneumoniae 55717

43 *Klebsiella pneumoniae* 55826

Klebsiella pneumoniae 57533

45 *Salmonella sp.* DO 56123

Salmonella sp. BO 57985

47 *Salmonella sp.* DO 57415

RO 129677 B1

4. Tulpini de colecție	1
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	3
<i>E. coli</i> ATCC 25922	
5. IgY-specific liofilizat	5
IgY anti <i>St. aureus</i> (seria 03/16.10.2013)	
IgY and <i>S. typh</i> + <i>K. pneumoniae</i> (seria 01/12.11.2013)	7
IgY anti <i>E. coli</i> - <i>S. Enteritidis</i> (seria 01/12.11.2013)	
Rezultate:	9

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	0,113	0,834	0,326	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

RO 129677 B1

Tabel (continuare)

Tulpini/IMB	Ore incubare	IgY specific	IgY SPF	Mediu + cultură	Interpretare
<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</i> spp. IgY anti <i>S. ententidis</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	0,879	0,746	pozitiv
	8	0,189	1,094	1,002	pozitiv
	24	0,270	1,059	1,009	pozitiv
<i>Salmonella</i> spp. IgY anti anti <i>S. ententidis</i> 56123	0	0,100	0,160	0,108	0
	4	0,095	0,679	0,461	pozitiv
	8	0,094	0,969	0,805	pozitiv
	24	0,088	0,986	1,273	pozitiv
IgY anti <i>S. typhimurium</i>	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

Concluzii:

1. IgY-specific preparat conform tehnologiei descrise în Cererea de brevet nr. A/00156/25.02.2014 inhibă specific multiplicarea bacteriilor.

2. Setul de testare specific permite evaluarea activității IgY-specific față de tulpinile bacteriene standard ATCC.

3. Setul de testare specific acționează specific asupra tulpinilor bacteriene patogene rezistente la antibiotice izolate de la pacienți.

4. Utilizarea setul de testare specific permite evaluarea cu ochiul liber sau spectrofotometrică a activității IgY-specific după 4 h de incubație la 37°C.

5. Setul de testare specific poate fi folosit pentru stabilirea conduitei terapeutice după 4 h 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 setul de testare specific.

RO 129677 B1

Exemplul 10 - Inhibarea *in vitro* a multiplicării bacteriilor^{a)} folosind setul de testare specific

Specie bacteriană	Experiment	Izolat	Setul de testare specific	Inhibare ^{c)}
<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>S. aureus</i>	++++
<i>Escherichia coli</i>	13	566123	anti <i>E. coli</i>	++++

^{a)}Tulpini bacteriene izolate de la pacienți. Tulpini rezistente la toate antibioticele folosite în spital

^{b)}Set de control specific al inhibării multiplicării bacteriene *in vitro*

^{c)}Evaluarea inhibării se face prin comparare cu tuburile martor din setul de testare specific. 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 h.

RO 129677 B1

1 **Exemplul 11** - Determinarea efectului inhibitor specific asupra bacteriilor *Escherichia*
2 coli tulpina 56657 pe către IgY specific anti *E. coli*, folosind setul de testare specific (foto
3 11.1)

4 Procedura de lucru este cea recomandată.

5 Linia albastră: IgY specific anti *E. coli*

6 Linia verde: Mediul de cultură lichid

7 Linia roșie: IgY SPF martor

8 6. IgY SPF liofilizat

9 (seria 001/08.10.2013)

11 PREGĂTIREA TULPINILOR BACTERIENE

12 1. Se ia fiecare proba și se trec cu ansa din mediu solid în mediu lichid.

13 2. Se termostatează 24 h la 37°C.

14 3. După 24 h se face o citire la spectrofotometru (600 nm) din fiecare tulpina bacteriană.

15 4. Se ajustează cultură bacteriană la DO de 0,05 nm.

16 5. Se adaugă 20% glicerina și se conservă la -70°C în tuburi de crioconservare de
17 3,6 ml.

18 6. Se prepară din fiecare tulpină bacteriană o cultură de 24 h din care se repartizează
19 0,1 ml în fiecare tub de cultură din setul de testare specifică.

20 Etapă de lucru:

21 1. Se pregătesc setul de testare specific conform instrucțiunilor de folosire.

22 2. Se repartizează 2 ml din cultură bacteriană (pct. 1.6)

23 3. Probele se incubează la 37°C timp de 24 h cu agitare permanentă.

24 4. Se fac citiri cu ochiul liber la 0, 4 și la 8 h sau cu un spectrofotometru (600 nm).

