



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2017 00340**

(22) Data de depozit: **06/06/2017**

(41) Data publicării cererii:  
**29/12/2017** BOPI nr. **12/2017**

(71) Solicitant:  
• **PĂTRAȘCU IONEL VICTOR,**  
**CALEA DOROBANȚI NR. 134 --138, BL.11,**  
**SC. C ET. 3 AP. 98 SECT. 1, BUCUREȘTI,**  
**B, RO**

(72) Inventatori:  
• **PĂTRAȘCU IONEL VICTOR,**  
**CALEA DOROBANȚI NR. 134 --138, BL.11,**  
**SC. C ET. 3 AP. 98 SECT. 1, BUCUREȘTI,**  
**B, RO**

(74) Mandatar:  
**ANGHEL LUMINIȚA DOINA CABINET DE**  
**PROPRIETATE INTELLECTUALĂ,**  
**STR.GHERGIȚEI NR.1, BL.94B, SC.B,**  
**AP.76, SECTOR 2, BUCUREȘTI**

(54) **COMPOZIȚIE ȘI METODĂ DE PREPARARE ȘI EVALUARE  
A UNUI IMUNOGEN COMPLEX NUMIT I-SPGA, DESTINAT  
PRODUCERII DE PROTEINE IMUNOLOGIC ACTIVE (PIA)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biopreparat imunologic, utilizat în tratamentul deficiențelor imune și infecțiilor cu germeni sensibili sau rezistenți la antibiotice. Procedeu conform invenției constă în imunizarea unor găini ouătoare din rasa Leghorn sau Rhode Island Red, de 18...20 săptămâni, cu un imunogen complex, format din 18...24 antigene preparate din bacterii, levuri, ciuperci, virusuri, paraziți, inactivate cu formol și binar etilenimină în amestec cu glutamat de sodiu, ca imunomodulator, un marker biologic și un adjuvant imunologic uzual, imunogenul fiind structurat în trei variante: un imunogen standard, format din 1...24 antigene, un imunogen specific, format într-un suport imun, realizat după imunizarea cu 20 de microbi, și reimunizat cu un antigen monospecific,

format din șapte tulpini bacteriene ale aceleiași specii, și un imunogen personalizat, format din antigene preparate dintr-un produs patogen prelevat de la un pacient, sau din 20...26 tulpini microbiene frecvent izolate de la pacienți, inocularea fiind realizată parenteral, cu câte 2 ml din fiecare variantă, la un interval de 30 și, respectiv, 44 de zile de la prima inoculare, după care se recoltează ouăle care conțin minimum 300 mg/ou proteine imunologic active (PIA), și din care se folosește gălbenușul pentru IgY, albușul pentru PIA, membrana cochilieră pentru PIA și imunomodulatori, rezultând preparate care se condiționează uzual, în vederea utilizării preventive și curative.

Revendicări: 25



84

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI  
 Cerere de brevet de invenție  
 Nr. a 2017 00340  
 Data depozit 06-06-2017

**COMPOZIȚIA ȘI METODA DE PREPARARE ȘI EVALUARE A UNUI  
 IMUNOGEN COMPLEX NUMIT I-SPGA DESTINAT PRODUCERII DE  
 PROTEINE IMUNOLOGIC ACTIVE (PIA)**

**Inventia se refera la** o compoziție si metoda de obtinere a unui preparat imunogen complex numit I-spga (Imunogen-Ionel Victor Patrascu) care contine antigeni microbieni inactivati in amestec cu un imunomodulator SPGA si un adjuvant QS21, cu care se imunizeaza gainile (Gallus domesticus) pentru stimularea raspunsului imun si obtinerea unor obtinerea unor ouă hiperimune Imunospga, ce conțin proteine imunologic active specifice care se pot folosi la tratamentul deficientelor imune, tratamentul psoriasisului, epidermolizei buloase, a altor dermatite, infectiilor nosocomiale, in tratamentul infectiilor cu germeni sensibili sau rezistenți la antibiotice in aparatul urinar la copii si adulti, in tubul digestiv, in pe/in alte mucoase, tesuturi sau organe.

**Este cunoscut faptul ca** exista preocupari privind imunizarea gainilor cu imunogeni mono sau polivalenti, cu microbi in activati termic, chimic si admnistrati la animale cu diferit adjuvanti, care sunt citate in bibliografia prezentata in continuare.

In perioada 2012-2014 in Romania s-au făcut studii privind producerea oului hiperimun și utilizarea imunoglobulinelor de găină (IgY) pentru realizarea de produse biologice care sa fie folosite in tratamentul unor afectiuni (citate in bibliografie la pct. 13-18). Pentru aceste produse din grupul IMUNOINSTANT se foloseste ca imunogen I-PC2, produs preparat din microbi inactivati cu formol si administrati in amestec cu adjuvantul QS21.

Imunogenul I-PC2 polivalent se prepara din bacterii, levuri, virusuri folosind pentru inactivare o metodă standard cu formol 3%, două ore, la 37 °C. Această metoda nu permite conservarea anumitor fracțiuni antigenice și a unor epitopi prezenți pe structura antigenului. La toate speciile de bacterii s-a folosit aceeași metodă, inactivarea cu formol și formarea imunogenului cu QS21. Sunt unele tulpini bacteriene pentru care tratamentul prin ultrasonare permite creșterea

CONSILIERILOR IN PROPRIETATE INDUSTRIALA DIN ROMANIA  
 INGINER - AVOCAT - EXPERT JUDICIAR  
 ANGHEL LUMINITA DOINA  
 CONSILIER AUTORIZAT O.S.I.M. SI EUROPEAN  
 P.T. MARCI, INVENTII, DESENE SI MODELE  
 NR. 1020-1993  
 CAMERA NATIONALA

suprafeței de contact a antigenelor. La această generație de produse biologice pentru imunizare s-a folosit ca masă antigenică amestecul de antigene provenite de la mai multe tulpini izolate de la pacienți, rezistente sau sensibile la antibiotice care, după inactivare, au fost preparate ca imunogen în amestec cu QS21, un derivat purificat al saponinei.

