



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00633**

(22) Data de depozit: **03/09/2015**

(41) Data publicării cererii:
29/01/2016 BOPI nr. 1/2016

(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;

• **MIHAI IULIANA**, STR. LANTERNEI NR. 95,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **RADU GEORGIANA**, STR. DÂMBOVIȚEI
NR. 75, VOLUNTARI, IF, RO;
• **IONESCU VIOLETA**,
STR. SERG. ION CONDURACHE NR. 23,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BĂDICĂ IONUȚ**, STR. CARPAȚI, BL. 409,
ROȘIORI DE VEDE, TR, RO;
• **DINU ANDREEA**, STR. PRIMĂVERII
NR. 29, HUNEDOARA, HD, RO

(54) **PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA IAURTULUI HIPERIMUN PC2
(IAURT PC-2)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea unui produs alimentar imunologic, utilizat ca adjuvant în tratamentul infecțiilor bacteriene din tubul digestiv. Procedeu conform invenției constă în amestecarea laptelui pasteurizat la o temperatură de 50...70°C, timp de 4...45 min, cu conținut integral de ouă provenite de la găini imunizate cu antigene preparate din tulpini

bacteriene patogene, izolate de la pacienții cu exprimarea clinică a bolii, eventual numai cu gălbenușurile din astfel de ouă sau cu extracte proteice imunoglobulina și ovotransferina.

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 IAURTULUI HIPERIMUN PC-2 (IAURT PC-2)

DOMENIUL TEHNIC

Imunologie, medicină, tratamente, prevenție, industria alimentară, aplicații în biotehnologie.

Prezenta invenție descrie producerea și caracterizarea iaurtului hiperimun PC-2 care conține ou integral hiperimun sau gălbenuș provenind din oul hiperimun sau proteine specifice extrase din ouăle hiperimune și care reacționează cu unul sau mai multe antigene pentru care au fost imunizate găinile de la care provin ouăle. Ouăle hiperimune pot fi utilizate integral, doar gălbenușul sau doar proteinele extrase din ou. Ouăle hiperimune provin de la păsări (*Gallus domesticus*) imunizate cu antigene preparate din bacterii, virusuri și fungi. Prezenta invenție se referă la prepararea iaurtului PC-2, coagulat sau lichid, în amestec cu ou integral hiperimun sau cu gălbenuș din ouăle hiperimune sau cu proteine specifice (IgY și OTf) extrase din ouăle hiperimune care provin de la găini hiperimunizate cu antigene preparate din bacterii rezistente la antibiotice izolate de la pacienți cu semne clinice internați în spitalele din România. Proteinele specifice pot fi monovalente, dacă găinile au fost imunizate cu un singur antigen sau polivalente dacă găinile au fost imunizate cu un antigen multiplu preparat din mai multe specii de microorganisme. Prezenta invenție se referă la prepararea iaurtului PC-2 cu ou integral, gălbenuș sau proteine specifice față de antigene preparate din bacterii, virusuri și fungi izolate de la pacienții din spitalele din România rezistente sau nu la antibiotice.

Prezenta invenție caracterizează din punct de vedere imunologic iaurtul PC-2.

Prezenta invenție este complementară cererilor de Brevet de invenție depuse la OSIM cu nr. A/00156 din 25.02.2014, A/00653 din 28.08.2014, A/00810 din 29.10.2014, A/00008 din 13.01.2015.

PREZENTAREA STADIULUI TEHNIC INCLUSIV BIBLIOGRAFIE

Helicobacter pylori este cea mai importantă infecție a mucoasei stomacului la om. Gastrita și ulcerul gastric produse de *H. pylori* joacă un rol important în dezvoltarea carcinomului gastric (1, 2), bacteria fiind recunoscută ca și agent carcinogen de gradul I la om de către Organizația Mondială a Sănătății (3). Cel mai frecvent, infecția cu *H. pylori* nu se exprimă clinic. În același timp infecția cronică este strâns legată de apariția afecțiunilor gastrice (precum gastrita atrofică, ulcerul peptic și metaplazia intestinală). Eradicarea *H. pylori* înainte de apariția atrofiei și metaplaziei intestinale este considerată eficientă în inhibarea dezvoltării cancerului gastric (4).