25 5. Se consideră proba pozitivă când IgY-specific inhibă parțial sau total multiplicarea
26 bacteriilor la 4, 8 și 24 h de cultivare. Se poate evalua ca proba pozitivă când la 4 h de
27 incubație se constată că în cultură cu IgY-specific, mediul este limpede iar în probele martor
28 se constată turbiditate produsă de creșterea bacteriilor. Turbiditatea produsă de creșterea
29 bacteriilor poate fi evaluată la intervalele de 4, 8 și 24 h de incubație.

30 IgY-specific se poate administra după ce se face controlul de la 4 h de incubație,
31 atunci când există o diferență percepută prin examen cu ochiul liber sau prin citire
spectrofotometrică.

RO 129677 B1

Revendicări

1. Metodă de evaluare a activității specifice a imunoglobulinelor de pasăre IgY specifice extrase din gălbenușul de ou provenit de la găini imunizate cu un antigen, **caracterizată prin aceea că**, utilizează un set de 3 tuburi astfel: un tub de reacție care conține un mediu de cultură pentru multiplicarea bacteriilor izolate de la pacienți, tulpini rezistente parțial sau total la antibiotice, un tub care conține mediul de cultură cu IgY martor și respectiv un tub care conține mediul de cultură cu IgY specific pentru fiecare specie de bacterie de testat, aceste tuburi sunt însămânțate cu o cantitate egală de bacterii, aproximativ 5×10^5 /ml sau echivalentul a 0,055 OD₆₀₀, se incubează la temperatura de 37°C, timp de 24 de ore, după care se citesc rezultatele la 4, 8 și 24 de ore după incubație, cu ochiul liber sau spectrofotometric, iar un grad de turbiditate față de proba martor sub 0,100 OD_{600 nm} indică activitate specifică de inhibare a multiplicării bacteriene *in vitro* a IgY. 13
2. Metoda conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, mediul de cultură cu IgY specific steril se prepară dintr-o suspensie IgY cu mediu de cultură tip TSB sau bulion nutritiv, cu centrifugarea amestecului la 1100 rpm, timp de 20 min la 4°C, filtrarea prin filtru de 0,45 microni și sterilizare, respectiv, mediul de cultură cu IgY-specific steril se prepară în aceleași condiții. 17
3. Metoda conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, anticorpi heterologi sunt obținuți prin purificare din oul păsărilor *Gallus domesticus* imunizate cu respectivul antigen. 21
4. Metoda conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, respectivul IgY-specific este preparat din antigene care provin dintr-o singură tulpină bacteriană, sau un amestec de tulpini bacteriene rezistente parțial sau total la antibiotice ale aceleași specii bacteriene sau specii diferite. 25

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

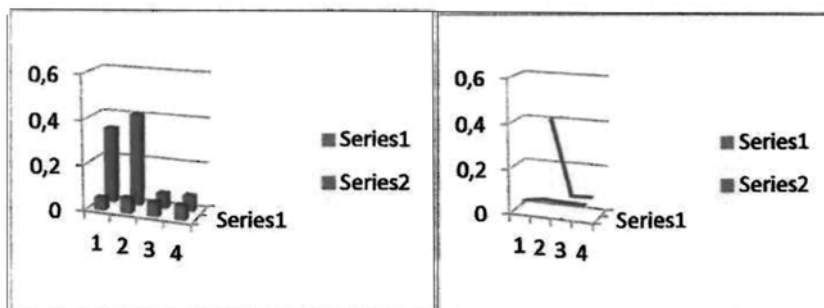
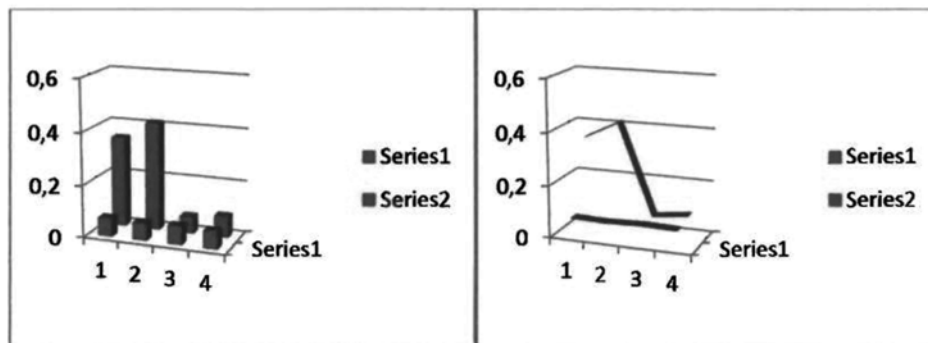