Succesul unei imunizări depinde de mai mulți factori inclusiv de intervalele de timp dintre prima, a doua și următoarele imunizări. În acest scop s-au realizat numeroase studii când s-au folosit intervalele de 0, 14 și 28 zile sau o dată pe săptămână timp de 7 săptămâni consecutive. Mai mulți autori imunizează puii, la intervale de 10 zile, dar recomandarea generală este ca intervalul dintre prima și a doua injecție de imunogen să fie de cel puțin 4 săptămâni. Acest lucru reflectă memoria imunologică, căreia trebuie să i se acorde timp pentru a se dezvolta.

Compozitiile și metodele cunoscute au mai multe **dezavantaje**, printre care :

- Nu permit conservarea anumitor fracțiuni antigenice și a unor epitopi prezenți pe structura antigenului ;
- Memoriei imunologice a găinii nu i se acorda timpul necesar pentru a se dezvolta și a avea efectele așteptate ;
- se fac imunizări frecvente în perioade scurte de timp, care determină depresie imunologică în loc să stimuleze producerea de anticorpi ( bibliografie pct.29)

**Problema pe care o rezolva inventia de fata este** realizarea unui imunogen nou numit I-spga care are urmatoarele caracteristici importante :

- este compus din antigeni proveniti de la microbi diferiti, izolati de la pacienti din Romania, inactivati cu formol sau binar ethilenimine, dupa metode care permit pastrarea antigenitatii acestor germeni patogeni, resuspendati intr-o solutie tampon imunomodulatoare SPGA si cu adjuvant QS21, imunizarea gainilor ouatoare de rasa Leghorn sau Rhode Island red la intervale diferite de timp, respectiv la 30 si 45 de zile dupa prima administrare, care permitante o relaxare imunologica ;
- se prepara din germeni patogeni specifici izolati de la pacienti care pot reprezenta o anumita zona geografica, spital sau persoana ;
- se reactualizeaza periodic si se poate realiza in orice tara in functie de contextul epidemiologic ;
- contine doi markeri biologici G si A care se folosesc pentru identificare.

Prin studiile realizate de noi s-a urmărit îmbunătățirea condițiilor de preparare a imunogenilor, a conținutului antigenic, a complexității antigenelor, a modului de inactivare selectivă și a utilizării unui imunopotențiator. Studiile preclinice și clinice făcute pe om susțin necesitatea utilizării preventive și curative a proteinelor imunologic active (PIA), precum și a altor produse care conțin imunomodulatori, proteine de contact, peptide și radicali prezenți în oul hiperimun.

Preocupările privind oul hiperimun, așa cum este prezentat în această invenție, au avut drept scop îmbunătățirea calității imunogenilor preparați din bacterii, levuri și virusuri și creșterea imunogenității acestora. În acest scop s-a urmărit folosirea ca metodă de inactivare binar ethilen imina și formolul,

*apetit*



fragmentarea corpurilor bacterieni prin tratament cu ultrasunete și inactivare cu radiații gamma.

**Inventia inlatura dezavantajele prin aceea ca :**

- se obtine un preparat imunogen complex care contine antigeni microbieni inactivati prin metode care pastreaza mai bine structura epitipilor si care in amestec cu un imunomodulator de tip SPGA permite stimularea mai puternica a sistemului imun al gainilor, iar prezenta markerilor biologici permite identificarea imunogenului ;
- imunizarea gainilor cu imunogenul I-spga care permite structurarea pe grupe, după destinația medicală, adica Imunogen standard ( format din 1-24 de antigeni) Imunogen specific ( format intr-un suport imun realizat dupa imunizarea cu 20 de microbi si reimunizat cu un antigen monospecific alcatuit dintr-un amestec de sapte tulpini bacteriene ale aceleiasi specii) si Imunogen personalizat, care poate fi alcatuit dintr-o masa antigenica preparata dintr-un produs patogen prelevat de la un pacient sau, dintr-o masa antigenica polivalenta obtinuta din 20-26 de tulpini microbiene frecvent izolate dintr-un spital, sau tulpini microbiene frecvent izolate de la pacienti dintr-o anumita zona geografica sau tara ;
- imunizarea gainilor cu imunogenul I-spga alcatuit din antigenii preparati din microorganisme (bacterii, levuri, ciuperci, virusuri, paraziti), inactivate cu formol (citate in bibliografie la pct.19) sau binar ethilenimine (citate in bibliografie la pct.12), in amestec cu SPGA ca imunomodulator (citate in bibliografie la pct.1-7) si QS21 ca adjuvant.
- Utilizarea glutamatului care acționează asupra limfocitului T de la găină, crește semnalul antigenic și face ca limfocitul matur să preia, să depoziteze și să transfere de la variabila V proprie pe variabila V a limfocitului B hiperactiv, comenzi care să permită producerea de imunoglobuline cu afinitate mai mare față de antingenele care au produs inițial informația.

Până la această dată nu s-a folosit glutamatul de sodiu ca imunomodulator, în imunogenul preparat din 18-26 de antingene de la bacterii, virusuri, ciuperci sau levuri. Studii recente au arătat că glutamatul nu numai că are un rol de neurotransmițător, dar are și un rol important de imunomodulator. În acest sens, mai mulți receptori de glutamat au fost recent descriși pe suprafața celulelor T, în timp ce transportatorii de glutamat au fost exprimați în celule prezentatoare de antigen, cum ar fi celulele dendritice și macrofagele. Această opinie integrează și rezumă diferitele descoperiri în acest domeniu în curs de dezvoltare. Este necesar să se studieze rolul glutamatului ca imunomodulator cheie în inițierea și dezvoltarea imunității celulelor T mediată în țesuturile periferice, cât și în sistemul nervos central (citate in bibliografie la pct.10,11).

*recepta*



Folosind acest tip de imunogen numit I-spga, in cele trei variante standard, specific si personalizat, se obține un răspuns imun mai puternic la găina imunizată și anticoprii au o capacitate mai mare de reacție. Acești anticorpi IgY sunt prezenți în gălbenuș și membrana vitelină. In albuș sunt înregistrate proteine imunologic active dintre care ovotransferina apo și holo, ovomucina, ovoalbumina și lizozimul. Aceste produse se găsesc în albus, în membrana cochiliera și în coaja oului de pe care nu s-a detașat membrana cochilieră. Aceste produse prezente în albuș sub formă de proteine imunologic active potențează din punct de vedere imunologic întregul ou hiperimun și diversifică produsele biologice și formele de tratament.

