



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00653**

(22) Data de depozit: **28.08.2014**

(41) Data publicării cererii:  
**27.02.2015** BOPI nr. **2/2015**

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

(72) Inventatori:  
• **PĂTRAȘCU IONEL VICTOR**,  
CALEA DOROBANȚI NR. 136-138, AP. 3,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• **CHIURCIU VIORICA**, STR. CIOCÂRLIEI  
NR. 32, BL. 24, AP. 36, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• **CHIURCIU CONSTANTIN**,  
STR. MIHAI BRAVU NR. 17, AFUMAȚI, IF,  
RO;  
• **OPORANU MARIANA**, DRUMUL TABEREI  
NR. 92, BL. C7, SC. F, AP. 233,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• **TOPILESCU GEORGIANA**,  
STR. MAIOR VASILE BĂCILĂ NR. 13,  
BL. 19, AP. 63, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,  
RO

(54) **PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OVOTRANSFERINEI  
MODERNE (OTF-M)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de producere a ovotransferinei specifice OTF-M pentru un antigen țintă cu aplicații în medicină. Metoda conform invenției constă în imunizarea gănilor ouătoare cu un antigen format dintr-un amestec de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice, izolarea albușului din ouăle care provin de

la găinile imunizate, diluarea acestuia în raport de 1:1 cu apă deionizată, ajustarea pH la 5, precipitarea în două etape cu sulfat de amoniu și acid citric, urmată de dializă și liofilizare.

Revendicări: 6

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## DESCRIEREA INVENȚIEI

### Titlul

## PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OVOTRANSFERINEI MODERNE (OTF-M)

### DOMENIUL TEHNIC

Imunologie, medicină, tratamente preventive, aplicații în biotehnologie.

Prezenta invenție descrie o metodă de producere a ovotransferinei specifice (OTF-M) pentru un antigen țintă. Ouăle din care se extrage ovotransferina specifică provin de la păsări (*Gallus domesticus*) imunizate cu antigene preparate din bacterii, virusuri, ciuperci, paraziți, venin, alergeni. Prezenta invenție se referă la prepararea ovotransferinelor specifice folosind bacterii rezistente la antibiotice izolate de la pacienți cu semne clinice internați în spitalele din România. Invenția se referă la prepararea unor ovotransferine specifice monovalente sau polivalente preparate din oua provenite de la păsări (*Gallus domesticus*) imunizate cu un antigen monovalent sau cu unul preparat din mai multe specii de bacterii. Prezenta invenție se referă la prepararea ovotransferinei specifice față de antigenele preparate din bacterii  $\beta$ -lactam și din alte tulpini de bacterii gram pozitive rezistente la antibiotice.

### PREZENTAREA STADIULUI TEHNICII INCLUSIV BIBLIOGRAFIE

Oul găinilor (*Gallus domesticus*) are o lungă istorie ca hrană. El conține o varietate de nutrienți care susțin atât viața cât și creșterea. Proteinele din ou sunt nutrienți esențiali având un echilibru perfect de aminoacizi care sunt necesari pentru construcția celulelor. Proteinele din ou sunt prezente în albuș 50% și gălbenuș 40%. Restul de proteine se găsesc în coajă și membranele oului. Pe lângă valoarea nutritivă, proteinele din ou prezintă activități biologice unice. Găinile hiperimunizate furnizează o sursă economică și specifică de imunoglobulină extrasă din gălbenuș (IgY), cu rol în prevenirea infecțiilor bacteriene, virale, micotice etc.

Proteinele din albuș, ca ovotransferina (OTF), lizozimul, avidina exercită o serie de activități biologice [1].

În urmă cu mai mult de 60 de ani, o serie de cercetători au arătat că ovotransferina este o proteină care fixează fierul, având efect bacteriostatic [26]. În dezvoltarea lor, bacteriile au nevoie de fier și, datorită proprietăților de legare, OTF este în măsură să împiedice utilizarea fierului de către bacterii [17]. OTF acționează sinergic și cu alte proteine bacteriene, ca lizozimul, prezent în cantitate mare în albuș.

Chiar și forma saturată de fier este activă, iar inhibiția rezultă din aglutinarea de către OTF a bacteriei ai cărei pereți celulari au fost scindați de către lizozim (11).

### 1. Caracteristicile ovotransferinei

Ovotransferina (OTF) sau conalbumina reprezintă glicoproteină majoră din albuș (12-15%) ce conține un singur lanț cu 686 aminoacizi, având masa moleculară de aproximativ 78 kDa. Este sintetizată în oviductul găinii și depozitată în albuș. OTF aparține familiei transferinelor care se împart în patru categorii:

- serumtransferina (punct izoelectric (pI) = 7,4), se găsește în plasmă, unde are ca principală funcție transportul fierului;
- lactoferina (pI = 8,8) se găsește în lapte și secreții la mamifere, cu rol important în apărarea imunonaturală;
- melanotransferina (pI = 6,8-7,1), proteină localizată pe suprafața celulelor din melanoame;
- ovotransferina (pI = 6,0) prezentă în albuș.

OTF cuprinde două domenii (capătul N- și C- terminal) și fiecare domeniu conține locusuri de fixare. Fiecare domeniu este împărțit în două părți, conținând 160 aminoacizi. OTF conține 15 punți disulfidice care stabilizează structura terțiară a proteinei. OTF transportă fierul, putând fixa ionii de Fe (3+) în asociere cu un anion, de obicei bicarbonat. Fiecare moleculă de OTF poate lega doi atomi de fier, strâns, dar reversibil. Cele două locusuri de legare a fierului sunt asemănătoare, dar nu identice.

Există două tipuri de ovotransferină: apo- și holo-. Apo-transferina nu conține fier, putând fi distrusă prin tratamente fizice și chimice. Holo-transferina este saturată cu fier, complexul fier-ovotransferină, fiind stabil la hidroliza proteolitică și la denaturarea termică [21].

OTF forma apo- este lipsită de culoare și ușor de distrus prin tratamente fizice și chimice, în timp ce ovotransferina care fixează Fe (forma holo-) prezintă o culoare roz și este rezistentă la hidroliza proteolitică și denaturarea termică. Deoarece majoritatea reagenților chimici și condițiilor de denaturare descresc afinitatea Fe față de OTF, este necesară o configurație spațială particulară a OTF. Fixarea Fe de OTF necesită o moleculă de  $\text{CO}_3^{2-}$  sau  $\text{HCO}_3^-$  pe atomul de  $\text{Fe}^{3+}$ . Reiter și col (1975) au arătat că bicarbonatul mai degrabă decât pH-ul este un factor esențial pentru capacitatea bacteriostatică a OTF. Pentru eliberarea  $\text{Fe}^{3+}$  din ovotransferina ferică *in vitro*, este necesar un simplu anion (pirofosfat, sulfat sau clor). Fierul ar putea fi eliberat din proteina care îl transportă la pH scăzut (pH = 4,5) în prezența excesului de citrat de sodiu (17). OTF este similară ca structură și funcție lactoferinei din lapte.

O fracțiune din sângele uman exercită aceeași acțiune de fixare a fierului ca ovotransferina. Această proteină din ser a fost numită siderafilină, iar astăzi este denumită transferina umană. Ovotransferina și transferina din sânge au aceeași compoziție în aminoacizi și în conținutul de carbohidrați [20].

Ovotransferina este glicozilată și conține un singur lanț glican (compus din manoză și reziduuri de N-acetilglucozamină) în domeniul C-terminal. Ovotransferina este o glicoproteină neutră sintetizată în oviductul găinii și depozitată în albușul ouălor. Prezintă două domenii similare în regiunile H și C terminale, fiecare fixând foarte strâns și specific un atom de  $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Al}^{+++}$ . Recunoașterea moleculelor de transferină este mediată de receptorii existenți pe membrană.

Transferina umană are la capătul N-terminal, doi compuși N-glican, în timp ce OTF are un singur lanț N-glican. Asemănările structurale semnificative între lactoferină și ovotransferină, justifică rolul lor biologic asemănător. [24]

OTF aparține grupului de proteine numite metaloproteinaze care induc formarea de compuși responsabili de șocul termic. Datorită acestei caracteristici, OTF poate fi utilizată în creme și unguente de protecție contra stresului la frig sau la alți factori de mediu.

### **OTF – un imunomodulator ideal**

Activitatea OTF demonstrează că rolul moleculei este strâns legat de importanța fierului. Deficiența fierului, anemia, este o problemă comună atât pentru oameni, în special în țările în curs de dezvoltare, cât și pentru animale în primele săptămâni de viață. În forma ionică, fierul

în cantitate prea mare poate deveni un pericol pentru organism. El este un element esențial necesar dezvoltării bacteriilor patogene și celulelor tumorale. Celulele sistemului imun protejează țesuturile împotriva toxicității, jucând un rol primordial în controlul concentrației acestui metal. Existența de proteine care leagă fierul, ca transferina și ovotransferina, capabile să neutralizeze fierul, duc la eliminarea toxicității metalului prin legarea acestuia [12].

Imunitatea mediată celular și distrugerea bacteriilor la nivel intracelular de către leucocitele polimorfonucleare sunt diminuate la indivizii cu deficiență de fier. Aceasta se datorează lipsei fierului necesar proliferării celulelor, sintezei ADN-ului și activității enzimelor dependente de fier [20].