Fig. 1

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

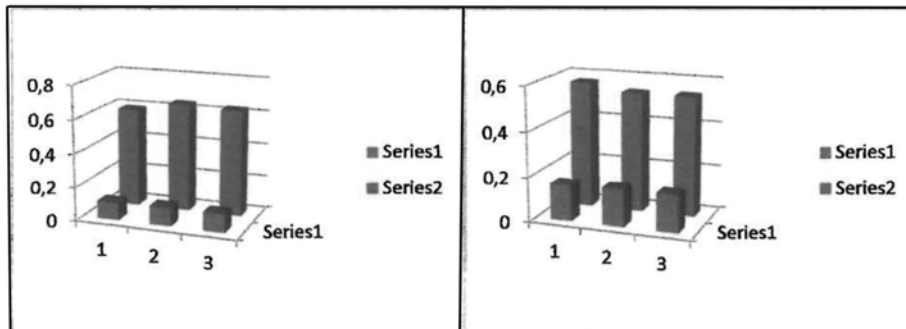
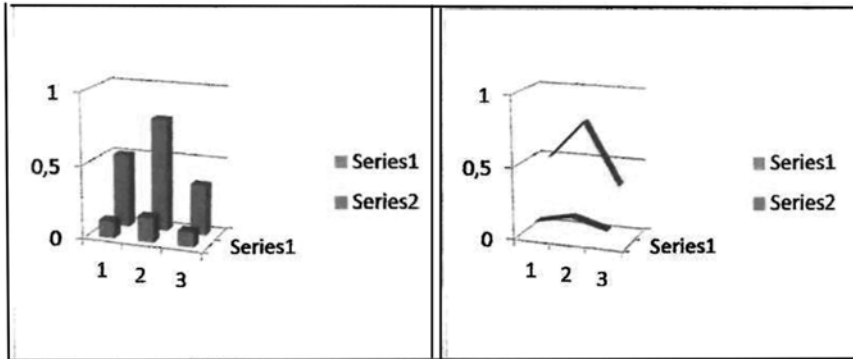
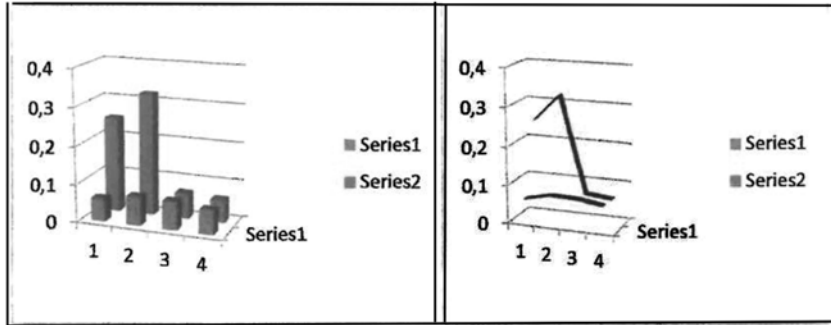


Fig. 2

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

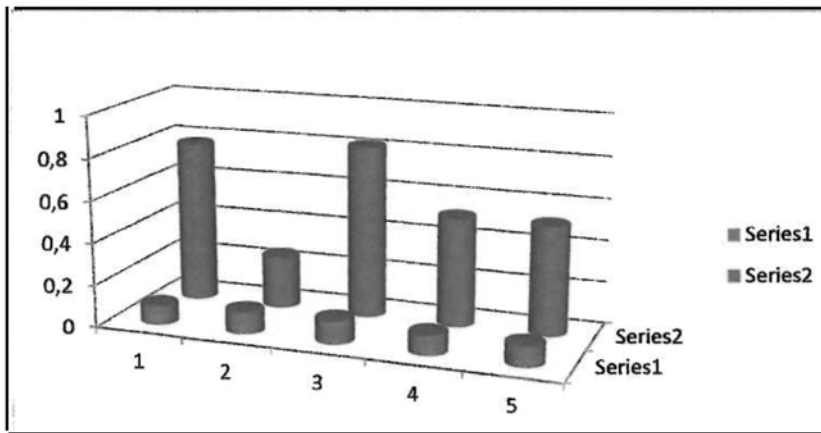
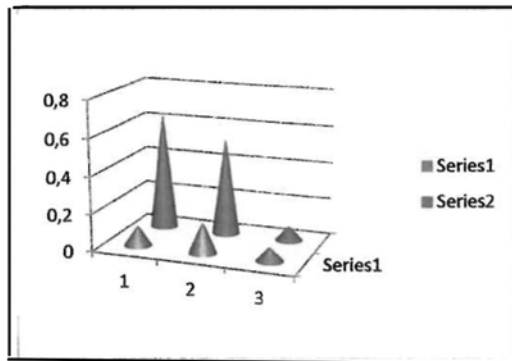