**Compoziția unui preparat imunogen complex numit I-spga si metoda de obtinere a acestuia, conform inventiei, consta intr-un imunogen produs printr-o tehnologie prin care să se păstreze structurile antigenice cât mai apropiate de structura inițiala, să permită obținerea unui răspuns imun complex, un răspuns imun pentru mai mulți epitopi, creșterea puterii de cuplare a anticorpilor inclusiv amplificarea avidității proteinelor imunologic active, creșterea combinației dintre afinitate și aviditate.**

Imunogenul I-spga inoculat la găini rasa Rhode Island Red sau Leghorn convenționale sau a găinilor ouătoare SPF produce un răspuns imun corespunzător și pentru o perioadă de peste 40 de săptămâni. Răspunsul imun specific este egal pentru fiecare antigen în parte, dintr-un complex de până la 24 de antigene. Fiecare antigen este format dintr-un amestec de minimum 7 tulpini ale aceleași specii de microorganism, toți germenii fiind izolați de la pacienți din România, în perioada 2016-2017. Imunogenul administrat la găini trebuie să aibă capacitatea de a forma, într-un stadiu preembrionar, molecule biologice active. Toate moleculele imunologic active dintre care ovoalbumina, ovotransferina forma apo și forma holo, lizozimul și ovomucina, reacționează imunologic specific pentru fiecare dintre antigenele cu care a fost imunizata găina, similar IgY.

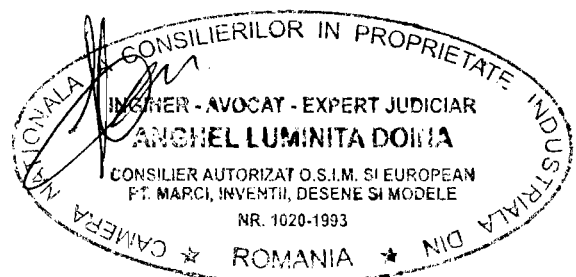
Imunogenul numit I-spga poate fi identificat prin doi markeri G și A folosind tehnicile menționate în prezenta inventie. Nici un alt produs similar, la aceasta dată, nu folosește pentru identificare markeri biologici.

În urma unor studii preclinice și clinice pe găini și om care răspund mai multor necesități tehnice și terapeutice s-au realizat:

1. Imunogenul standard I-spga - care cuprinde antigene preparate din 18-26 tipuri de germeni patogeni izolați de la pacienți.

Cu I-spga se imunizează loturi de găini producătoare de ouă hiperimune standard, care se folosesc în producția de proteine imunologic active (PIA).

*cuprins*



Ouăle hiperimune standard - provin de la găinile inoculate cu imunogen standard și sunt folosite pentru tratamentul deficiențelor imune, în programele de prevenție și tratament al infecțiilor nosocomiale, a rezistenței la antibiotice etc.

2. Imunogenul specific I-spga - care se compune dintr-un antigen preparat din minimum de șapte tulpini de la aceeași specie de bacterii sau levuri. Acest antigen se prepară în amestec cu SPGA ca imunopotențiator și cu QS 21 ca adjuvant.

Acest imunogen-S se folosește la reimunizarea găinilor inoculate cu imunogen standard. În final se obține un răspuns imun complex format din răspunsul imun standard și cel specific. Se recomandă în tratamentul infecțiilor cu *Clostridium difficile*, candidoze, *E coli*, *K. pneumoniae*, etc.

Ouăle hiperimune specifice - provin de la găini inoculate cu imunogen standard și care, la un interval de minimum 30 de zile, sunt inoculate cu cel de al doilea imunogen-S.

3. Imunogenul personalizat I-spga - care se prepară din produsul patologic prelevat de la un pacient care se amestecă cu SPGA ca imunopotențiator și cu QS21 ca adjuvant. Acest imunogen-P se inoculează la găini deja imunizate cu imunogenul standard. Imunogenul personalizat se poate realiza dintr-un produs patologic format dintr-un număr de 2-20 de tulpini microbiene izolate frecvent într-un spital sau dintr-o zonă geografică sau țară, cu care să constituie masa antigenică

Ouăle hiperimune personalizate - care provin de la găini inoculate cu imunogen standard și care, la un interval de minimum 30 de zile sunt inoculate cu cel de al treilea imunogen-P.

Imunogenul I-spga conține un antigen complex a cărei compoziție depinde de scopul pentru care se prepară oul hiperimun I-spga, astfel:

-Antigenul standard - conține un amestec de 18-26 antigene preparate din corpi bacterieni, levuri, fracțiuni din corpii bacterieni sau levuri obținute prin ultrasonare, virusuri și ciuperci.

Antigenele bacteriene și din levuri sunt la rândul lor un amestec de minimum 7 tulpini bacteriene rezistente sau sensibile la antibiotice și 5-7 tulpini de levuri izolate de la pacienți, rezistente sau sensibile la antibiotice.

-Antigenul specific - este o componentă care se administrează suplimentar și este formată din 5-7 tulpini bacteriene reprezentative ale fiecărei specii interesate. Acest antigen, preparat sub forma de imunogen, se inoculează la 30-40 de zile după imunizarea găinilor cu imunogenul standard.

-Antigenul personalizat - este format din detritusurile celulare și conținutul microbial prelevat ca material patologic de la pacient, de pe plăgile infectate, de pe plăcile psoriazice, de pe mucoase sau din urină. Bacteriile izolate din produsul patologic se cultivă în laborator, se identifică și se inactivează, formând o parte din conținutul antigenic personalizat. După prepararea imunogenului în amestec cu SPGA și QS21 se inoculează la găinile imunizate standard, la 30-40 zile de la imunizarea primară.

*reputat*



Imunogenii - de tip standard, specific, personalizat, sunt reprezentați de un amestec de antigene microbiene, câte 20 mg din fiecare, care se diluează în 0,5 ml SPGA și respectiv 0.5 ml QS21, pentru fiecare găină în parte.

Administrarea imunogenului standard - se face pe găini Rhode Island Red, Leghorn convenționale sau păsări SPF în vârstă de 18-20 săptămâni, câte 1 ml imunogen intramuscular. Imunizarea se repetă la 30 și respectiv 44 de zile.

Controlul răspunsului imun se face la 8-10 zile de la prima inoculare prin prelevarea de sânge și din ouale hiperimune recoltate de la aceste găini hiperimune.