H. pylori infectează aproximativ 50% din populația lumii, anual fiind diagnosticate aproximativ 750.000 de cazuri noi (3). În România infecția cu *H. pylori* a fost depistată la 68,5% dintre persoanele adulte din județul Timiș în 2003 (5). La un institut de gastroenterologie din Craiova în perioada 2007 - 2010 s-a observat că 57,40% dintre pacienții cu gastrită au fost pozitivi pentru *H. pylori* (6).

Tratamentul cu antibiotice a dat rezultate cu privire la eradicarea infecției cu *H. pylori*. Tratamentul cuprinde folosirea metronidazolului, amoxicilinei, claritromicinei și un inhibitor de pompă protonică sau bismut (7, 8, 10 - 12). În prezent 10 - 000000000015% din cazuri s-au dovedit incurabile deoarece unele tulpini de *H. pylori* au devenit rezistente la antibiotice (7, 9, 10, 13, 16). Creșterea numărului de tulpini rezistente la antibiotice complică tratamentul infecției cu *H. pylori*.

Studii recente au dovedit că imunoglobulinele extrase din gălbenușul ouălor (IgY) care provin de la găini imunizate cu *H. pylori* se pot folosi cu succes în tratamentul preventiv și curativ al infecției cu această bacterie la om (8, 14, 15, 17, 18).

Cercetări privind utilizarea imunoglobulinelor extrase din gălbenușul (Ig Y) ouălor provenite de la păsări imunizate cu antigene preparate din *H. pylori* au arătat că administrarea orală a IgY specific anti-*H. pylori* inhibă activitatea patogenă a bacteriei la gerbilii infectați

experimental și previne colonizarea la cei neinfecțați (19). La oameni asimptomatici infectați cu *H. pylori* s-a observat o reducere semnificativă a valorilor obținute la testul respirator de depistare a ureei după administrarea orală a IgY specific anti- *H. pylori* timp de 4 săptămâni (15).

Pe de altă parte, produsele din lapte fermentat cu adaos de bacterii vii probiotice, precum lactobacilii, pot contribui la îmbunătățirea eradicării *H. pylori* cu 5-15%, când sunt utilizate ca adjuvante la terapia clasică (20). Utilizarea probioticelor poate contribui și la reducerea efectelor adverse ale terapiei clasice (21).

Astfel, combinarea efectelor benefice ale iaurtului cu efectele benefice ale imunoglobulinei specifice anti-*H. pylori* poate veni cu succes în completarea terapiei clasice a infecției cu *H. pylori* la om, mai ales în cazul infecțiilor cu tulpini bacteriene rezistente la antibiotice.

Utilizarea iaurtului în amestec cu ou integral hiperimun sau cu gălbenuș care provine din oul hiperimun sau cu imunoglobuline extrase din gălbenușul ouălor hiperimune obținute de la găini imunizate cu antigene provenite de la pacienți din România face subiectul acestui brevet de invenție. Iaurtul PC-2 tratează infecțiile cu 14 specii de germeni patogeni specifici care se găsesc în tubul digestiv, inclusiv *H. pylori*.

Până la această dată nu s-a brevetat o astfel de formulă imunologică în care anticorpul specific extrași din oul hiperimun ce provine de la găini imunizate cu antigene preparate din tulpini bacteriene patogene izolate de la pacienți cu exprimare clinică a bolii să fie incluși în iaurt.

Bibliografie

1. Shin J.H., Yang M., Nam S.W., Kim J.T., Myung N.H., Bang W.G., Roe I.H. 2002. *Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of Helicobacter pylori infection*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9(5):1061-1066.
2. Blaser M.J. 1992. *Hypotheses on the pathogenesis and natural history of Helicobacter pylori induced inflammation*. Gastroenterology 102:720-727.
3. Rahman S, Van Nguyen S, Icatlo FC Jr, Umeda K, Kodama Y. 2013 *Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases*. Hum. Vaccin. Immunother. 9(5):1039-48.
4. Kodama M., Murakami K., Okimoto T., Fujioka T. 2013. [*The effect of Helicobacter pylori eradication on chronic gastritis*]. Nihon Rinsho 71(8):1442-1448.