Fig. 3

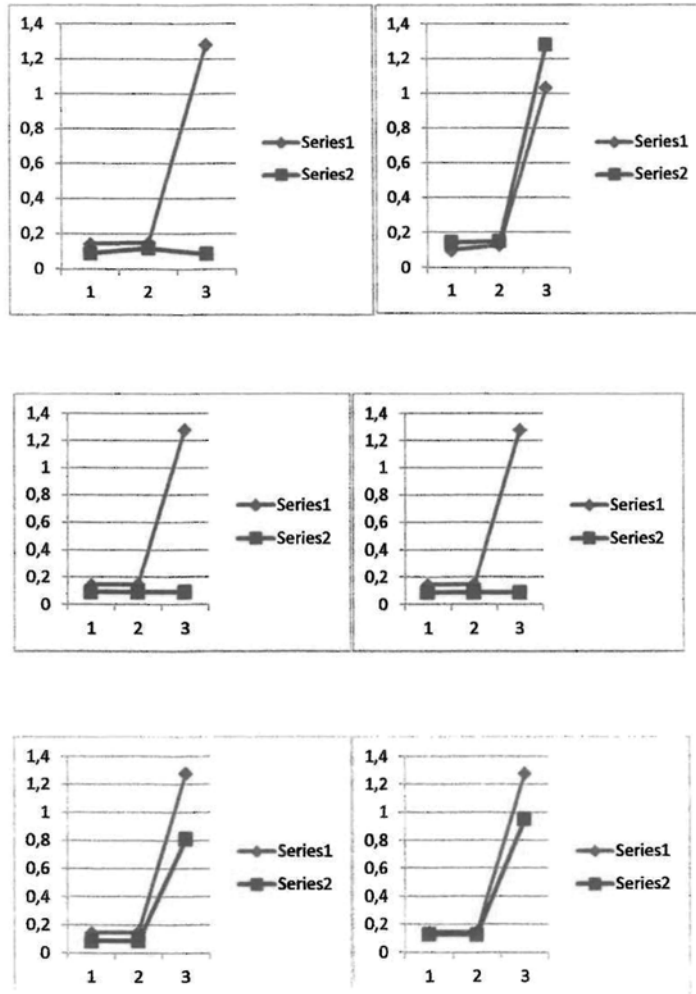


Fig. 4

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

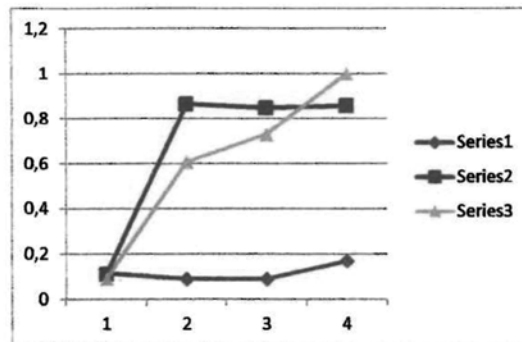
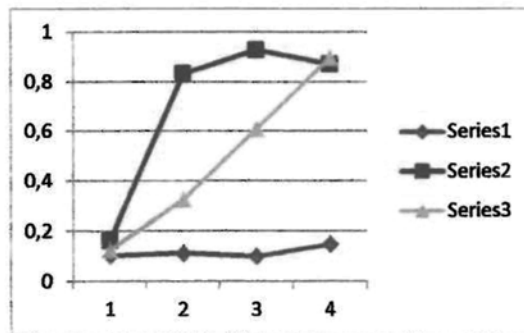
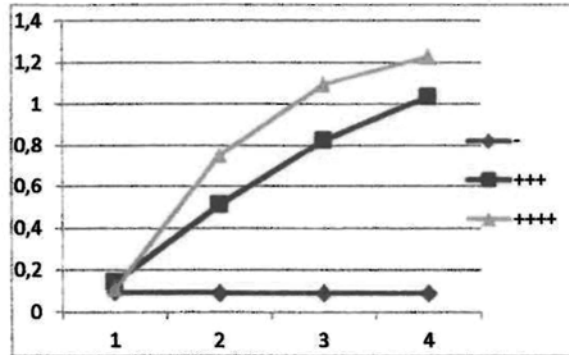