Din ouale hiperimune se extrage IgY-specific din galbenus și proteine imunologic active din albus și se testează folosind testele de seroaagelutinare rapidă și seroaagelutinare lentă, testul de seroprecipitare în gel de agar Mancini și Oucherloni și teste ELISA directe și competitive.

Imunizarea suplimentară cu antigen monospecific sau cu antigen personalizat - se face după același procedeu.

La controlul efectuat la 30, 44 și, respectiv, 68 de zile se stabilește numărul total de păsări care au răspuns imun, specificitatea răspunsului imun. La 68 de zile după prima imunizare se fac și controale cantitative și calitative pentru toate antigenele folosite la imunizare.

Pentru controlul răspunsului imun după prima imunizare se extrage IgY și se testează calitativ și cantitativ folosind testele ELISA și seroaaglutinarea rapidă și seroaaglutinarea lentă.

Imunogenul se conservă la +4 °C și se testează pentru răspunsul imun specific la găinile inoculate după 8, 44 și 58 zile de la prima inoculare.

Programul de imunizare este valid și ouăle hiperimune I-spga se pot folosi în producție dacă răspunsul imun este uniform la toate păsările inoculate și cantitatea de IgY este de minimum 300 mg/ou.

În cazul producției de I-spga personalizat se pot folosi ouăle chiar la 8 zile de la prima inoculare dacă răspunsul imun este pozitiv, specific și în oul hiperimun I-spga-P există minimum 200 mg IgY.

Obținerea imunogenului I-spga se face astfel:

- Imunogenul standard I-spga - este un produs biologic preparat din 20-24 antigene microbiene cu care se imunizează găinile ouătoare. Antigenul este reprezentat de bacterii, levuri izolate de la pacienții internați în spitale în perioada 2016-2017. Din acest produs se imunizează găina și se obține oul hiperimun standard.

- Imunogenul I-spga specific - la imunogenul preparat din cei 16-20 de germeni se adaugă în mod special un imunogen specific unei specii bacteriaane sau de levuri, inactivat în aceleași condiții, cu etilenimină binară (BEI) și formol. Acest imunogen specific se adaugă peste imunogenul standard sau se imunizează suplimentar păsări care sunt imunizate cu I-spga standard, având în structura sa 16-20 tipuri de anticorpi.

*urata*





- Imunogenul I-spga personalizat - se obține prin izolarea unui material patologic de la un pacient la care tratamentul cu imunogenul I-spga standard nu a dat rezultate, care se inactivează cu BEI și formol și, după purificare, se amestecă cu SPGA, adjuvant QS21 și Tween 20. Apoi se amestecă cu imunogenul standard și se imunizează un lot nou de găini sau se imunizează direct găini imunizate standard.

În acord cu prezenta invenție, prepararea imunogenului I-spga-standard, I-spga-specific și al I-spga personalizat cuprinde o serie de etape dintre care: prepararea antigenelor, prepararea și controlul imunogenilor I-spga.

#### Prepararea antigenului

În acord cu prezenta invenție se prepară câte 18-26 antigene din diferite specii de germeni patogeni izolați de la pacienți. Tulpinile bacteriene și de levuri folosite în acest scop pot fi sensibile sau rezistente la antibiotice. Aceste tulpini fac parte din colecția laboratorului și provin din spitale din București sau de la pacienții care s-au prezentat pentru tratament în cabinetele medicale de la IMUNOMEDICA-SH. Pentru controlul tulpinilor izolate de la pacienți se folosesc tulpini din colecții internaționale importate oficial, cu certificat de calitate și garanții științifice.

Pentru I-spga specific - se structurează un antigen-S pentru fiecare microorganism în parte, care conține cele mai reprezentative și mai frecvent întâlnite specii/tulpini la pacienți ca subtipuri.

De exemplu pentru specia Staphylococcus, amestecul este format din S. aureus, S. lugdunensis, S. haemolyticus, S. warneri, S. schleiferi, S. intermedius, S. saprophyticus. Alegerea tulpinilor bacteriene sau de levuri se face în conformitate cu standardele internaționale, dar acestea provin de la pacienți din România.

În structura unui imunogen I-spga sunt incluse: Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Fusobacterium nucleatum, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus spp., Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Corynebacterium spp. Corynebacterium diphtheriae, Klebsiella spp, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Proteus spp., Candida glabrata, Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei - ATCC 14243, Candida parapsilosis -ATCC 22019, Streptococcus pneumoniae, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, Acinetobacter baumani, Clostridium difficile forma vegetativă, Clostridium difficile forma sporulată, Clostridium difficile exotoxine A și B, Pseudomonas aeruginosa, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, compoziția antigenică fiind în funcție de frecvența infecțiilor cu germeni rezistenți la antibiotice sau la cerere.

Pentru I-spga-personalizat - se prepară un antigen-P care este format din detritusuri celulare și grupul de germeni patogeni existenți pe plăcile psoriazice, alte plăgi fără tendință la cicatrizare sau produse patologice prelevate de pe mucoase, sputa, urină. Celulele bacteriene, cultivate, înmulțite și identificate sunt spălate în tampon fosfat (PBS) de 3 ori și centrifugate la 4000 rpm la 20 °C, 15

cupat





minute, sunt inactivate cu BEI sau formol sau radiatii gama și sunt liofilizate în flacoane de 10 ml, câte 4 ml suspensie bacteriană în fiecare flacon. După liofilizare flacoanele se conservă la  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 50 mg corpi bacterieni se resuspendă în soluție SPGA la concentrația care reprezintă densitatea optică  $\text{DO}_{600} = 1,00$  și se amestecă cu 45  $\mu\text{l}$  de adjuvant QS21.

#### Prepararea imunogenilor

Obținerea imunogenului este cea mai importantă etapă din programul de obținere a proteinelor imunologic active, etapă în care, în organismul găinilor inoculate cu acest produs, se realizează un stimul antigenic complex care să permită transferul pe variabila V a limfocitului T imatur a informațiilor antigenice care ulterior, odată cu transformarea limfocitului naiv în limfocit matur, să depoziteze informația în ADN și să se cloneze imediat.

Limfocitul T matur transferă informația privind structura antigenelor către limfocitul B care, la randul lui, produce imunoglobuline. Aceste imunoglobuline sunt transferate în gălbenuș care, la rândul lui, este integrat în ou.