5. Sporea I., Popescu A., van Blankenstein M., Sirli R., Focșea M., Dănilă M. 2003. *The prevalence of Helicobacter pylori infection in western Romania. Rom J. Gastroenterol.* 12(1):15-18.
6. Dîrnu R., Secureanu F.A., Neamțu C., Totolici B.D., Pop O.T., Mitruț P., Mălăescu D.G., Mogoantă L. 2012. *Chronic gastritis with intestinal metaplasia: clinico-statistical, histological and immunohistochemical study. Rom. J. Morphol. Embryol.* 53(2):293-297.
7. Deloney C.R., Schiller N.L. 2000. *Characterization of an in vitro selected amoxicillin-resistant strain of Helicobacter pylori. Antimicrob. Agents. Chemother.* 44:3368-3373.
8. Parsonnet J., Hansen S., Rodriguez L., Gelb A.B., Warnke R.A., Jellum E., Vogelman J.H., Hriedman G.D. 1994. *Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. N. Engl. J. Med.* 330:1267-1271.
9. Peitz U., Menegatti M., Vaira D., Malfertheiner P. 1998. *The European meeting on Helicobacter pylori: therapeutic news from Lisbon. Gut* 43(Suppl.):S66-S69.
10. Dunn B.E., Cohen H., Blaser M.J. 1997. *Helicobacter pylori. Clin. Microbiol. Rev.* 10:720-741.
11. Gibaldi M. 1995. *Helicobacter pylori and gastrointestinal disease. J. Clin. Pharmacol.* 35:647-654.
12. Trust T.J., Alm R.A., Pappo J. 2001. *Helicobacter pylori: today's treatment, and possible future treatment. Eur. J. Surg.* 586(Suppl.):82-88.
13. Xia H.X., Talley N.J., Keane C.T., O'Morain C.A. 1997. *Recurrence of Helicobacter pylori infection after successful eradication: nature and possible causes. Dig. Dis. Sci.* 42:1821-1834.
14. Abdou A.M, Ahmed M.M.E., Yamashita Y., Kim M. 2014. *Immunoglobulin: A Natural Way to Suppress Helicobacter pylori in Humans. Health* 6:781-791.
15. Suzuki H., Nomura S., Masaoka T., Goshima H., Kamata N., Kodama Y., Ishii H., Kitajima M., Nomoto K., Hibi T. 2004. *Effect of Dietary Anti-Helicobacter pylori-Urease Immunoglobulin Y on Helicobacter pylori Infection. Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 20:185-192.
16. Iovene M.R., Romano M., Piloni A.P., Giordano B., Montella F., Caliendo S., Tufano M.A. 1999. *Prevalence of Antimicrobial Resistance in Eighty Clinical Isolates of Helicobacter pylori. Chemotherapy* 45:8-14.
17. Chen J.P., Chang M.C. 2003. *Effect of Anti-Helicobacter pylori Urease Antibody (IgY) as a Food Ingredient on the Decrease of H. pylori in the Stomach of Humans Infected with H. pylori. Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science* 41:408-414.

18. Yang Y.H., Park D., Yang G., Lee S.H., Bae D.K., Kyung J., Kim D., Choi E.K., Son J.C., Hwang S.Y., Kim Y.B. 2012. *Anti-Helicobacter pylori effects of IgY from egg yolk of immunized hens*. Lab. Anim. Res. 28(1):55–60.
19. Nomura S., Suzuki H., Masaoka T., Kurabayashi K., Ishii H., Kitajima M., Nomoto K., Hibi T. 2005. *Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on Helicobacter pylori infection in Mongolian gerbils*. Helicobacter 10(1):43-52.
20. Sachdeva A., Rawat S., Nagpal J. 2014. *Efficacy of fermented milk and whey proteins in Helicobacter pylori eradication: a review*. World J. Gastroenterol. 20(3):724-737.
21. Srinarong C., Siramolpiwat S., Wongcha-um A., Mahachai V., Vilaichone R.K. 2014. *Improved eradication rate of standard triple therapy by adding bismuth and probiotic supplement for Helicobacter pylori treatment in Thailand*. Asian. Pac. J. Cancer Prev. 15(22):9909-9913.
22. Cerere Brevet Invenție nr. A/00156 din 25.02.2014 – **“Procedeu de obținere și utilizare a imunoglobulinelor de găină (IgY)”** Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin și Georgiana Topilescu.
23. Cerere Brevet Invenție nr. A/00179 din 05.03.2014 – **“Metode de evaluare imunologică a activității specifice a imunoglobulinelor de pasăre (IgY)”** Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin și Georgiana Topilescu.
24. Cerere Brevet Invenție nr. A/00653 din 28.08.2014 – **“Producerea și utilizarea ovotransferinelor moderne (OTF-M)”** Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Mariana Oporanu și Georgiana Topilescu.
25. Cerere Brevet Invenție nr. A/00810 din 29.10.2014 – **“Producerea și folosirea oului hiperimun PC2”** Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Mariana Oporanu, Georgiana Topilescu și Iuliana Mihai.
26. Cerere Brevet Invenție nr. A/00008/13.01.2015 - **“Producerea și utilizarea ovotransferinei PC2 (OTf-PC2)”** Patrascu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Mariana Oporanu, Georgiana Topilescu și Iuliana Mihai.