Bullens (1983) a demonstrat că lactoferina și ovotransferina restricționează cantitatea de fier ionic disponibil în lichidele corpului până la  $10^{-18}$  M. Această cantitate este insuficientă pentru creșterea normală a bacteriilor, iar cele patogene obțin fierul prin utilizarea componentelor hemului. Proteinele care leagă fierul în asocieră cu anticorpii au un puternic efect bacteriostatic *in vitro* și sunt esențiale pentru protecția împotriva multor infecții. Lactoferina este importantă pentru funcția bactericidă a leucocitelor împotriva germenului *Pseudomonas aeruginosa*.

Brock [22] a arătat că există o relație între metal și imunitate. Celulele sistemului imun protejează țesuturile împotriva toxicității fierului, jucând un rol primordial în controlul concentrației acestui metal. Mecanismul arată că sinteza acestui tip de celule și prezența de proteine care leagă fierul ca lactoferina, ovotransferina și feritina, capabile de neutralizarea fierului, duc la eliminarea toxicității metalului prin legarea acestuia.

## 2. Funcțiile biologice ale ovotransferinei

### Activitatea antimicrobiană

Mulți cercetători au demonstrat efectul bacteriostatic, dar și efectul bactericid al lactoferinei și OTF în *in vitro* asupra unei game largi de microorganisme incluzând bacterii gram-pozitive și gram-negative aerobe, anaerobe, ciuperci și virusuri ca de exemplu citomegalovirusul uman (HCMV) virusul herpes simplex (HSV1) sau virusul imunodeficienței umane (HIV).

*In vivo*, lactoferina din lapte își poate exercita efectul inhibitor asupra creșterii microbiene în intestinul nou-născutului. Activitatea antimicrobiană a lactoferinei joacă un rol în selecția florei intestinale a nou-născutului și previne colonizarea cu organisme enteropatogene. Ellison

(1989) a demonstrat că transferinele distrug membrana externă a enterobacteriaceelor gram negative. A fost testată proprietatea lactoferinei și a transferinei de a elibera lipopolizaharide (LPS) marcate radioactiv din peretele celular al bacteriilor *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium*. În plus transferina sporește efectul antibacterian al concentrației de rifampicină, o substanță ce nu penetrează membrana externă a bacteriei. Acest experiment demonstrează că proteine care leagă fierul distrug membrana bacteriilor gram-negative și afectează permeabilitatea acestora [22].

Zagulski și col (1995) au întreprins experimente pentru a demonstra efectul protector al lactoferinei bovine (LB) atunci când este administrată intravenos la cobai cu 24 h înainte de administrarea unei doze letale de *Escherichia coli*. Aproximativ 70% dintre cobaii tratați cu LB au supraviețuit experimentului. Rata de supraviețuire a cobailor tratați numai cu *E. coli* a fost de 4-8%. Lactoferina umană are aproape același efect protector ca și LB.

La o concentrație scăzută, lactoferina determină o inhibiție apreciabilă a creșterii *E. coli*, *S. typhi* și *Shigella dysenteriae*. Adăugarea unei concentrații de 0,2 mg/ml lactoferină în mediul de cultură a dus la o scădere gradată a bacteriilor, la momente diferite ale incubăției între 0 și 12 ore. Un procent maxim de inhibiție a fost înregistrat în cazul *E. coli* (94%), urmat de *Salmonella typhi* (78%) și *Shigella dysenteriae* (75%) [13].

Efectul bacteriostatic al transferinelor a fost asociat cu abilitatea de a lega fierul. Aproape toate bacteriile au nevoie de fier și datorită proprietăților de sechestrare, transferinele sunt în măsură să împiedice utilizarea fierului de către bacterii. De asemenea, ele intervin în blocarea metabolismului carbohidraților la bacterii sau în distrugerea peretelui celular, prin legarea calciului și magneziului. Lactoferina acționează sinergic cu alte proteine antibacteriene precum lizozimul prezent în secreții [25].

Proprietatea unor transferine de a dona fier mucoasei duodenale a fost studiată cu ajutorul unei tehnici de incubăție în *vitro*.

S-a demonstrat că lactoferinele bovină, umană și cea de capră au avut acțiune bacteriostatică față de *Bacillus stearothermophilus* și *Bacillus subtilis*, atât în prezența cât și în absența cantităților infime de metale. Lactoferina bovină a inhibat germinația sporilor și creșterea formelor vegetative de *Bacillus stearothermophilus* [10, 14].

OTF acționează ca un inhibitor al creșterii unei largi varietăți de microorganisme, mecanismul acțiunii antibacteriene fiind atribuit proprietății sale de a lega și reține Fe care este esențial pentru creșterea bacteriană. Autorii au demonstrat că apo-OTF, Cu-OTF și Zn-OTF au produs inhibiții considerabile asupra creșterii culturilor de *E. coli* și *Staphylococcus aureus*.

S-a studiat efectul de creștere a OTF asupra creșterii bifidobacteriilor. Creșterea acestora este stimulată de adăugarea în mediu a apo-transferinei, Cu-ovotransferinei sau Fe-OTF. Dintre speciile testate, *B. breve* și *B. bifidum* au fost cele mai sensibile.

Soukka și col (1990) a studiat efectul inhibitor sinergic al lactoferinei și sistemului lactoperoxidazelor asupra viabilității bacteriei *Streptococcus mutans*, serotip C, în vitro. Ambele au avut acțiune antibacteriană însumată asupra *S. mutans* la pH scăzut [23].

S-a demonstrat că lactoferina bovină, proteina fazei acute, prezentă în secrețiile uterului bovin, se leagă de 6 specii de stafilococi coagulazo negativi izolați din infecțiile bovine intramamare. Rezultatele acestui studiu au stabilit prezența de receptori specifici ai lactoferinei responsabili de legarea acestora de stafilococi izolați de la bovine (Satyanarayan, 1990).

## Bibliografie

- 1) ABDOU A.M., MUJO KIM, KENJI SATO (2013) – License InTech ([http // creativecommons /org / licenses/ by 3,0](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0))
- 2) ABEYRATHNE F.D.N.S., H.Y. Lee H.Y., J.S. HAM, D.N. AHN (2013)- separation of ovotransferrin from chicken egg white without using organic solvents – Poultr. Sci. , 92, 4, 1091-1097
- 3) ADHAM M.A., M. KIM, K. SATO (2013) – Creative Commons Attribution License ([http: // creativecommon/ org/ licenses/ by/3,0](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0))
- 4) AHN D.N., E.J. LEE, A. MENDONCA
- 5) AL. MASHIKHI S.A. și S. NAKAI (1987) – Separation of ovotransferin from egg white by immobilized metal affinity chromatography to the isolation and the purification of hen egg white and egg yolk proteins. Eur. Food. Res. Technol. 202: 1-14



- 6) AWADE A. C. (1996) –On hen egg fractionation: Application of liquid chromatography to the isolation and the purification of hen egg white and egg yolk proteins; Eur. Food Res. Technol., 202: 1-14
- 7) AZARI P.R. and R.F. BAUGH (1967). A simple and rapid procedure for preparation of large quantities of pure ovotransferrin. Arch. Biochem. Biophys. 118: 138-144
- 8) BATTISTUZZI G., M. SOLA (1992) –Fe<sup>3+</sup> binding to ovotransferrin în the presence of  $\alpha$ -amino-acids, Bioch., Bioph. Acta 1118, 313-317
- 9) BULLENS J. J. (1982)- Semnificația fierului în infecție – Bioch. Bioph. Acta 718, 42-48
- 10) CHUNG M.C., S.L. CHAN și s. SHIMIZU, 1991 0 Purification of transferrin and lactoferrin using DEAE Afii- Gel Blue, Int. J. Biochem. 23: 605 – 616.
- 11) ELISON R.T. (1994) – The Effects of Lactoferrin on Gram Negative Bacteria – Br. J. Exp. Path 70, 697-704
- 12) EVANS R. W., XIAOLE KONG, R.C. HIDER (2012) – Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents – Bioch. Bioph. Act, 1820, 282-290
- 13) FORSCREN A., NAIDU A.S. (1983) – Antibacterian Activity of Lactofferin against same enterobacteriaceae
- 14) FRANSSON G.B., CARI L. KEEN and BO LENNERDAL (1979) – Suplimentarea laptelui cu fier legat de lactoferina la șoareci înțărcați: Efecte în hematologie și fier tisular – Bioch. Biopl. Acta, 688, 120-128
- 15) GIAN SANTI F., P. ROSSI, MARIA TERESA MASSUCCI, D. BOTTI, G. ANTONINI, P. VALENTI, L. SEGANTI (2002)- Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin, 80(1) : 125-130
- 16) GUERIN C., and G. BRULE (1992) – Separation of three proteins from egg white. Sci. Aliments 112: 705-720.
- 17) GUO M., I. HARVER, W. YANG, L. COGHILL, D.J. CAMPOPIANO J., A. PARKINSON, R.R. MAC GILLIVRARY, W.R. MARRIS, P.J. SADLER (203) – Sinergic anion and metal binding to the ferric ion – binding protein from Neisseria gonorrhoeae. J. Biol. Chem. 278: 2490 – 2502.
- 18) KO K.Y., D.N. AHN (2008) – An Economic and Simple Purification Procedure for the Large Scale Production of Ovotransferrin from Egg White – Poult. Sci. 87: 1441-1451
- 19) NOLAN J.K., M. PHILLIPS, Y. MINE (2005) – Advances în the Value of Eggs and Egg Components for Human Health, J. Agric. Food Chem. 53, 8421-8431
- 20) OPPENHEIMER S. J. (1989) – Iron and Infection: The clinical evidence, Acta Paediatr. Scand. Suppl. 361:53