Fig. 5

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

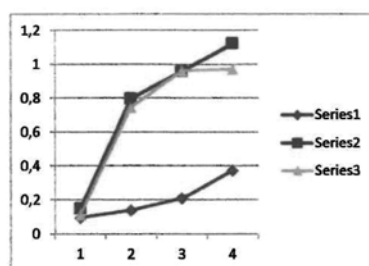
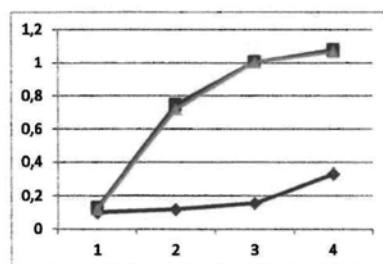
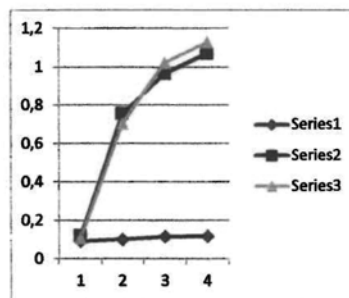


Fig. 6

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

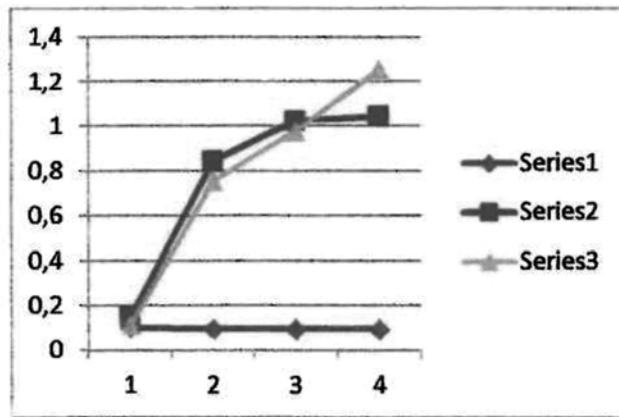


Fig. 7

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

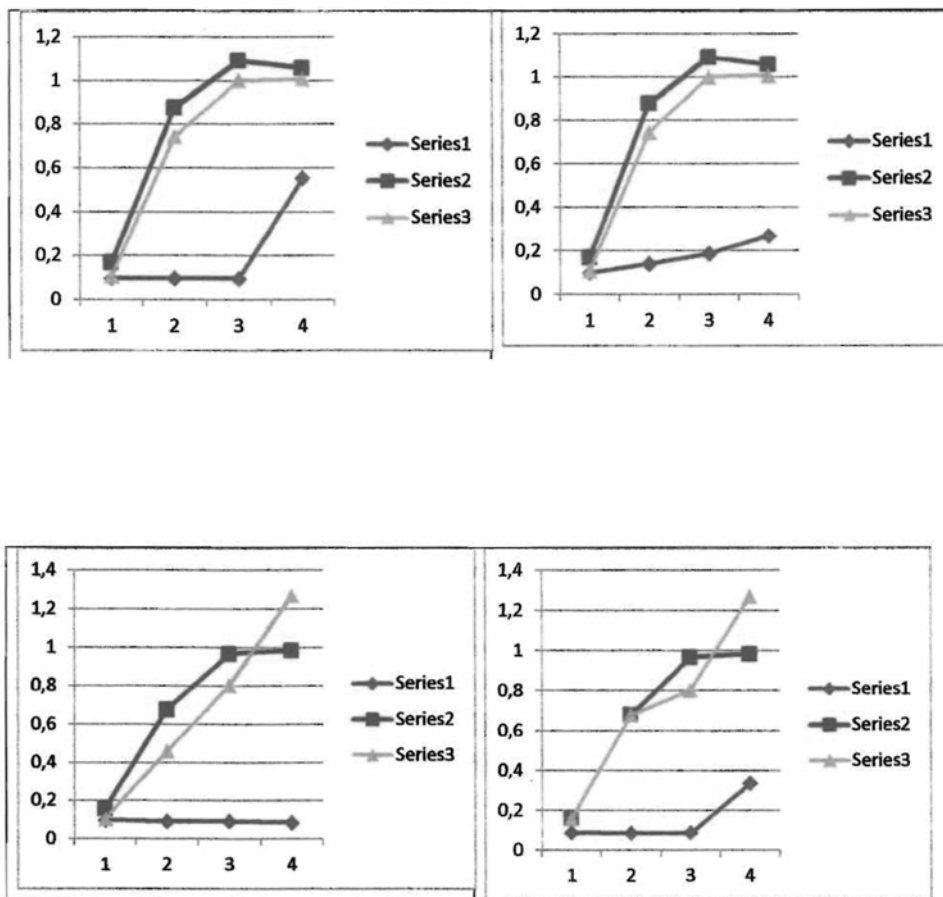