INVENȚIA PE SCURT

Formularea pe scurt a soluțiilor tehnice

Obiectivul prezentei invenții este iaurtul PC-2 care conține imunoglobuline specifice contra 14 specii de bacterii și fungi patogeni pentru om și animale.

Pentru prepararea iaurtului PC-2 a fost realizat un program intensiv de cercetare care a urmărit:

- obținerea unui produs alimentar care să acționeze specific asupra mai multor epitopi și
- aplicarea unor metode de control care să permită evaluarea corectă a acțiunii acestuia asupra antigenului dat/antigenelor date. Antigenul monovalent sau polivalent a fost utilizat în amestec cu adjuvant QS-21 și s-a folosit un imunomodulator numit aici P, conform metodologiei prezentate în cererea de Brevet de invenție depus la OSIM nr. A/00156 din 25.02.2014 față de care acest brevet de invenție este complementar.

Folosind ca tehnici de laborator testul de imunodifuzie în gel de agar, testul de identificare ELISA și testul de specificitate ELISA, precum și testul de inhibiție a creșterii bacteriilor IMB-PaChi s-a reușit să se caracterizeze o formă nouă de iaurt, iaurtul hiperimun PC-2, care în urma consumului, interacționează specific cu fiecare dintre antigenele folosite la imunizarea găinilor.

Prezenta invenție se referă la obținerea iaurtului hiperimun PC-2 din ou integral, gălbenuș sau imunoglobuline extrase din gălbenușul ouălor provenite de la găini imunizate cu diferite antigene preparate din diferite specii de bacterii, fungi sau virusuri a căror etape de extragere sunt prevăzute în cererea de Brevet de invenție nr. A/00156 din 25.02.2014, precum și caracterizarea acestuia

Iaurtul PC-2 reacționează specific simultan cu unul sau mai multe antigene față de care a fost imunizată găina de la care provine oul integral, gălbenușul sau imunoglobulinele extrase din gălbenuș.

Unul dintre obiectivele prezentei invenții este de a înregistra iaurtul PC-2 ca produs alimentar biologic activ și a înregistra metoda de preparare a acestuia.

DESCRIEREA SUMARĂ A PROCEDURILOR

Subiectul acestui brevet este caracterizarea iaurtului hiperimun PC-2 (iaurt PC-2) ca produs alimentar în baza descrierii de mai jos:

Imunizarea găinilor se face cu un amestec de proteine purificate preparate din corpi bacterieni inactivați, virusuri inactivate sau fungi inactivați în amestec cu adjuvant QS-21, amestec administrat intramuscular conform metodologiei prezentate în cererea de Brevet de invenție A/00156 din 25.02.2014 pentru care prezentul brevet este complementar.

Controlul de calitate privind iaurtul PC-2 (control de calitate a materiei prime și verificarea parametrilor produsului finit conform SR 3665-1996: proprietăți organoleptice, fizico-chimice și microbiologice) revin în sarcina producătorului de iaurt. Suplimentar se efectuează controlul valorii imunologice conform metodologiei prezentate în cererea de Brevet de invenție nr. A/00156 din 25.02.2014.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Iaurtul coagulat sau lichid înainte de a fi omogenizat și repartizat în recipientele de îmbuteliere (condiționare) se amestecă cu 70 mg de IgY reprezentând 4 g de gălbenuș crud, 10 g ou intergal sau respectiv 3 g IgY granulat liofilizat. După omogenizare iaurtul coagulat se repartizează în recipiente din plastic de 100 g sau 200 g sau iaurtul lichid în sticle de 250 sau 450 ml.