- 21) PERRANDIN J. P. (1983) – Lactoferrin, J. of Pediatric Gastromicrobiology and Nutrition, Raven Press, New York
- 22) REITER B., J.H. BROCK and E.D. STEEL (1975) – Inhibition of Escherichia coli by bovine colostrum and post-colostral milk. II The bacteriostatic effect of lactoferrin on a serum susceptible and serum resistant strain of E. coli. Immunology, 28: 83-95
- 23) SONKKA T., M. LUMIKARI, J. TENOVUO (1990) – Efectul inhibitor combinat al lactoferinei și sistemului lactoperoxidazelor asupra viabilității Streptococcus mutans, Serotip C- J. Clin. Microbiol. 98, 2312-2319
- 24) TRANSSON G.B., KERSTIN THOREN TOLLING, BERN JONES (1983) – Absorbția fierului la purcelușii de lapte, J. of Pedr Gastr. Nutr. 2, 693-700
- 25) VACHIER M.C., M. PIOT, O.J. AWADE (1995) – Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovoalbumin, using a quarternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 664 : 201-210
- 26) WARNER R.C. (1954) – Egg proteins. în the Proteins. H. Neurath and K. Bailey, ed. Acad. Press, New York, NY.
- 27) WILLIAMS J., R.E. EVANS K. MORETON (1978) – The Iron-Binding Properties of Hen Ovotransferin – Biochem. J., 173, 535-542
- 28) CHIURCIU VIORICA, I.V. PATRASCU, C.G. CHIURCIU, GEORGIANA TOPILESCU, B. FRUNZAREANU (2014) – IMB-PaChi Assay for Growth Inhibition of Bacteria by Neutralizing IgY Antibodies. European Biotechnology Congress Lecce 2014
- 29) CHIURCIU VIORICA, I.V. PATRASCU, C.G. CHIURCIU, GEORGIANA TOPILESCU, R.T. CRISTINA (2014) – Growth Inhibition of antibiotic resistant bacteria by neutralizing IgY antibodies. European Biotechnology Congress Lecce 2014

## Patente privind prepararea ovotransferinei

- W02012146717A1 – Preparation of an egg white composition - Arjen Sein și col.
- W02005074703 A1 – A process for preparing an egg white liquid for prevention of coagulation - Join Co Ltd, Yu Lk Jong
- US 3982040 A – Egg white composition - Edward Oborn
- 20090299037 – Methods of purifying Proteins from Egg White - Liang M. Chen
- US 99/497 – Separating egg-white from yolk - Annelouise Hemingway, Mark Schwieg
- US 8273394 – Dried egg white, production methods therefor and food containing improved dried egg - Watanabe Tokayuki și col
- 20120052552 – Methods of Separating components of technical eggs, edible eggs yolk and whites and products there from - Ronald E. Strohbahn, Jesse I. Figgins
- 20110301077 – Methods for Production of Lactoferrin - Perrandin J. P.
- US6319853 – Lactoferrin tablets - Mamoru, Tomita și col.
- US20130171061 A1 - Anti-Human transferrin receptor antibody and uses thereof - Ming-Hua Yang și col.
- US20130260432 A1 – Methods of co-extracting multiple proteins from chicken egg white - Meihu Ma și col.
- CN102584985A – Method for extracting the ovotransferrin from egg white - Tan T.C. și col.

## INVENȚIA PE SCURT

### Formularea pe scurt a soluțiilor tehnice

Obiectivul prezentei invenții este de a elabora o metodă de producere a ovotransferinei specifice față de antigene bacteriene sensibile sau rezistente la antibiotice, antigene virale. Tulpinile bacteriene sau virale provin de la pacienți cu semne clinice intrenați în spitale din România.

Ovotransferina specifică are efect antibacterian și antiviral, ajutând la creșterea normală a organismelor. Pentru prepararea OTF-specific a fost realizat un program intensiv de cercetare care a urmărit: obținerea unor anticorpi policlonali în gălbenuș (IgY) și a OTF-M care să acționeze specific asupra mai multor epitopi, utilizarea unor metode de producție care să asigure păstrarea activităților specifice la nivelul maxim precum și aplicarea unor metode de control care să permită evaluarea corectă a acțiunii acestora asupra antigenului dat. Antigenul monovalent sau polivalent a fost utilizat în amestec cu adjuvant QS21 conform metodologiei prezentate în acest brevet de invenție. Această tehnologie poate fi ușor folosită, iar OTF specifică poate fi comercializată la un preț convenabil și valorificată în unitățile medicale din România. Folosind setul de evaluare ELISA și kitul IMB-PaChi cu care se testează tulpinile izolate de la fiecare pacient, se poate realiza un program de tratament specific folosind OTF care acționează direct și blochează multiplicarea bacteriilor în *vitro*.

Prezenta invenție se referă la producerea de OTF din albuș de ou care are următoarele etape:

- (a) prepararea unui antigen complex folosind tulpini bacteriene izolate de la pacienții din România, tulpini rezistente la antibiotice. Antigenul este un amestec de tulpini rezistente la antibiotice ale aceleiași specii bacteriene sau un antigen preparat dintr-un amestec de tulpini de la mai multe specii de bacterii;
- (b) amestecarea antigenului în cu adjuvant QS21;
- (c) imunizarea păsărilor cu antigenul preparat conform pct. (a) și (b) în urma căreia se formează anticorpi specifici în corpul găinilor, anticorpi care sunt transferați și acumulați în gălbenușul ouălor;

(d) izolarea albușului din ouăle care provin de la găini imunizate cu antigenul dat și extracția fracțiunii hidrosolubile care conține OTF, prin separarea de fracțiunea care nu se dizolvă în apă;

(e) trecerea fracțiunii solubile în apă prin prefiltrare și filtre de 0,45  $\mu\text{m}$  și respectiv 0,22  $\mu\text{m}$ ;

(f) concentrarea OTF prin filtrare tangențială prin casete de 30 kDa.

Un alt obiectiv al acestei invenții este utilizarea OTF-specifică în clinică și laborator. OTF-specifică fabricată prin această procedură este ușor de preparat și se obține la un preț convenabil. Aceste OTF-M sunt specifice pentru tulpinile bacteriene existente în mediul înconjurător din România, tulpini care frecvent sunt rezistente la antibiotice. OTF-specifice se pot comercializa sub forma unui produs monovalent alcătuit dintr-o singură OTF-specifică față de un singur germene patogen sau ca OTF-M multiplă care este un amestec de OTF-specifice față de mai multe specii de bacterii patogene izolate de la om.

S-au experimentat o serie de metode de separare a ovotransferinelor specifice.

Ovotransferina poate fi separată din albuș prin procedee de fracționare cu etanol (Bain și Deutsch, 1948; Warner și Weber, 1951), precipitare cu sulfat de amoniu sau coagularea ovoalbuminei (Warner, 1954; Azari și Baugh, 1967). Totuși, dezavantajele acestor tehnici pentru purificarea ovotransferinei constau în denaturarea proteinei, iar puritatea obținută este relativ scăzută (Vachier și col., 1995).

O serie de cercetători au folosit pentru purificarea ovotransferinei, pe lângă precipitarea cu etanol și sulfat de amoniu, cromatografia pe schimbători de ioni, folosind coloane cu DEAE-celuloză, Q-Sepharose (KO și Ahn, 2008). Chung și col (1991) au aplicat cromatografia pe DEAE-Affi Gel Blue ca primă etapă de fracționare a proteinelor din albuș. Frațiunea conținând ovotransferina obținută pe DEAE Affi Gel Blue a fost în continuare purificată folosind cromatografia lichidă Fast Flow.

S-a utilizat de asemenea cromatografia în două etape: pe coloană cu Superose-6 Prep și cromatografia pe Q-superose Fast Flow (Awade și col. 1994).

Aplicarea acestor tehnici pe scară largă este dificilă, datorită faptului că sunt laborioase și foarte scumpe (Awade, 1996).

Ko și Ahn (2008) au aplicat o metodă de purificare simplă și economică pentru producția pe scară largă a ovotransferinei din ou. Aceasta a fost separată de gălbenuș și diluată cu același volum de apă distilată. Pentru a preveni denaturarea în procesul de separare, ovotransferina a fost transformată în forma holo- prin adăugarea soluției de clorură ferică ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM. Fixată de fier, aceasta a fost separată de albuș folosind diferite concentrații de etanol (30% până la 50%). Folosirea concentrației finale de etanol 43% și pH 9,0 au fost cele mai bune condiții de separare a ovotransferinei din albuș.