Fig. 8

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

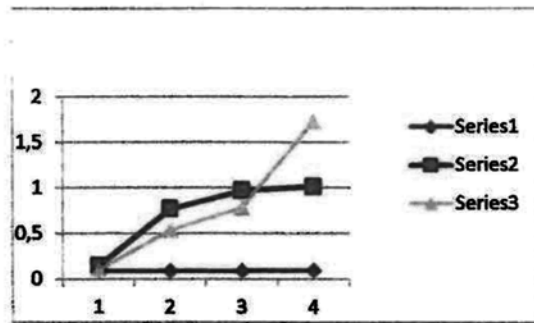


Fig. 9

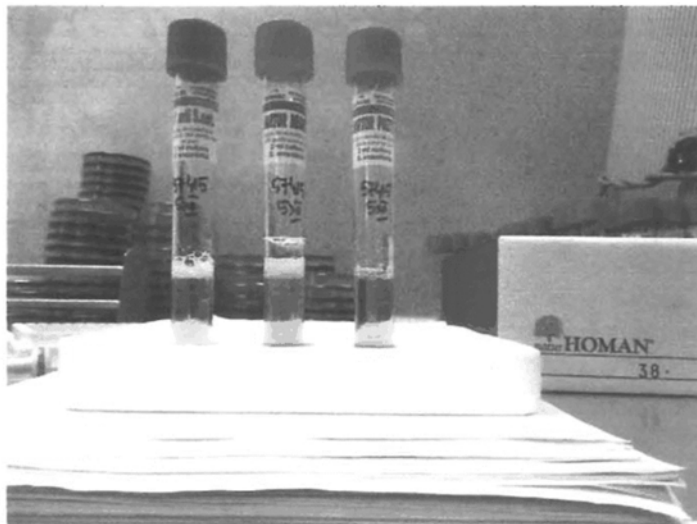


Fig. 10

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

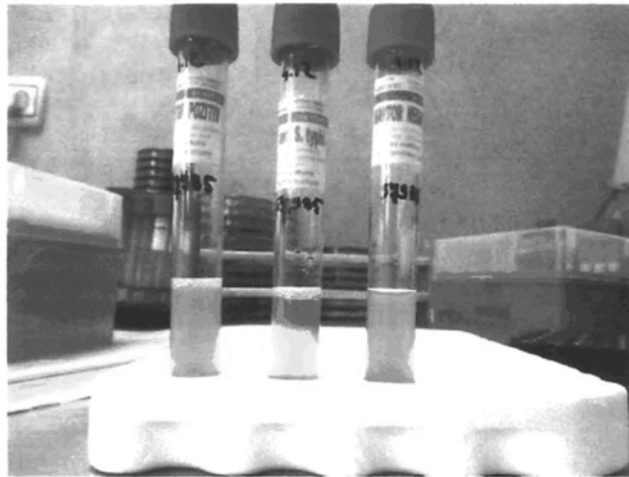
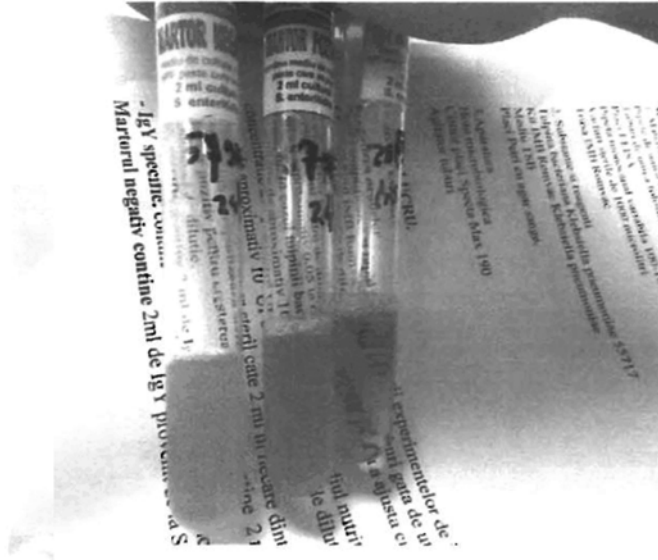


Fig. 10 (continuare)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01),

C07K 16/02 (2006.01)