1. Prepararea antigenului

Antigenul se prepară în conformitate cu metodologia de producție și control din cererea de Brevet nr. A/00156 din 25.02.2014.

2. Imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF

Găinile se imunizează în conformitate cu protocolul descris în cererea de Brevet de invenție nr. A/00156 din 25.02.2014.

3. Prepararea iaurtului coagulat sau lichid hiperimun PC-2

Iaurtul hiperimun PC-2 se obține în etapa finală a preparării iaurtului, imunoglobulina fiind adăugată înainte de repartizare în recipientul final. Iaurtul hiperimun se obține prin amestecul compoziției de iaurt cu ou integral, gălbenuș sau IgY specific liofilizat, în cantitatea necesară pentru a avea 70 mg de IgY specific la 100 g iaurt.

După amestecul oului integral, a gălbenușului sau a IgY liofilizat cu iaurtul, acesta se omogenizează și se repartizează în recipientul final. Iaurtul hiperimun PC-2 se conservă, se transportă și se comercializează ca și iaurtul standard alimentar.

MODELE RECOMANDATE DE FOLOSIRE ȘI CARACTERIZARE A INVENȚIEI

Exemplele de mai jos au scop ilustrativ și nu sunt prezentate cu intenția de a limita scopul prezentei invenții.

Exemplul 1

Prepararea IgY se face după exemplele din cererea de Brevet de invenție nr. A/00156 din 25.02.2014.

Exemplul 2

Controlul final al iaurtului hiperimun PC-2

- a) Pentru forma finală a iaurtului coagulat sau lichid hiperimun PC-2 se folosesc următoarele metode de control:
- Controlul parametrilor produsului finit conform SR 3665:1999: proprietăți organoleptice, fizico-chimice și microbiologice;
 - Controlul cantitativ al IgY din iaurt;
 - Controlul calitativ al IgY din iaurt.
- b) Se admit în consum uman numai seriile de iaurt hiperimun PC-2 care corespund SR 3665:1999 și care conțin 70 mg de IgY/100 g de iaurt. Se admit în consum numai seriile de iaurt hiperimun PC-2 care conțin IgY specific care reacționează în testul ELISA față de antigenele din care s-a preparat IgY – polivalent (Se, St, Sa, Sp, Sm, Pa, Cd, Ca, Ec, Ab, Hp). Metodologia de control calitativ și cantitativ ELISA este descrisă în cererea de Brevet de invenție A/00156 din 25.02.2014.

Iaurtul preparat cu ou hiperimun PC-2 sau IgY specific liofilizat s-a dovedit a avea capacitatea de a reacționa specific cu epitopi de pe bacteriile și fungii cu care au fost imunizate găinile.

Exemplul 3

A. Determinarea cantitativă a IgY prin testul ELISA indirect

Testul ELISA se pregătește "in house" special pentru fiecare testare în parte. Cantitatea minimă decelată de IgY este 10 nanograme în materialul testat. Datorită specificității și reproductibilității reacției imunoenzimatice testul ELISA se folosește în procesul de producție al IgY, pe faze de producție, în controlul calitativ și cantitativ.

- a) Testul ELISA care urmează a fi folosit în controlul cantitativ al IgY se realizează prin comparație cu un etalon internațional IgY (USA) sau comparativ cu un subetalon IgY preparat la Romvac.
- b) Godeurile se căpтуșesc cu 150 μl IgG de iepure anti pasăre la concentrația de 3,75 μg/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 μl PBS-Tween folosind un spălător automat de plăci;
- e) În fiecare godeu se adaugă 200 μl 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 μl IgY specific sau IgY SPF (25; 12,5; 6,25 μg/ml) în PBS;
- h) În paralel se adaugă în triplicat câte 150 μl IgY standard SIGMA (25; 12,5; 6,25 μg/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 μl IgG anti IgY conjugat cu peroxidază la diluția 1:5000;
- l) Se adaugă 150 μl TMB și se incubează 5-15 minute la temperatura camerei, la întuneric
- m) Se blochează reacția cu 150 μl HCl;
- n) Reacția se citește la spectrofotometru cu filtru DO₄₅₀;
- o) Se fac curbe standard comparative, considerându-se diluția maximă pozitivă 0,200 DO.