Holo-transferina precipitată a fost dizolvată în apă distilată și cromatografiată pe o coloană cu schimbători de ioni (AG1-X2) pentru a înlătura fierul fixat de ovotransferină după ajustarea pH-ului la 4,7. Apo-ovotransferina obținută prin acest protocol a avut un grad de puritate mai mare de 80%. Metoda folosită este simplă, economică și se pretează pentru producția pe scară largă a ovotransferinei din albuș. Ovotransferina izolată poate fi utilizată în hrana oamenilor, deoarece singurul solvent folosit în acest proces este etanolul. De asemenea, schimbătorul de ioni AG1-X2 și etanolul folosit în acest proces pot fi regenerate.

Abeyrathne (2013) a descris o metodă de izolare a ovotransferinei din albuș fără utilizarea solvenților organici, a cărei puritate a fost de peste 85%, prin combinarea precipitării cu sulfat de amoniu și acid citric.

Unul dintre obiectivele prezentei invenții este de a descrie o metodă simplă și ușoară pentru obținerea ovotransferinei fără utilizarea de solvenți organici.

Prepararea ovotransferinei cuprinde următoarele etape:

- (a) Prepararea unor antigene folosind tulpini bacteriene rezistente la antibiotice izolate de la pacienți din România.
- (b) Prepararea antigenelor în amestec cu adjuvant QS21.
- (c) Imunizarea găinilor cu antigene preparate conform pct (a) și (b) în urma căreia se formează anticorpi specifici în organismul găinilor, anticorpi care se transferă prin oviduct și se acumulează atât în gălbenuș cât și în albuș.
- (d) Albușul se separă de gălbenuș și se diluează 1:1 cu apă deionizată.
- (e) Ovomucina se înlătură prin centrifugare sau filtrare tangențială, ajustând pH-ul la 4,5-5,0.
- (f) La supernatantul obținut se adaugă sulfat de amoniu și acid citric și se păstrează peste noapte la 4 °C.
- (g) Suspensia se centrifughează sau se filtrează, iar precipitatul obținut, care conține ovotransferină, se dizolvă în apă deionizată.

- (h) A doua precipitare se efectuează, folosind raporturi diferite de sulfat de amoniu și acid citric.
- (i) Precipitatul obținut după centrifugare sau filtrare se dizolvă în apă deionizată și este supus dializei pentru înlăturarea sărurilor.
- (j) Proteina a fost identificată prin testul de imunodifuzie în gel de agar (ID) folosind ser anti-ovotransferină.
- (k) Specificitatea ovotransferinei a fost evaluată prin testul imunoenzimatic (ELISA), iar activitatea antibacteriană prin testul de inhibare a multiplicării bacteriilor (IMB PaChi).

Prepararea OTF prin această metodă este mai simplă și mai puțin costisitoare decât cele descrise anterior; ovotransferina poate fi utilizată în laboratoare și clinici, fiind specifică pentru unele tulpini existente în România, tulpini care sunt frecvent rezistente la antibiotice. Ovotransferina se poate comercializa sub forma unui produs monovalent, fiind specifică față de un singur germen patogen sau ca o proteină complexă, naturală, având proprietăți antibacteriene față de mai multe specii bacteriene izolate de la om.

Ovotransferina-specifică poate fi utilizată în tratamente antimicrobiene, antivirale și ca supliment cu fier în medicina umană.

## DESCRIEREA SUMARĂ A PROCEDURILOR

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

**Anexa # 1.** Prezintă obținerea ovotransferinei specifice prin diluarea albușului și precipitarea în două etape cu sulfat de amoniu și acid citric în diferite concentrații și caracterizarea acesteia prin metode biochimice și imunologice:

- a) Identificarea și măsurarea conținutului în proteină totală prin metoda Bradford
- b) Identificarea OTF-M prin testul de imunodifuzie în gel de agar, față de ser de iepure anti-pasăre
- c) Identificarea OTF-M prin testul de imunodifuzie radială în gel de agaroză față de ser de iepure anti-pasăre
- d) OTF-M specifică identificată prin testul ELISA folosind conjugat anti-pasăre
- e) OTF-M specifică identificată prin testul de inhibiție a multiplicării bacteriene (IMB-PaChi) folosind culturi bacteriene standard ATCC.

## DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Extragerea ovotransferinei din albușul ouălor provenite de la găini imunizate cu un antigen dat are și rațiune economică, având un cost redus. În acord cu prezenta invenție, prepararea ovotransferinei specifice cuprinde o serie de etape dintre care: prepararea antigenului (1), imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF (2), extragerea și purificarea parțială a ovotransferinei (3), evaluarea calitativă și cantitativă a anticorpilor (4).

### 1. Prepararea antigenului

În acord cu prezenta invenție, s-au izolat de la pacienți tulpini bacteriene rezistente la antibiotic. Celulele bacteriene cultivate pe medii selective, se recoltează și se spală cu tampon fosfat (PBS) de trei ori și se centrifughează la 4000 rpm timp de 15 minute.

### 2. Imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF

Antigenul se administrează prin inocularea intramusculară a câte 0,5 ml în patru puncte diferite în musculatura pieptului la găinile ouătoare convenționale sau SPF. Antigenul se inoculează de trei ori la interval de 14 zile. După a doua administrare se testează prezența anticorpilor specifici în sânge și ou prin testele ELISA, ID și IMB-specific PaChi. Recoltarea ouălor se face la un interval de 14 zile de la a treia inoculare de antigen, când titrul anticorpilor se evaluează periodic din ouă provenind de la găinile imunizate cu antigenul dat.

Obținerea ovotransferinei din albușul care provine de la găinile imunizate cu antigenul dat se poate face la volume mari fără a se face la investiții considerabile.

Tehnica de imunizare a găinilor ouătoare cu un anumit antigen este bine cunoscută. Prezenta invenție poate folosi orice fel de metoda de imunizare a găinilor care permite administrarea antigenului dat prin orice cale de administrare: subcutanată, intracutanată, intramusculară, intravenoasă.

În prezenta invenție s-a folosit ca adjuvant QS21. Se pot folosi și alte tipuri de adjuvanți, cum ar fi adjuvantul Freund complet sau incomplet sau o combinație a acestora.

Folosirea adjuvantului QS21 în amestec cu antigenul dat. Crește răspunsul imun, nu produce reacții locale și s-a dovedit foarte eficient în producerea și menținerea unui titru mare pentru o lungă perioadă de timp.

### 3. Prepararea ovotransferinei din albuș

În acest brevet s-a urmărit o procedură simplă care să permită conservarea cantitativă și calitativă a ovotransferinei obținută din ouă provenite de la găini imunizate cu un anumit antigen. După imunizarea gănilor se extrage albușul.

În prezenta invenție, gălbenușul se separă de albuș, se diluează 1:1 cu apă deionizată, se omogenizează și se ajustează pH-ul la 4,5-5,0; ovomucina este înlăturată prin menținerea albușului diluat timp de 24 h la 4 °C. Ovotransferina a fost obținută prin precipitare cu sulfat de amoniu 5% (w/v) urmată de precipitare cu acid citric 2% (w/v). Precipitatul colectat în urma centrifugării a fost dizolvat în apă deionizată și reprecipitat cu sulfat de amoniu 2% (w/v) și acid citric 1,5% (w/v). Depozitul rezultat în urma centrifugării este supus dializei față de o soluție de NaCl 0,15M.

Ovotransferina este testată din punct de vedere calitativ și cantitativ. Determinările cantitative se referă la testarea conținutului în proteina totală prin metoda Bradford, imunodifuzie radială, ELISA și IMB-specific PaChi. Determinările calitative se fac prin testul de imunodifuzie în gel de agar și ELISA.

Prin această metodă se menține structura naturală și stabilitatea ovotransferinei. Metoda este simplă, iar ciclul de extracție este scurt.



## MODELE RECOMANDATE DE FOLOSIRE A INVENȚIEI

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

### Exemplul 1

#### Prepararea OTF-M

- a) Fiecare tulpină bacteriană va fi însoțită de certificatul de calitate emis de o instituție autorizată;
- b) Fiecare tulpină va fi conservată la  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  ca produs original. Multiplicarea bacteriilor pentru prepararea antigenului se va face în mediul de cultură recomandat;
- c) Din cultura de bacterii de 24 de ore se prepară un sediment de bacterii echivalent cu  $2 \times 10^{10}$  UFC, prin centrifugare 15 minute la 4000 rpm la  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- d) Depozitul rezultat se resuspendă în PBS la volumul inițial și se liofilizează 2 ml în flacoane de 4 ml. După liofilizare cultura bacteriană se conservă la  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- e) Depozitul rezultat la pct. d) se resuspendă la volumul inițial în PBS cu 0,4% formol și se incubează peste noapte la  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Formolul se elimină prin centrifugare 15 minute la 4000 rpm la  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bacteriile inactivate se resuspendă în PBS și se liofilizează. După liofilizare flacoanele se conservă la  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- f) Antigenul se prepară folosind 500  $\mu\text{g}$  celule/ml inactivate sau 3-4,5  $\mu\text{g}$  de proteină/ml care se reconstituie în 0,5 ml PBS și se amestecă cu 0,5 ml de adjuvant QS21. Pentru imunizarea găinilor, amestecul se diluează în părți egale cu emulsificator Tween 20 5%;
- g) Antigenul este un amestec de tulpini din cadrul aceleiași specii de bacterii sau un amestec de tulpini bacteriene din specii diferite;
- h) Găini ouătoare convenționale sau SPF la vârsta de 140-180 de zile, clinic sănătoase, sunt crescute în grupuri de câte 10, în cuști formate într-o baterie de creștere special confecționată, cu furajare și adăpare automată. Fiecare găină este individualizată prin matriculare la ambele aripi;
- i) Găinile sunt inoculate intramuscular, în patru puncte diferite cu 2 ml din antigenul dat, preparat ca la pct 1.f)