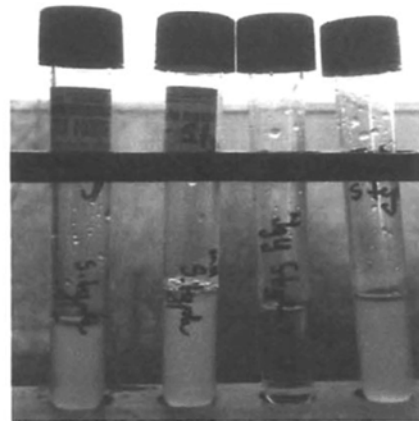
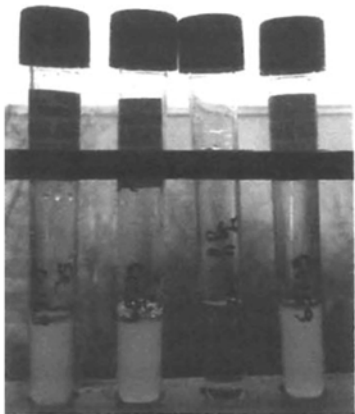
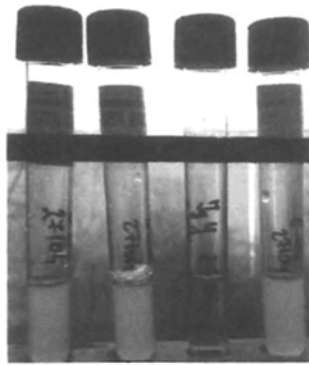


Fig. 10 (continuare)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

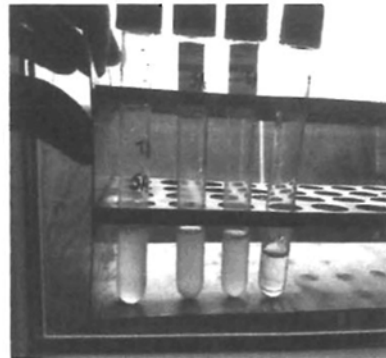
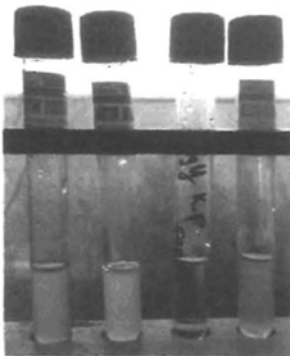
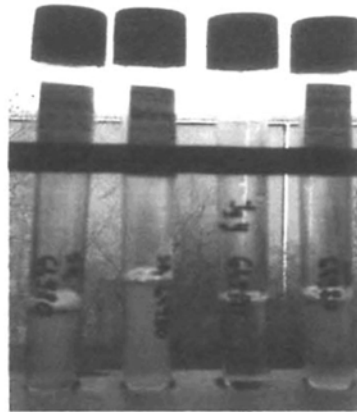


Fig. 10 (continuare)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

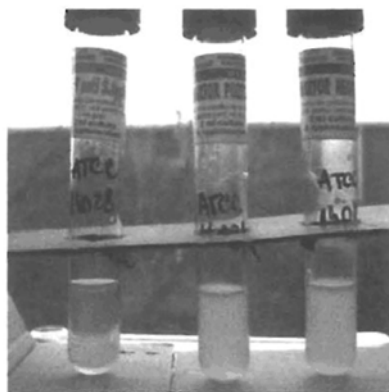
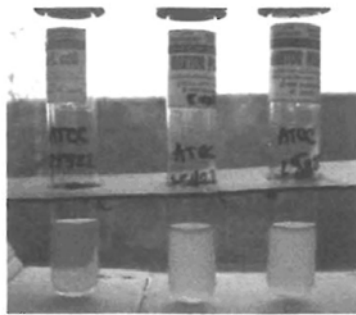
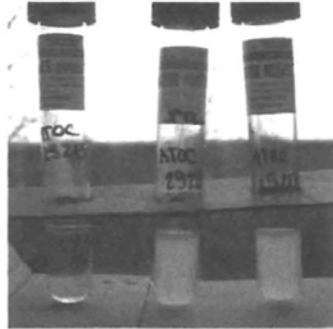


Fig. 10 (continuare)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

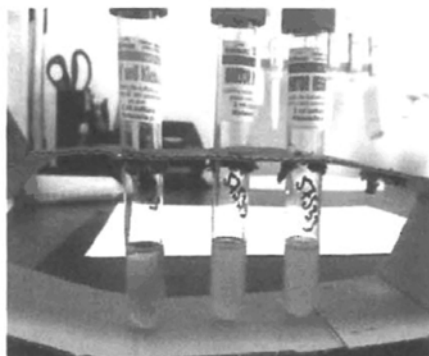
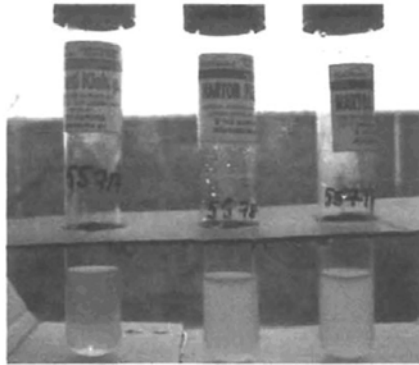