Singurele locuri din ou unde se găsesc imunoglobulinele (IgY) este gălbenușul și membrana vitelină. În albuș, membrana cochiliera și coaja oului nu există IgY (Pătrașcu I.V. date nepublicate).

Inactivarea germenilor patogeni se face diferit în funcție de fiecare microorganism în parte cu formaldehidă, 2-bromhidrat bromoethylamine (BEA) sau tiosulfat de sodiu, care au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. Sistemele de inactivare sunt:

#### Inactivarea cu formol și etilenimină binară (BEI)

Această metodă de inactivare se folosește pentru diferite bacterii printre care *Clostridium difficile*, forma vegetativă și forma sporuată.

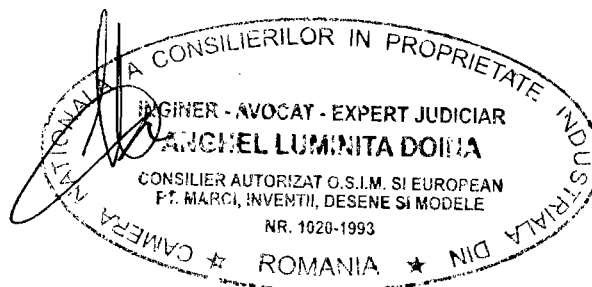
Acest test are la bază o evaluare cinetică de inactivare. În condiții optime, ratele de inactivare ale BEI sunt de  $0.5-1.0 \log_{10}$  pe oră. În general, inactivarea definitivă se produce după 48 de ore. Formaldehida, agentul "clasic" de inactivare, inactivează bacteriile la o rată de numai  $0,3 \log_{10}$  pe oră.

În acest program de inactivare, formaldehida se adaugă de la început, imediat după ce s-a făcut amestecul între suspensia de bacterii cu BEI, la începutul procesului de inactivare. În aceste condiții rata de inactivare este mai mare, de  $2-3,5 \log_{10}$  pe oră.

Acest procedeu permite inactivarea peste noapte la niveluri înalte de protecție a antingenelor. Este cunoscut faptul că formaldehida face și legături încrucișate între proteinele prezente în materialul inactivat, legături care stabilizează antigenul (citate în bibliografie la pct 12).

După inactivare, suspensia se conservă la  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  și se face controlul inactivării. Dacă inactivarea a fost completă se separă masa antigenică prin centrifugare la 4000-6000 rpm, se elimină excesul de formol prin filtrare tangențială și se resuspendă în SPGA la o concentrație care să reprezinte 20 mg de proteină/ml.

capitlu



După suspendarea antigenului în SPGA se face amestecul anaparte cu adjuvantul QS21. Imunogenul se conserva la +4 °C până la utilizare.

BEI se preparată prin ciclizarea 0,1 M bromhidrat bromoethylamine (BEA)(Sigma) în soluție de NaOH 5M 0.1 g pentru o oră la temperatura camerei după metoda din Bahnemann (12). Ciclizarea 0,1 M BEA în formă activă a fost confirmată de către BEI prin schimbarea pH-ului de la 12 la 8.

Soluția a fost proaspăt preparată înainte de fiecare experiment. Controalele pentru inactivarea cu BEI au fost efectuate folosind formaldehida ca martor de inactivare și o cultură netratata ca martor.

#### Inactivarea cu formol

Suspensia bacteriana se inactiveaza cu formol 0.5% timp de 4 ore la 37C si timp de 48 de ore la +4C. După inactivare, se face controlul inactivării. Dacă inactivarea a fost completă se separă masa antigenică prin centrifugare la 4000-6000 rpm, se elimină excesul de formol prin filtrare tangențială în instalații cu casete de 0.45 μm se resuspendă în SPGA la o concentrație care să reprezinte 20 mg de proteină/ml. După suspendarea antigenului în SPGA se face amestecul anaparte cu adjuvantul QS21. Imunogenul se conserva la +4 °C până la utilizare.

#### Inactivarea cu BEI pentru virusuri

Suspensia virala de virus rabic Flury și CVS 6 ore la 37C se inactivează cu BEI, cu agitare și corectarea pH la 7,6. După inactivare se neutralizează BEI cu BEA.

#### Amestecul antigenului cu SPGA ca imunopotențiator

Antigenele bacteriene, preparate standard, specifice și personalizate, conservate la +4°C, după confirmarea inactivării, se centrifughează la 4000 rpm timp de 30 minute, iar sedimentul se resuspendă în SPGA și se agită la temperatura camerei timp de 30 minute pentru omogenizare.

#### Amestecul antigenului cu SPGA și QS21 ca adjuvant

Peste amestecul de antigen și SPGA se adaugă anaparte adjuvantul QS21 în diluție de 02% și se agită 15 minute pentru omogenizare. Se repartizează în recipiente sterile și se conservă până la utilizare la +4 °C.

Utilizarea produselor I-spga pentru imunizarea gainilor ouatoare si controlul imunizarii :

#### Imunizarea găinilor ouătoare convenționale sau SPF

Tehnica de imunizare a găinilor ouătoare cu antigenul selectat este bine cunoscută. Prezenta invenție poate folosi orice fel de metodă de imunizare a găinilor care permite administrarea antigenului dat pe orice cale: intramusculara, subcutanată, intracutanată, intramusculară, intravenoasă.

- Pentru imunizare și pentru controlul imunizarii, se folosesc găini ouătoare convenționale Rhode sau găini ouătoare Leghorn alb SPF în vârstă de la 18-20 de săptămâni.