- j) După prima administrare, găinile se inoculează încă de două ori cu același antigen, pe aceeași cale de administrare, la interval de 14 zile;
- k) La cea de-a doua și respectiv a treia administrare se prelevează probe de sânge pentru controlul răspunsului imun față de antigenul dat;
- l) Probele de sânge prelevate de la găini după a doua și a treia administrare de antigen sunt tratate pentru a se exprima serul care se extrage de pe coagul și se conservă la +4 °C sau la -20 °C.
- m) Pentru evaluarea răspunsului imun se folosesc testul ELISA calitativ și cantitativ, testul de imunodifuziune în gel de agar (SPGA), testul de imunodifuziune radiară simplă (IDRS) și testul IMB-specific PaChi (28). Activitatea anticorpilor extrași din gălbenușul de ou se apreciază folosind fiecare test în parte. OTF-M se verifică prin:
- Testul de imunodifuziune în gel de agar (SPGA), pentru care se folosește serul de iepure anti-pasăre în comparație cu OTF standard.
  - Testul SPGA în care se folosesc diluții binare de OTF-M testate față de antigenul dat. Se apreciază diluția maximă la care există un răspuns specific și se compară cu etalonul propriu.
  - Testul ELISA calitativ
  - Testul ELISA cantitativ
  - Testul pentru determinarea proteinei prin testul Bradford
  - Testul IMB-specific PaChi
- n) Se admit în producția de OTF-M găinile care au răspuns pozitiv la administrarea antigenului dat.
- o) Se consideră momentul optim de recoltare a ouălor atunci când se extrag din gălbenuș 100-200 mg de IgY și din albuș 10-20 mg OTF-M.

## Exemplul 2

### Condiționarea OTF-M

După testarea OTF-M prin testele SPGA, IDRS și inhibarea multiplicării bacteriilor și determinarea conținutului în proteină totală, seriile preparate se condiționează prin:

- a) Purificarea OTF-M prin filtrare tangențială, folosind casete de 30 kDa, prin schimbarea succesivă a soluției de spălare (PBS) la pH7 din instalația de filtrare;
- b) Concentrarea OTF-M se efectuează prin filtrarea tangențială eliminând excesul de soluție salină (PBS);
- c) OTF-M preparat conform pct 2b) se filtrează prin filtre de 0,45  $\mu\text{m}$  în spații special amenajate, cu aer steril filtrat prin casete cu un randament de 99,997 pentru particule de 0,1  $\mu\text{m}$  într-un spațiu de lucru la standard GMP;
- d) OTF-M preparat conform pct. 2b) se liofilizează: 20 ml de soluție OTF-M în flacoane de 50 ml.
- e) OTF-M preparat conform pct. 2b) se amestecă în raport de 20 mg de OTF per gram de gel sau vaselină pentru administrări cutanate, și 20 mg de OTF-specifică în 80 ml tampon fosfat pentru tratament oro-faringo-gastro-intestinal.
- f) OTF-M preparat se condiționează prin repartizare sterilă în flacoane, fiole sau tuburi corespunzătoare dozajului sau căilor de administrare.

### Exemplul 3

#### Controlul final al OTF-M

- a) Pentru forma finală a OTF-M în soluție pentru administrări cutanate, intranazale, oro-faringo-gastro-intestinal se folosesc următoarele metode de control:
- Sterilitate microbiologică;
  - Stabilirea activității specifice a OTF folosind testul ELISA și SPGA;
  - Stabilirea conținutului de OTF folosind testul ELISA;
  - Stabilirea activității de inhibare a multiplicării bacteriene folosind testul IMB-specific PaChi
- b) Se admit în consum uman numai seriile de OTF-specific care corespund controalelor efectuate.

## Exemplul 4

### A. Determinarea cantitativă a OTF-M prin testul ELISA indirect

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

Cantitatea minimă decelată de OTF-M este 10 nanograme în materialul testat. Datorită specificității și reproductibilității reacției imunoenzimatică testul ELISA se folosește în procesul de producție al OTF, pe faze de producție, în controlul calitativ și cantitativ.

- a) Testul ELISA care urmează a fi folosit în controlul cantitativ al OTF se realizează prin comparație cu un etalon internațional OTF (USA) sau comparativ cu un subetalon OTF preparat la Romvac.
- b) Godeurile se căptușesc cu 150  $\mu$ l IgG de iepure anti pasăre la concentrația de 3.75  $\mu$ m/ml în tampon carbonat-bicarbonat;
- c) Plăcile cu 96 de godeuri ELISA se incubează 90 minute la +37 °C;
- d) Se spală de patru ori cu câte 300  $\mu$ l PBT-Tween folosind un spălător automat de plăci;
- e) În fiecare godeu se adaugă 200  $\mu$ l de 1% BSA în PBS-Tween și se incubează 45 de minute la 37 °C;
- f) Placa de reacție se spală de patru ori cu PBS-Tween conform d);
- g) Se adaugă în triplicat câte 150  $\mu$ l OTF-M specific sau OTF SPF (25, 12,5, 6,25  $\mu$ g/ml) în PBS;
- h) În paralel se adaugă în triplicat câte 150  $\mu$ l OTF standard SIGMA (25, 12,5, 6,25  $\mu$ g/ml);
- i) Plăcile sunt incubate la +37 °C pentru 90 de minute;
- j) Plăcile se spală de patru ori cu PBS-Tween;
- k) Se adaugă 150  $\mu$ l IgG anti IgY conjugat cu peroxidază la diluția 1:5000;
- l) Se adaugă 150  $\mu$ l TMB și se incubează 5-15 minute la temperatura camerei, la întuneric
- m) Se blochează reacția cu 150  $\mu$ l HCl;
- n) Reacția se citește la spectrofotometru cu filtru DO<sub>450</sub>;
- o) Se fac curbe standard comparative, considerându-se diluția maximă pozitivă 0,200 DO.

**B. Determinarea cantitativă a OTF-M prin testul ELISA direct**

- a) Placa se căptușește peste noapte la +4 °C sau în 2 ore la temperatura camerei cu OTF de testat și cu OTF etalon în trei replicare fiecare, în diluții binare începând cu diluția 1:1000 în soluție carbonat-bicarbonat;
- b) Godeurile A1 și H1 se păstrează ca martori pentru OTF;
- c) Se spală de 3 ori cu soluție de spălare;
- d) Se adaugă 100 μl de conjugat anti pasăre diluat 1:5000;
- e) Se incubează placa 2 ore la +37 °C;
- f) Se spală de 4 ori cu soluție de spălare;
- g) Se adaugă 100 μl TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min;
- h) Se adaugă 100 μl soluție de stopare;
- i) Se citește absorbanta reacției la un spectrofotometru cu filtru de 450 nm.
- j) Interpretarea reacției se face prin controlul godeurilor blank unde  $DO_{450}$  trebuie să fie maximum de 0,060. În cazul când sunt alte valori reacția nu se validează.
- k) Se consideră ca reacție pozitivă pentru prezența OTF, diluția la care  $DO_{450}$  este de 0,200 față de OTF standardul internațional.
- l) Conținutul în μg/ml de OTF se face în raport cu OTF de referință, ținând cont de faptul că ELISA decelează minimum 10 ng/ml și se face prin comparație cu OTF standard.

## Exemplul 5

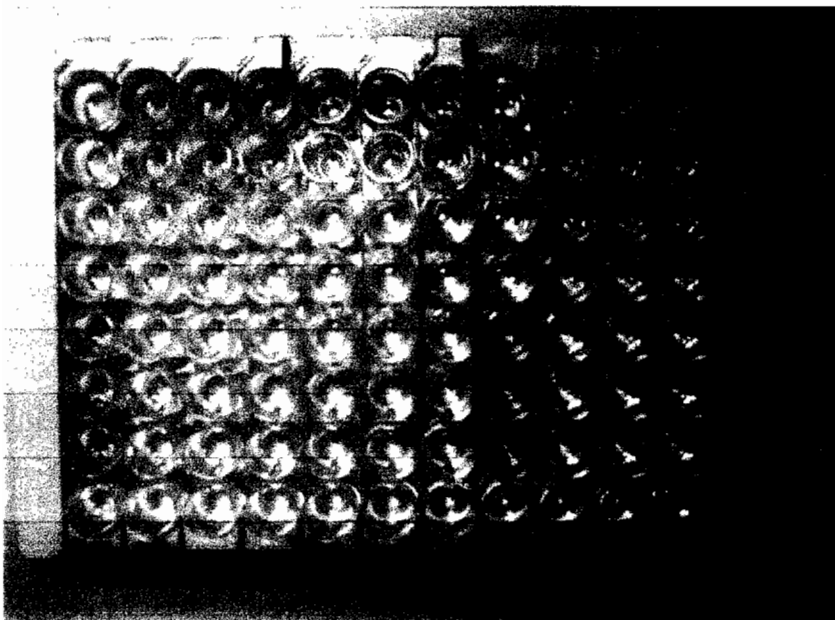
### C. Determinarea conținutului de OTF-M specific prin testul ELISA

Activitatea specifică OTF se determină cantitativ față de antigenul reprezentat de celulele întregi bacteriene inactivate și liofilizate conf. Pct. 1). Placa de reacție se căptușește cu antigen, iar OTF-specific se testează, în diluții succesive binare de la diluția 1:1000, în triplicat. Se consideră diluția maximă pozitivă diluția la care reacția este egală sau mai mare de 0,200 OD sau valoarea matematică pentru diluția mai mare de 0,200 OD. La această diluție reacția pozitivă este produsă de 5-10 ng de OTF-specific per godeu, per 150  $\mu$ l.