B. Determinarea cantitativă a IgY din iaurtul hiperimun prin testul ELISA direct

- a) Placa se căptușește peste noapte la +4°C sau în 2 ore la temperatura camerei cu IgY de testat și cu IgY etalon în trei replicare fiecare, în diluții binare începând cu diluția 1:1000 în soluție carbonat-bicarbonat;
- b) Godeurile A1 și H1 se păstrează ca martori pentru antigen;
- 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 minute;
- 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 (A1 și H1) unde DO₄₅₀ trebuie să fie maximum de 0,060. În cazul când sunt alte valori reacția nu se validează.
- k) Se consideră ca reacție pozitivă pentru prezența IgY, diluția la care DO₄₅₀ este de 0,200 față de IgY standard internațional sau subetalonul Romvac.
- l) Conținutul în μg/ml de IgY se face în raport cu IgY de referință, ținând cont de faptul că ELISA decelează minimum 10 ng/ml și se face prin comparație cu IgY standard.

Exemplul 4

A. Determinarea conținutului de IgY specific prin testul ELISA

Activitatea specifică a IgY se determină calitativ față de antigenul reprezentat de celulele bacteriene inactivate și liofilizate.

- a) Se cătușește o placă ELISA cu 100 μl din suspensia de bacterii liofilizate la 1,67-1,70 μg de celule per ml sau 10 μg de proteină bacteriană per ml în tampon carbonat-bicarbonat (0,05 M, pH 9,6);
- b) Placa cătușită 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 μl/godeu și se incubează 30 minute la temperatura camerei;
- e) Se înlătură lichidul de blocare;
- f) Placa se usucă 30 minute la exicator;
- g) Se repartizează în fiecare godeu 100 μl din suspensia de IgY diluată 1:1000 în diluții binare sau zecimale. IgY 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 negativi de reacție folosind IgY-SPF și godeurile E1, F1 și G1 ca martor pozitiv de reacție folosind IgY-specific de referință Romvac;
- i) Se incubează placa 2 ore la +37°C;
- j) Se spală de 3 ori cu soluție de spălare;
- k) Se adaugă 100 μl de conjugat anti IgG anti-pasăre diluat 1:10000, 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 absorbantă 450 nm.
- q) Se validează reacția când în godeurile martor blank A1 și H1 se obțin valori mai mici de 0,060 DO, în godeurile B1, C1 și D1 martor IgY-SPF (negativ) sunt valori de

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

- r) Se consideră diluția maximă pozitivă diluția la care reacția este egală sau mai mare de 0,200 DO sau valoarea matematică pentru diluția mai mare de 0,200 DO. La această diluție reacția pozitivă este produsă de 5-10 ng de IgY-specific per godeu, per 100 μ l.

EXPERIMENT

ELISA *H. pylori* 011 - Testarea prin ELISA a stabilității Ig Y

S-au testat prin ELISA indirect (vezi pct. 3.A.) probe de iaurt de vechimi diferite în ce privește înglobarea imunoglobulinei în compoziția lor (3, 6, 11 și 20 zile), în câte 3 diluții fiecare.



Foto 1. Imagine ELISA IgY HP 011

Controlul reacției:

Martor antigen (blank) - A1, A8, D4-H5: $DO_{medie} = 0,044$

IgY-SPF (martor de placă negativ) - B1, C1, D1: $DO_{medie} = 0,042$

IgY SPF polispecific etalon Romvac (martor de placă pozitiv) – E1, F1, G1: $DO_{medie} = 1,38$