*scutit*



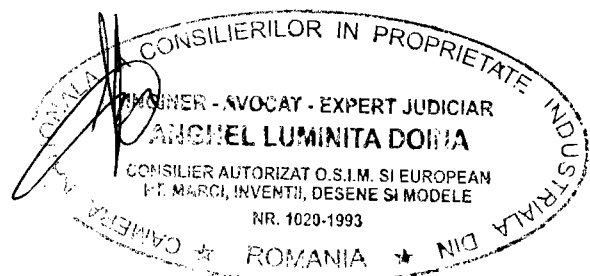
K

- Imunogenul I-spga standard, specific sau personalizat se administrează parenteral, intramuscular 2ml per găină, câte 0,5 ml, în patru puncte diferite în musculatura pieptului.
- Imunizarea găinilor se continuă și se repetă administrarea I-spga după 30 și, respectiv, 44 de zile de la prima inoculare.
- Controlul răspunsului imun se face direct din oul hiperimun sau din ser. Controlul răspunsului imun se face la 8, 30 și respectiv 44 de zile de la prima administrare.
- Controlul final se face la 14 zile de la ultima imunizare și periodic în toată perioada de exploatare a găinilor imunizate.
- Din ouăle recoltate pentru control se extrage IgY prin metoda simplificată, la rece. În acest scop se separă gălbenușul și se prelucrează individual prin extragerea IgY la rece, în apă deionizată acidifiată cu 0.1 N HCl la pH 5,1 într-un raport de 1:8; se incubează la +4 °C peste noapte. Se separă IgY din apă prin centrifugare la 4000 rpm timp de 15 minute și se folosește supernatantul. Supernatantul, care reprezintă imunoglobulinele extrase cu apa la pH 5,1 pot fi conservate prin congelare în tuburi de 1 ml la -20 °C sau la -85 °C. Se recomandă, pentru activitățile de control de rutină, să se folosească thimerosal pentru limitarea multiplicărilor bacteriene. Thimerosalul este mai bun decât azida, deoarece produsele cu azidă nu se pot testa prin ELISA.
- Albușul se prelucrează separat pentru a fi folosit la prepararea de produse biologice care se pot folosi la om și animale. Membrana cochilieră se extrage din coajea oului și se folosește separat pentru diferite formule de produse biologice pentru uz extern la om și animale. Din coaja oului hiperimun se pot prepara produse ca sursă de calciu prin uscare și granulare. În cea de a doua variantă coaja oului se poate amesteca cu membrana cochilieră constituind un alt produs.

#### Extragerea IgY

- Gălbenușul se separă de albuș, se extrage după ruperea membranei viteline de la ouăle colectate de la găinile imunizate după 8 sau 30 zile de la ultima administrare a antigenului dat.
- Se măsoară volumul gălbenușului după care se amestecă cu apă distilată la +4 °C, pH 4,5, în raport de 1:8 și se agită cu un turmix timp de 2 minute la temperatura camerei.
- Se corectează pH-ul la 4,5 și se adaugă Thimerosal 0,01%. Pentru unele produse nu se adaugă thimerosal.
- Amestecul se păstrează 6 ore sau peste noapte la +4 °C.
- Din acest amestec se recoltează faza apoasă care conține IgY.
- IgY extras se prelucrează prin filtrare la temperatura de 20 °C folosind filtre care permit trecerea proteinelor cu greutate mai mică de 20 kDa pentru a se reține biomoleculele insolubile în apă, majoritatea lipide și granule de gălbenuș.
- IgY se conservă 7 zile la +4 °C sau 6 luni la -22 °C. Probele se pot liofiliza, ceea ce prelungește timpul de conservare până la minimum 1 an de zile, în funcție de umiditatea reziduală.

*reputa*



## Controlul imunogenului I-spga

Testele de control pentru imunogenul I-spga au în vedere:

- Sterilitatea microbiologică
- Inocuitatea imunogenului I-spga administrat intramuscular la găini ouătoare
- Evaluarea răspunsului imun al găinilor inoculate cu I-spga la 8 zile și, respectiv, la 14 zile de la ultima inoculare
- Identificarea markerilor biologici G și A care diferențiază aceste produse de alte produse similare din România sau alte țări.
- Evaluarea răspunsului imun al găinilor față de imunogenul I-spga
- Evaluarea răspunsului imun complex față de E coli, K. pneumoniae etc
- Evaluarea capacității I-spga de a transforma molecule de proteină în molecule biologice active

### Sterilitatea microbiologică

Metoda se referă la controlul produsului finit, pentru a verifica dacă există contaminanți microbieni sau fungici în soluția de imunogen I-spga. Microorganismele pot proveni din procesul de producție sau din materialele folosite pentru prepararea imunogenului.

Din flacoanele cu produs finit se prelevează probe cu care se inoculează mediile de cultura lichide tryptic soy broth (TSB) și fluid thioglycollate medium (FTM). Probele se incubează la +30-35 °C și, respectiv, 20-25 °C pentru o perioadă de 14 zile.

Seria de imunogen I-spga este admisă pentru uz în condițiile în care produsul este steril microbiologic.

Inocuitatea imunogenului I-spga administrat intramuscular la găini ouătoare  
Determinarea inocuității (siguranței) imunogenului I-spga, administrat intramuscular la găini ouătoare a inclus studii privind reproducerea la găini ouătoare în vârsta de 20 săptămâni rasa Rhode Island Red. Studii privind reacția locală și reacția generală, inclusiv influența asupra începerii ouatului, precum și efecte potențial adverse la toate etapele de control (21-30).

Unul dintre principalele obiective ale acestor teste este de a obține un prognostic pentru efectele imunogenului I-spga asupra găinilor, bazat pe efectele observate local, general și asupra ouatului. Testele sunt efectuate pentru a asigura siguranța în utilizare a imunogenului I-spga (31). Aceste efecte pot varia în funcție de specie și depind de biodisponibilitatea și reactivitatea agentului asupra receptorului numit țesut muscular.

Testul de inocuitate pentru imunogenul I-spga

Parametri:

- Reacția la locul de inoculare
- Reacția generală
- Producția de ouă
- Calitatea ouălor



Modul de realizare:

Găini ouătoare: Rhode Island Red în vârsta de 20 săptămâni

Numarul de loturi: 2

- Lot 1: grup pentru controlul imunogenului I-spga unde cantitatea de inocul este de două ori mai mare decât cantitatea de inoculul recomandat pentru administrare intramusculară, în patru puncte diferite.

- Lot 2: grup martor inoculat cu 4 ml PBS steril, câte 1 ml la fiecare punct de inoculare

Numarul de găini per grup: 10

- Cantitatea de imunogen folosită în control: de două ori mai mare decât cantitatea recomandată.