- a) Se căptușește o placă ELISA cu 150  $\mu$ l din suspensia de bacterii liofilizate la 1,67-1,70  $\mu$ g de celule per ml sau 10  $\mu$ g de proteină bacteriană per ml în tampon carbonat-bicarbonat (0,05 M, pH 9,6);
- b) Placa căptușită se păstrează 12 ore (peste noapte) la +4 °C;
- c) După îndepărtarea lichidului, placa se spală de 3 ori cu soluția de spălare PBS-Tween 20 (2%);
- d) Reacția se blochează cu tampon de fixare, câte 300  $\mu$ l / godeu și placa se incubează 30 minute la temperatura camerei;
- e) Se înlătură lichidul de blocare;
- f) Placa se usucă 30 minute la exicator;
- g) Se repartizează în fiecare godeu 100  $\mu$ l din suspensia de OTF diluată 1:1000 în diluții binare până la 1:24 conform configurării plăcii. OTF de evaluat se va testa în triplicat;
- h) Se mențin godeurile A1 și H1 ca martori pentru antigen, godeurile B1, C1 și D1 ca martori negativ de reacție folosind OTF-SPF și godeurile E1, F1 și G1 ca martor pozitiv de reacție folosind OTF-specific de referință;
- i) Se incubează placa 2 ore la +37 °C;
- j) Se spală de 3 ori cu soluție de spălare;
- k) Se adaugă 100  $\mu$ l de conjugat anti pasăre diluat 1:5000, folosind ca diluant tamponul de diluție;
- l) Placa se incubează 2 ore la +37 °C ;
- m) Placa se spală de 4 ori cu soluție de spălare;

- n) Se adaugă 100 µl TMB și se lasă la temperatura camerei 5-15 min.
- o) Se adaugă 100 µl soluție de stopare;
- p) Se citește reacția la un spectofotometru la absorbanta 450 nm;
- q) Se validează reacția când reacția din godeurile martor blank A1 și H1 au valori mai mici de 0,060 DO, când reacția din godeurile B1, C1 și D1 martor OTF-SPF (negativ) au valori de 0,060-0,090 DO, iar în godeurile martor pozitiv E1, F1, G1 sunt valori de 1,400-1,800 DO.

### EXPERIMENT: ELISA EC 011

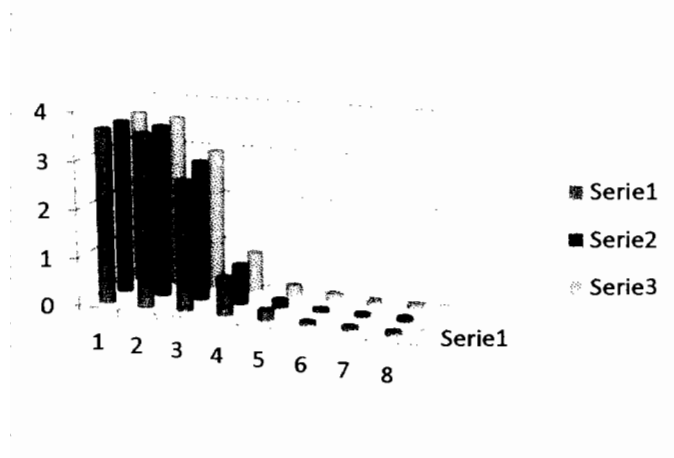


#### Controlul reacției:

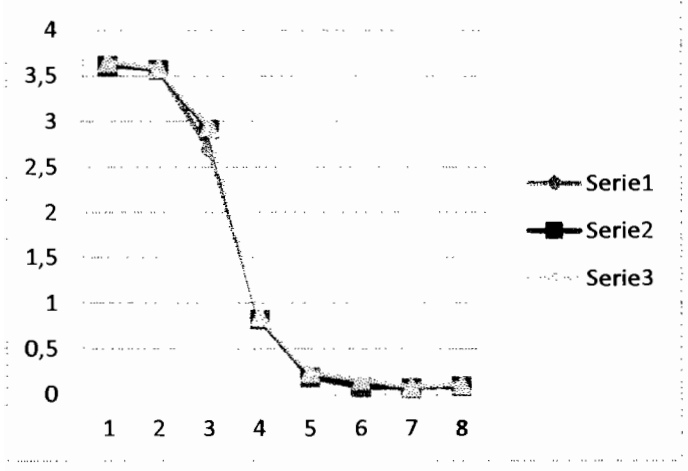
A1, A8, H1 și H8 (blank): OD 0.045

OTF-SPF (negativ) B1, C1, D1 și B8, C8 și D8: OD-0,065

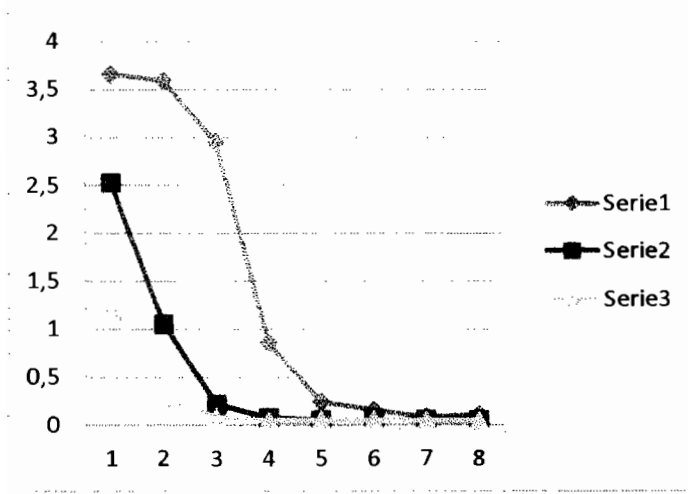
Reacții pozitive la diferite OTF-M specifice:







OTF-M anti *S. enteritidis* x 3 replicare



**Interpretarea plăcii ELISA:**

Seria 1 - linia albastră, OTF-M specific anti *S. enteritidis*

Seria 2 - linia roșie OTF-M specific anti *E. coli* seria #05

Seria 3 - linia verde OTF-M specific anti *E. coli* seria #04

## Exemplul 6

### Determinarea conținutului de OTF-M folosind testul de imunodifuziune radiară simplă (Testul Mancini).

Imunodifuziunea radiară simplă (IDRS) a fost acceptată ca un mijloc sigur de determinare cantitativă a antigenului și/sau a serului folosind un reagent etalon. Folosind IDRS se poate confirma cu mare acuratețe conținutul de proteină din OTF față de ser antipasăre. În acest scop se recomandă gelul preparat din agaroză sau agar, iar testul se realizează în următoarele etape:

- a) Prepararea amestecului de agaroză 1% în PBS conținând azidă de sodiu 0,05%;
- b) Se încălzește agaroză la 80-90 °C;
  - b.1) Se amestecă gelul de agaroză la 56 °C cu ser anti-pasăre la 56 °C și se toarnă în plăci de unică folosință cu 5 cm diametru;
- c) Se lasă să se solidifice agaroză în placă la temperatura camerei;
- d) Se execută godeuri cu diametrul de 4 mm la distanțe de minimum 20 mm;
- e) Se repartizează o picătură de agaroză caldă în fiecare godeu;
- f) Se repartizează 30 μl de OTF integral și în diluții succesive de 1/2, 1/4, 1/8 etc. în PBS în godeurile practicate în geloză;
- g) Se păstrează plăcile de reacție la temperatura camerei, în mediu umed și se face citirea reacției la 24, 48 și 72 de ore;
- h) Colorarea agarului cu Coomassie Brilliant Blue.
  - Se fixează geloza cu un amestec de ethanol cu acid acetic pentru 30 de minute la temperatura camerei. Se înlătură soluția de fixare.
  - Se colorează gelul cu 10 volume de soluție Coomassie Brilliant Blue, timp de o oră sau peste noapte la temperatura camerei (soluția de colorant se poate refolosi);
  - Se decolorează gelul în 10 volume de decolorant la temperatura camerei timp de 30 de minute;
  - Se repetă decolorarea;
  - Se înmoaie gelul 15 minute în 1-2% glicerol în apă deionizată;
  - Gelul este gata de fotografiat.