Fig. 10 (continuare)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01),

C07K 16/02 (2006.01)



Fig. 10 (continuare)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)

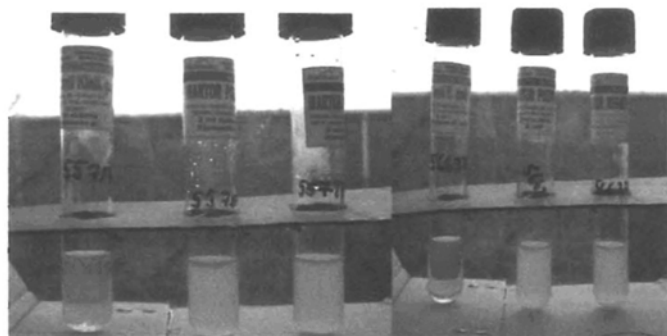
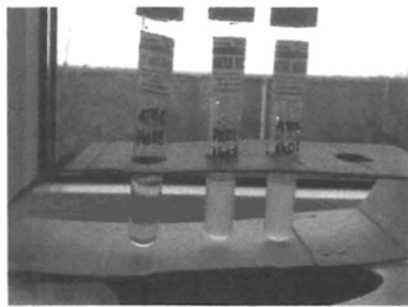
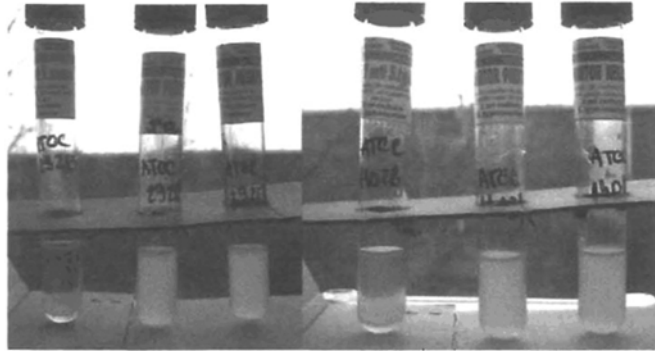


Fig. 10 (continuare)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53^(2006.01),

C07K 16/02^(2006.01)

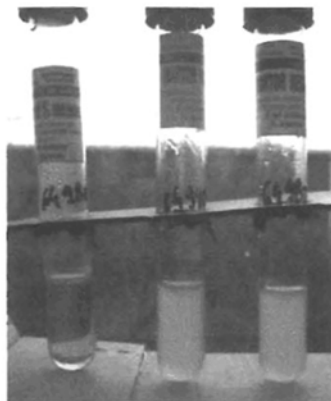
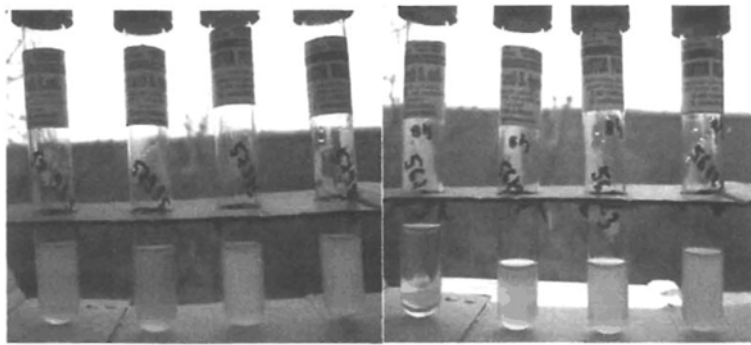
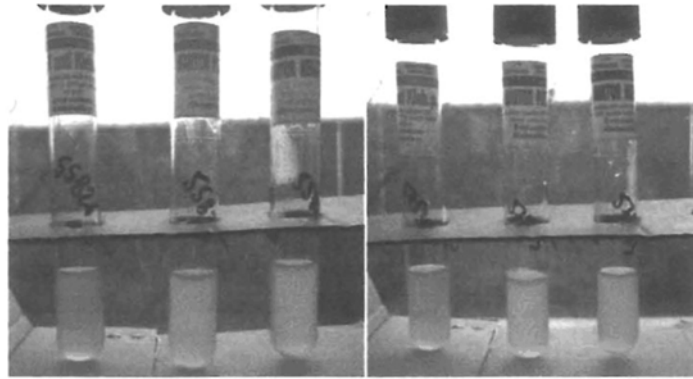


Fig. 10 (continuare)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

C07K 16/02 (2006.01)



Fig. 10 (continuare)



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 450/2022