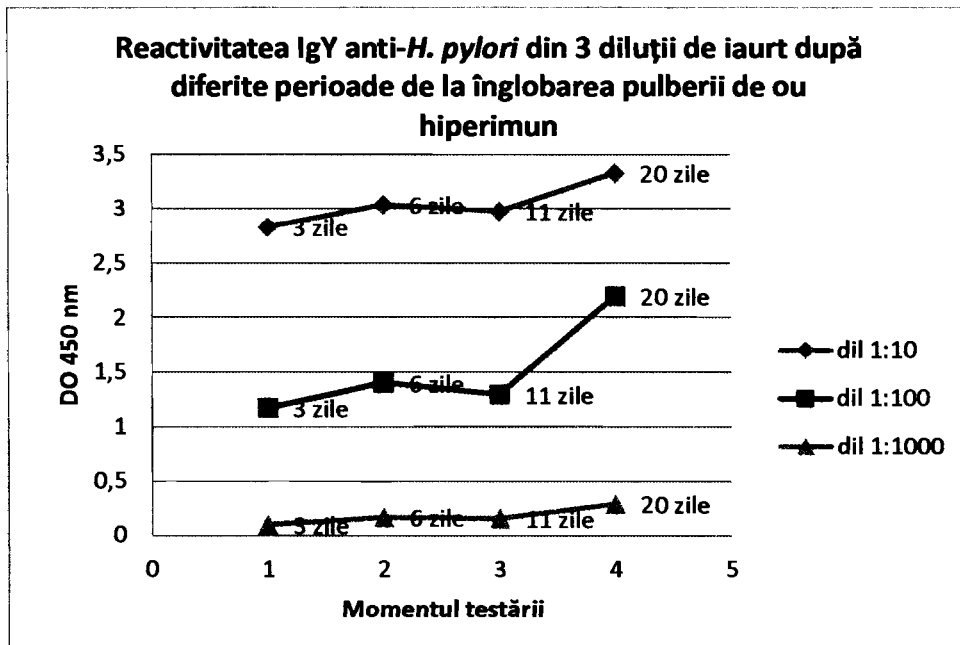
Martor negativ iaurt – B4-C5: $DO_{medie} = 0,039$

Probe în diluții – A2-H3, A4, A5 – $DO > 0,200$

Concluzii test:

Se constată că tehnica a fost executată corect, iar placa nu a influențat reacția enzimatică.

Nu exista diferențe mari între probe, indiferent de vechimea iaurtului. IgY din iaurt și-a păstrat reactivitatea față de antigenul specific (*H. pylori*) și după 20 de zile de la înglobarea imunoglobulinei în compoziția iaurtului.



REVENDICĂRI

Titlul

PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA IAURTULUI HIPERIMUN PC-2 (IAURT PC-2)

1. Metoda de preparare a iaurtului hiperimun PC-2 (iaurt PC-2) este o metodă care se referă la prepararea iaurtului coagulat sau lichid prin amestecul compoziției de iaurt cu ou hiperimun integral, sau cu gălbenuș care provine din ouă hiperimune sau cu imunoglobuline (IgY) și ovotransferină (OTf – PC2) obținute din ouăle de la găini (*Gallus domesticus*) ouătoare imunizate cu un antigen format dintr-un amestec de tulpini bacteriene rezistente sau nu la antibiotice din cadrul aceleiași specii de bacterii sau un antigen format dintr-un amestec de specii de bacterii rezistente sau nu la antibiotice izolate de la pacienți din România și tulpini de *Candida albicans*. Amestecul se realizează în etapa de răcire a laptelui, după pasteurizarea acestuia, înainte de omogenizare, la o temperatură cuprinsă între 70° și 50°C, realizând în același timp și pasteurizarea joasă a produselor conținând IgY, prin menținerea acestei temperaturi 4 - 45 minute, fără distrugerea caracteristicilor imunoglobulinelor.
2. Revendicarea potrivit căreia iaurtul PC-2 este un produs alimentar care conține proteine cu proprietăți imunologice specifice care le permite să se cupleze selectiv la epitopii existenți pe suprafața celulelor bacteriene, ciupercilor și virusurilor folosite la imunizarea activă a găinilor, și care sunt prezente în iaurtul coagulat sau lichid.
3. Revendicarea potrivit căreia iaurtul PC-2 este un produs alimentar care conține proteine cu proprietăți imunologice specifice care le permite să se cupleze selectiv la epitopii existenți pe suprafața celulelor bacteriene, fungilor și virusurilor sensibile sau rezistente la antibiotice izolate de la pacienți.
4. Revendicarea potrivit căreia iaurtul PC-2 este un produs alimentar care conține proteine cu proprietăți imunologice specifice care acționează mono sau poli specific cu fiecare dintre

germenii față de care s-au imunizat găinile de la care provin ouăle care sunt folosite la producerea iaurtului PC-2.

5. Revendicarea potrivit căreia iaurtul PC-2 poate fi folosit ca mijloc de prevenire sau adjuvant în tratamentul infecțiilor bacteriene, virale și micotice existente în tubul digestiv.
6. Revendicarea potrivit căreia iaurtul PC-2 poate fi folosit ca mijloc de prevenire și adjuvant în tratamentul infecției cu *Helicobacter pylori* la om.