- Concomitent se măsoară diametrul fiecărui inel de precipitare;

Calcularea echivalentului în miligrame de proteină (OTF) per ml de soluție se face astfel:

diametrul inelului de reacție minus diametrul godeului, împărțit la 2 (grosimea din ambele părți) și înmulțit cu 3,3 coeficient de corecție pt. cantitatea de OTF-M testat per godeu față de serul de referință. Rezultatul se poate exprima grafic, în funcție de diluțiile folosite pentru OTF-M (Anexa #IDRS).

Proteina totală:

- OTF AIE înainte de filtrare = 58,20 mg/ml
- OTF AIE după filtrare prin 0,45  $\mu\text{m}$  = 31,39 mg / ml
- OTF BLV înainte de filtrare = 33 mg/ml
- OTF BLV după filtrare prin 0,45  $\mu\text{m}$  = 29,40 mg/ml

Godeul central, godeul 1 și 4 : ser iepure anti IgY

În godeul 2 și 6 : OTF AIE + Carre S.03/20.02.2014 integral

În godeul 3 și 5 : IgY K.p. + S.t. S.04/12.02.2014 diluție 1/32

## Exemplul 7

### Determinarea conținutului de proteine folosind testul Bradford

Testul Bradford se folosește pentru determinarea conținutului proteic în diverse produse biologice dintre care și suspensii de OTF-M.

Tehnica Bradford se bazează pe legarea colorantului Coomassie Brilliant Blue G-250 de proteine, ceea ce duce la formarea unui complex proteină-colorant. Acesta are un coeficient de extincție mare conducând astfel la o mare sensibilitate în măsurarea proteinei. Legarea colorantului de proteină este un proces foarte rapid (aproximativ 2 min.), iar complexul proteină-colorant rămâne dispersat în soluție pentru aproximativ 1 oră. Testul se efectuează la pH acid, maximul de absorbție înregistrându-se la aprox. 595 nm. Concentrația proteinelor se determină prin comparație cu răspunsul standardului, care poate fi în funcție de natura proteinei testate: albumină serică (BSA), gamaglobulină bovină (BGG) sau imunoglobulină de pasăre (OTF standard).

#### (a) Reactivi.

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

#### (b) Aparatură și materiale

- Cititor de plăci ELISA.
- Plăci ELISA.

(c) *Prepararea reactivului Bradford.* Soluția stoc: 100 mg Coomassie Brilliant BlueG-250 se dizolvă în 50 ml alcool etilic 95%, se adaugă 100 ml de acid orto-fosforic, apoi se diluează cu apă distilată la volum fix de 200 ml. Se filtrează soluția prin hârtie de filtru (Whatman #1 sau echivalent). Colorantul astfel preparat este stocat în flacon brun, la +4°C și este stabil timp de cel puțin 6 luni. Reactivul Bradford de lucru se prepară diluând soluția stoc cu apă distilată în raportul 1:5. Acesta se poate păstra la +4 °C și este stabil timp de cel mult 7 zile.

(d) *Prepararea soluțiilor standard de proteină.* Soluția stoc de proteină standard: se dizolvă 0,2 g din materialul de referință (BSA) în același tampon folosit pentru prepararea

soluției de testare și se completează la volum fix de 100 ml. Soluția astfel obținută are o concentrație de 2mg/ml. Soluția standard OTF se prepară ca la pct. 9(d).

- (e) *Soluțiile standard de lucru:* se diluează porțiuni din soluția stoc cu aceeași soluție tampon pentru a obține cinci până la șapte diluții etalon cu concentrații cuprinse între 1și 1500  $\mu\text{g}$  proteină per ml.
- (f) *Prepararea soluției test.* Se dizolvă o cantitate adecvată de proteină de testat în tampon astfel încât să se obțină o soluție cu o concentrație cuprinsă în intervalul de concentrații ale soluțiilor standard de lucru.
- (g) Pe placa ELISA se repartizează 25  $\mu\text{l}$  probă sau standard în godeuri separate, în replicare.
- (h) Se adaugă 300  $\mu\text{l}$  reactiv Bradford – soluție de lucru și se agită ușor 30 secunde. Se evită spumarea, care produce erori la citirea absorbantei. Se incubează 10 minute la temperatura camerei, la întuneric.
- (i) Se măsoară absorbanta la 595 nm față de martor (tampon); se citește în decurs de 60 min.
- (j) *Testarea curbei de calibrare.* Pentru trasarea curbei etalon se prepara șapte soluții de lucru cu concentrații de: 62,5; 125; 250; 500; 750; 1000; 1500  $\mu\text{g}$  BSA sai OTF/ml. Fiecare punct de pe curbă se testeaza în quadruplicat. Variația densității optice a complexului Coomassie Brilliant Blue G-250-proteină în funcție de concentrația standardului de proteină este prezentată în Fig. 1. precum și în imaginea din Foto 1. Ecuația dreptei de regresie obținută pentru curba etalon este  $y = 1,0017x + 0,0083$ .
- (k) *Validarea metodei.* Testarea standardului în quadruplicat trebuie să conducă la rezultate reproductibile. Sensibilitatea testului este apreciată ca fiind corespunzătoare în condițiile în care un conținut de 62,5  $\mu\text{g}$  proteină/ml în probă dă un semnal de 0,095 unități de absorbantă.

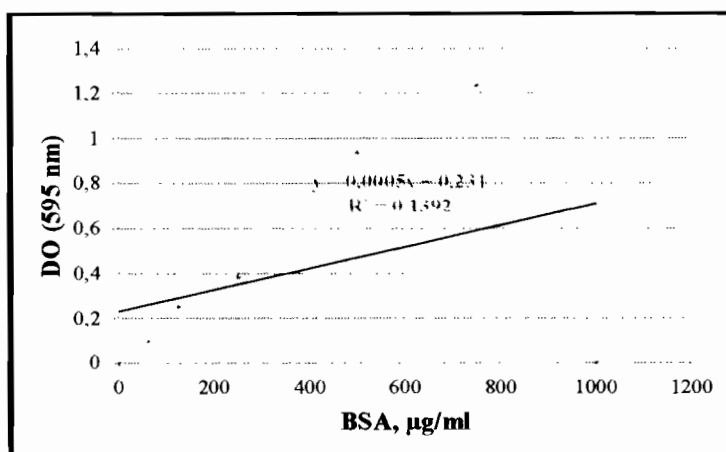
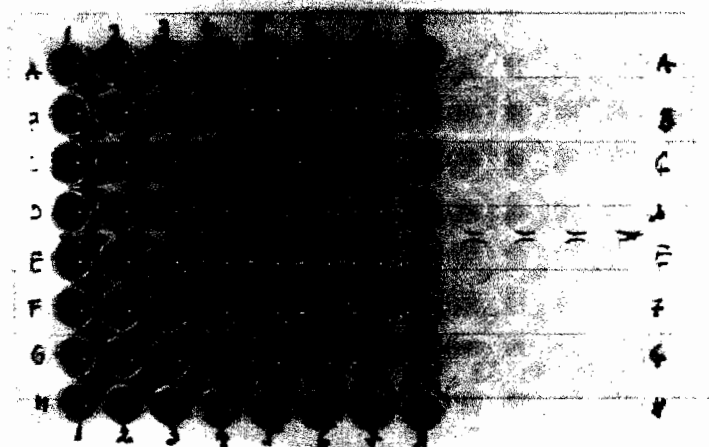


Fig.1. Curba de calibrare



**Foto 1. Imagine placă – curba de calibrare**

*1 – mortar reactivi; 2 – 62,5 µg/ml BSA; 3 – 125 µg/ml BSA;  
4 – 250 µg/ml BSA; 5 – 500 µg/ml BSA; 6 – 750 µg/ml BSA;  
7 – 1000 µg/ml BSA; 8 – 1500 µg/ml BSA*

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

#### **Experiment nr. 30/25.06.2014**

Proteina totală:

OTF-M AIE înainte de filtrare = 58,20 mg/ml

OTF-M AIE după filtrare prin 0,45 µm = 31,39 mg / ml

OTF-M BLV înainte de filtrare = 33 mg/ml

OTF-M BLV după filtrare prin 0,45 µm = 29,40 mg/ml

Rezultatele ne prezintă diferențe în conținutul proteic al OTF-M specific în funcție de gradul de purificare prin filtrare (filtre Millipore 0.45 µm).

## Exemplul 8

### Determinarea inhibiției multiplicării bacteriene folosind testul IMB-specific PaChi.

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

(2). Conținutul trusei IMB PaChi.

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

(3). Protocolul de lucru.

- (a) Suspensia bacteriană de testat se multiplică în mediul din tubul #1 cu etichetă neagră. În acest scop în 9,9 ml mediu de cultură se pun 0,1 ml din cultura bacteriană de testat. Cultura se incubează la 37 °C pentru 4, 6 sau 24 de ore.
- (b) din suspensia bacteriană preluată de la termostat după 4, 6 sau 24 de ore se iau 0,1 ml și se amestecă cu 9,9 ml de mediu de cultură, se omogenizează și se citește densitatea optică la un spectofotometru cu filtru 600 nm. Densitatea optică trebuie să fie aproximativ 0,05 DO<sub>600</sub>.
- (c) din tubul de diluție se repartizează steril câte 2 ml suspensie bacteriană în fiecare din cele 2 tuburi rămase în trusă. Probele se incubează la 37 °C cu agitare permanentă. Citirea rezultatelor se poate face la 4 și 8 ore de incubație. Citirea finală se face după 24 ore de incubație. Citirea se poate face cu ochiul liber și/sau cu un spectofotometru cu filtru de 600 nm.
- (d) inhibarea specifică a creșterii bacteriilor se poate observa la 4 și 8 ore de incubație la 37°C. Citirea finală se face la 24 de ore de incubație la 37 °C. Efectul inhibitor

specific al OTF-M de poate vedea cu ochiul liber când în proba cu OTF-M mediul de cultură rămâne transparent, iar în proba martor pozitiv mediul are o turbiditate din ce în ce mai mare la 4, 8 și respectiv 24 de ore.