- Calea de administrare: intramusculară

- Numarul de doze: o singură doză

- Dacă se utilizează adjuvant Freund complet sau incomplet: NU

- Durata observațiilor: 30 de zile

Tabel nr 1: Determinarea inocuității imunogenului I-spga seria 3/2017a)

Specificare	Reacție locală	Reacție generală	Producția de ouă	Calitatea ouălelor
Lot 1 (inoculat cu I-spga)	0/10	0/10	8%	corespunzător vârstei
Lot 2 (martor)	0/10	0/10	8,1%	corespunzător vârstei

a) Găini ouătoare Rhode Island red, 20 săptămâni. Numărul de găini/lot: 10. Cantitatea de inocul I-spga 4 ml în 4 puncte diferite. Cantitatea de PBS 2 ml în 4 puncte diferite. Număr de doze:1. Durata observațiilor: 30 de zile

Evaluarea răspunsului imun al găinilor imunizate cu I-spga la 8 zile și la 44 de zile de la prima inoculare

Pentru evaluarea răspunsului imun al găinilor imunizate cu I-spga se folosesc tehnici de laborator pentru controlul precipitinelor (testul ELISA, testul de imunodifuziune în gel de agar radiar Mancini și testul de imunodifuziune dublă Ouchterlony) și al aglutininelor (testul de seroaglutinare rapidă și testul de seroaglutinare lentă). Pentru acțiunea directă a răspunsului imun al găinilor asupra exo toxinelor bacteriene se folosește testul de neutralizarea exotoxinelor *in vitro* față de celule Vero și BHK.

#### Identificarea markerilor biologici din imunogenul I-spga

Specificare	Markeri biologici <sup>1)</sup>	
	Marker G <sup>a)</sup>	Marker A <sup>b)</sup>
testul ELISA <sup>c)</sup>	prezent	Prezent
testul spectofotometric <sup>d)</sup>	prezent	ND



- a) depistarea spectrofotometrica și ELISA
- b) densitatea optică la diluția de IgY 1:1000
- c) testul ELISA folosind kituri de la Abcam
- d) testul
- f) media a trei replicare

Markerii prezenți în produsele I-spga dovedesc că produsele biologice s-au preparat după tehnologia descrisă în acest brevet. La data înregistrării acestui brevet nu exista nici un produs biologic care să conțină proteine imunologic active care să fie identificate prin markeri biologici adăugați în acest scop.

### Se dau in continuare exemple de realizare a inventiei

Pentru evaluarea imunogenilor I-spga utilizați la imunizarea găinilor, se recomandă controlul răspunsului imun la 8 zile sau la 44 zile de la prima inoculare. În acest scop se efectuează identificarea I-spga prin evidențierea răspunsului imun al găini în ser sau în ou, la inocularea imunogenului care conține un marker biologic (exemplul nr. 1).

Pentru evaluarea răspunsului imun IgY se folosește testul ELISA.

Pentru evaluarea transformării proteinelor din albuș, care devin imunologic active, se folosește testul ELISA și testul de seroaglutinare. Folosind aceste teste se va verifica răspunsul imun al ovotransferinei, ovomucinei, ovoalbuminei și al lizozimului.

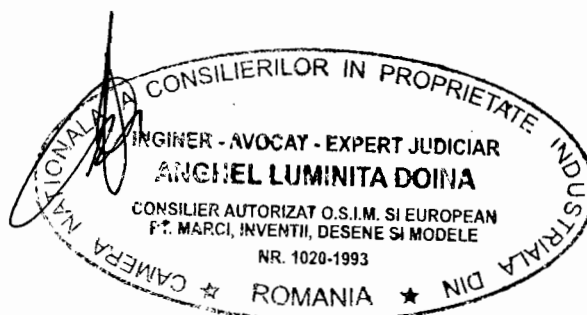
#### Exemplul 1.

Imunogenul I-spga standard - conform inventiei se prepara dintr-un antigen format din 1-26 de specii diferite de bacterii, virusuri, ciuperci, paraziti, inactivate cu formol 0.5%. Germenii patogeni specifici provin de la pacienti din spitalele din Romania si pot fi in amestec pana la sapte tulpini.

Fiecare serie de antigeni, este cel mai recent pachet de microorganisme izolate in laboratoarele spitalelor.

In exemplul nr 1 sunt folosite bacterii izolate de la om in perioada 2016-2017. Acest grup de microorganisme folosit pentru a forma antigenul se poate schimba, in functie de contextul imunologic, de zona geografica sau tara unde se foloseste.

In acord cu prezenta invenție se prepară 20 antigene din diferite specii de germeni patogeni izolați de la pacienți. Tulpinile bacteriene folosite în acest scop sunt rezistente la antibiotice. Aceste tulpini fac parte din colecția laboratorului și provin din spitale din București. Alegerea tulpinilor bacteriene sau de levuri se face în conformitate cu standardele internaționale, dar acestea provin de la pacienți din România.



Pentru I-spga se structurează un antigen pentru fiecare microorganism în parte, care conține cele mai reprezentative și mai frecvent întâlnite specii/tulpini la pacienți ca subtipuri dintre care. *Staphylococcus aureus*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. saprophyticus*. În structura imunogenului I-spga sunt incluse: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium spp.* *Corynebacterium diphtheriae*, *Klebsiella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus spp.*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* - ATCC 14243, *Candida parapsilosis* -ATCC 22019, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumani*, *Clostridium difficile* forma vegetativă, *Clostridium difficile* forma sporulată, *Clostridium difficile* exotoxine A și B, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, compoziția antigenică fiind în funcție de frecvența infecțiilor cu germeni rezistenți la antibiotice sau la cerere.

În acord cu prezenta invenție antigenul standard se prepară prin inactivare cu formol 0.5% timp de 4 ore la 37°C și timp de 48 de ore la +4°C.

După controlul inactivării, dacă inactivarea a fost completă, se separă masa antigenică prin și se elimină excesul de formol prin filtrare tangențială în instalații cu casete de 0.45 μm.

În acord cu prezenta invenție imunogenul standard se prepară prin resuspendarea antigenului inactivat în SPGA la o concentrație care să reprezinte 20 mg de proteină/ml. După suspendarea antigenului în SPGA se face amestecul anaparte cu adjuvantul QS21. Imunogenul se conservă la +4 °C până la utilizare.

#### Exemplul 2.

Imunogenul I-spga specific - conform invenției, rezultă din imunogenul preparat din cei 1-26 de germeni cu care s-a imunizat gaina ca produs standard, la care se adaugă în mod special un imunogen specific unei specii bacteriene sau de levuri, inactivat în aceleași condiții, cu etilenimină binară (BEI) și formol.