- (e) se consideră o probă pozitivă când există o diferență vizibilă cu ochiul liber între turbiditatea din proba martor față de proba care conține OTF specific. În cazul când densitatea optică se evaluează la un spectofotometru proba este pozitivă când diferența între probele martor și proba cu OTF specific este mai mare de 0,1 DO 600 nm.
- (f) se consideră un efect optim de inhibiție a multiplicării bacteriene când la 24 de ore de incubație la 37 °C este blocată creșterea bacteriilor, iar valoarea densității optice este de 0,060 DO<sub>600</sub>.
- (g) se poate aprecia eficiența OTF-specific în funcție de cantitatea de germeni inhibată. În aceste condiții se poate organiza conduita terapeutică folosind o doză unică sau mai multe doze pe zi.

## Experiment nr. 51/07.05.2014

**1. Scopul experimentului:** Testarea inhibării multiplicării bacteriene sub influența OTF-M specific față de culturi bacteriene de Ec și Kp

### 2. Reagenți:

#### 2.1. Tulpini bacteriene

- *E. coli* 56637 (pasaj realizat în 06.05.2014, din colecția de tulpini provenind de la spitalul VB, omogenizată cu 20% glicerină, stocată la -75 °C, în data de 12.12.2013)
- *Klebsiella pneumoniae* 55826 (pasaj realizat în 06.05.2014, din colecția de tulpini provenind de la spitalul VB, omogenizată cu 20% glicerină, stocată la -75 °C în data de 12.12.2013 )

#### 2.2. OTF-M specific

- OTF-M Ec, preparat în 31.03.2014, liofilizat, reconstituit cu mediu TSB (200 mg/2 ml)
- OTF-M Kp, preparat în 17.01.2014, liofilizat, reconstituit cu mediu TSB (200 mg/2 ml).

**2.3. IgY SPF** seria 04 (nesteril), liofilizat, preparat în 21.01.2014, reconstituit în 25.03.2014 cu mediu TSB (raport 1:1)

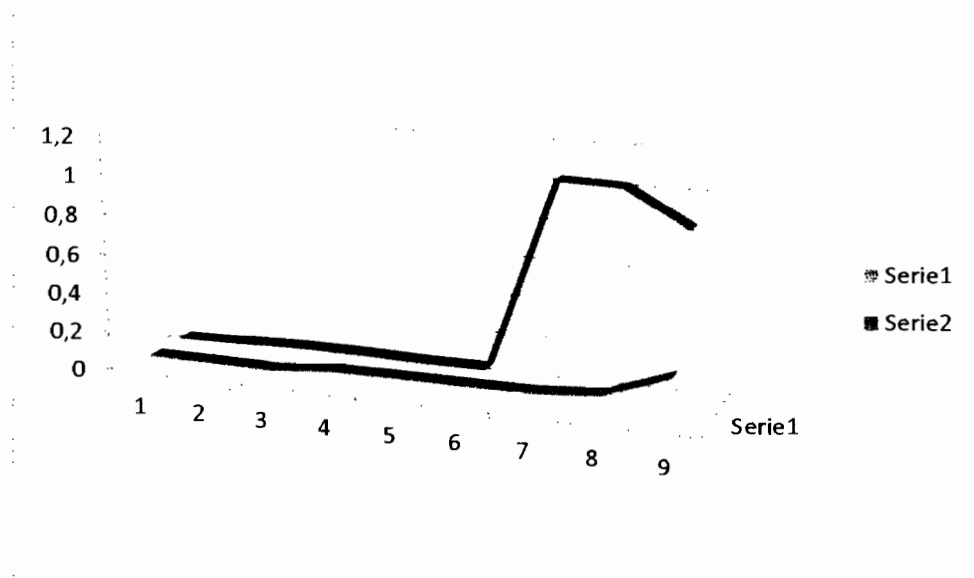


**Rezultate:**

Interpretare prin citire spectrofotometrică DO<sub>600</sub>.

OTF-M *K. pneumoniae* OTF-SPF la 24 de ore de incubație.

4h de incubație	24 ore de incubație
0,549	1,130
0,552	1,109
0,755	0,951



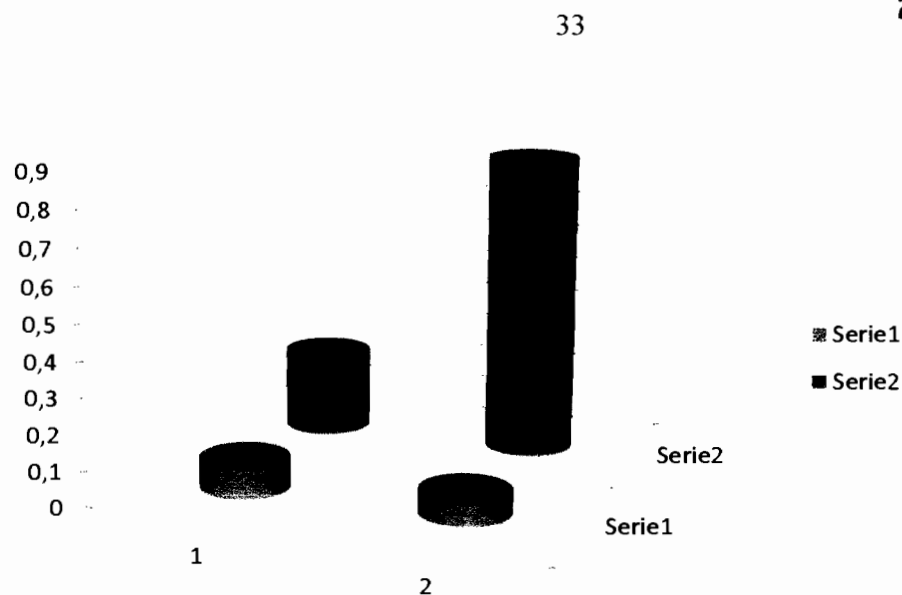
Banda roșie x 3 replicare - OTF-SPF martor

Banda albastră x 3 replicare - OTF-M specific *K. pneumoniae*

Se constată o inhibiție totală la intervalul de timp 4 ore și o ușoară creștere la 24 ore, ceea ce demonstrează capacitatea de inhibiție specifică a OTF-M specific *K. pneumoniae*.

OTF-SPF în comparație cu OTF-M specific *E. Coli*.

4h de incubație	24 ore de incubație
0,549	1,130
0,552	1,109
0,755	0,951



**Coloana 2:** OTF SPF martor

**Coloana 1:** OTF-M specific *E. coli*

Se observă inhibiția specifică a OTF-M specifică anti *E. coli* față de OTF-SPF la 4 și respectiv 24 de ore.

## REVENDICĂRI

### Titlul

## PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA OVOTRANSFERINEI MODERNE (OTF-M)

1. Metoda de preparare a OTF-M, metodă care se referă la obținerea acestei proteine (OTF-M) prin imunizarea găinilor ouătoare cu un antigen format dintr-un amestec de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice din cadrul aceleiași specii de bacterii sau un antigen format dintr-un amestec de specii de bacterii rezistente la antibiotice izolate de la pacienți din România. Se extrage din albușul ouălor provenind de la găini imunizate cu un anumit antigen. Albușul se diluează în proporție 1/1 cu apă deionizată, se ajustează la pH 5 și se precipită în două etape cu sulfat de amoniu și acid citric. Se conservă prin liofilizare.
2. Revendicarea metodei de la punctul 1, se caracterizează prin aceea că antigenul este un amestec de tulpini bacteriene rezistente la antibiotic din cadrul aceleiași specii.
3. Revendicarea metodei de la punctul 1, se caracterizează prin aceea că antigenul este un amestec de tulpini bacteriene din mai multe specii bacteriene rezistente la antibiotice.
4. Revendicarea metodei de la punctul 1, se caracterizează prin aceea că antigenul conține un amestec de bacterii inactivate în amestec cu un adjuvant QS21 care este suportat foarte bine de găinile inoculate intramuscular.
5. Revendicarea metodei de la punctul 1, care se caracterizează prin aceea că antigenul conține un amestec de bacterii inactivate în amestec cu un adjuvant QS21 care conferă un stimul antigenic foarte bun în organismul găinilor imunizate, obținându-se un titru mare al OTF-M.
6. Revendicarea metodei de preparare a ovotransferinei specifice (OTF-M) extrasă din ouale provenite de la găini imunizate cu antigene preparate din tulpini bacteriene rezistente la antibiotice izolate de la pacienții cu semne clinice din spitale.