Acest imunogen specific se adaugă peste imunogenul standard sau se imunizează suplimentar păsări care sunt imunizate cu I-spga standard, având în structura sa 1-26 tipuri de anticorpi.

#### Exemplul 3

Imunogenul I-spga personalizat, conform invenției se prepară un antigen-P care este format din detritusuri celulare și grupul de germeni patogeni existenți pe plăcile psoriazice, alte plăgi fără tendință la cicatrizare sau produse patologice prelevate de pe mucoase, sputa, urină. Celulele bacteriene, cultivate, înmulțite și





identificate sunt spălate în tampon fosfat (PBS) de 3 ori și centrifugate la 4000 rpm la 20 °C, 15 minute, sunt inactivate cu BEI sau formol sau radiații gama și sunt liofilizate în flacoane de 10 ml, câte 4 ml suspensie bacteriană în fiecare flacon. După liofilizare flacoanele se conservă la -20 °C. 50 mg corpi bacterieni se resuspendă în soluție SPGA la concentrația care reprezintă densitatea optică  $DO_{600} = 1,00$  și se amestecă cu 45 μl de adjuvant QS21.

#### Exemplul 4

##### Identificarea imunogenului I-spga

Conform prezentei invenții imunogenul I-spga se poate identifica prin depistarea markerilor biologici G și A. I-spga conține în componențele sale markerii A și G, două proteine care se pot evidenția în laborator folosind testul ELISA, seroaglutinarea și imunodifuziunea în gel de agar.

Markerul G. Markerul G indică prezența în produsele biologice I-spga a glutamatului de sodiu.

Prezența glutamatului de sodiu în produsele biologice I-spga are rol de potențiator al proteinelor imunologic active și neurotransmițător.

Decelarea glutamatului de sodiu în produsele biologice I-spga se face folosind metoda colorimetrică și kitul de evaluare Glutamate Assay Kit (ab83389)/ Abcam, 330 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0FL UK. Glutamatul de sodiu se găsește în imunogenul I-spga, în produsele biologice imunologic active I-spga cât și în IgY extras din gălbenușul ouălor provenite de la găini la care s-a administrat imunogenul I-spga (32,33).

Glutamate Assay Kit (Fluorometric) (ab138883)/ Abcam oferă o metodă rapidă și sensibilă pentru măsurarea glutamatului (acid glutamic), în diferite probe biologice. În acest test, sistemul enzimatic cuplat catalizează reacția dintre acidul L-glutamic și NADP<sup>+</sup> pentru a produce NADPH, care este recunoscută în mod specific de către senzorul NADPH și reciclată înapoi la NADP<sup>+</sup>.

Pe parcursul reacției, este generat un produs cu fluorescență roșie, care la rândul său poate fi detectat cu un cititor de fluorescență pe microplăci la Ex/Em = 540/590 nm (interval Ex/Em = 530-570/ 590-600 nm).

Acest test poate detecta până la 1 μM de acid glutamic. Semnalul poate fi citit și prin absorbanță la OD 570 ± 5 nm, dar sensibilitatea testului este redusă de 10 ori.

##### Markerul A.

Markerul A este albumina bovină folosită pentru protecția proteinelor în mediul lichid și produsele liofilizate. Testul de identificare a markerului A este testul ELISA pentru albumina serică bovină (BSA), număr de catalog CEA248Ge, Wuhan USCN Business Co., Ltd. Abcam. BSA se găsește în imunogenul I-spga, în produsele biologice imunologic active și IgY preparate cu SPGA.

*recepta*



## Exemplul 5

Conform prezentei inventii stimularea sistemului imun de la gaina (*Gallus domesticus*) de catre I-spga se face folosind controlul calitativ si cantitativ al IgY in ouale hiperimune recoltate de la gainile imunizate cu I-spga. In acest scop se foloseste tesul imunoenzimatic si kitul ELISA ab157693, Abcam.

## Exemplul 6

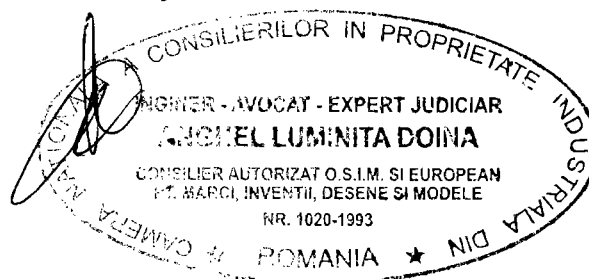
Conform prezentei inventii activitatea specifică a IgY se determină calitativ față de antigenul sau antigenele folosite la imunizare.

Pe plăcile de reacție se atașează stripuri de la diferite antigene din imunogenul I-spga, iar IgY-specific se testează în diluții succesive la diluția 1:100 și, respectiv, 1:1000, în triplicat. Se consideră diluția maximă pozitivă, diluția la care reacția este egală sau mai mare de 0,200 OD sau valoarea matematică pentru diluția mai mare de 0,200 OD. La această diluție reacția pozitivă este produsă de 5-10 ng de IgY-specific per godeu/ 150μl.

Procedură:

- a) Se câptușește o placă ELISA cu 150 μl suspensie de antigen dorit, liofilizat, la 1,67-1,70 μg per ml sau 10 μg de proteină per ml în tampon carbonat-bicarbonat (0.05 M, pH 9.6);
- b) Placa captușită 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 1:100 și 1:1000 conform configurării plăcii. IgY de evaluat se va testa în triplicat;
- h) Se mențin godeul A1, H1 și H2 ca martori pentru antigen, godeurile B1, C1 și D1 ca martori negativi de reacție folosind IgY-SPF și godeurile E1, F1 și G1 ca martori pozitivi;
- i) Se incubează placa 2 ore la +37 °C;
- j) Se spală de 3 ori cu soluție de spălare;
- k) Se adaugă 100μl de conjugat IgG anti pasăre diluat 1:5000, folosind ca diluant tamponul de diluție;
- l) Placa se incubează 2 ore la +37 °C;
- m) Placa se spală de 4 ori cu soluție de spălare;
- n) Se adaugă 100 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 absorbanța 450 nm.

*cupa*



CP

q) Se validează reacția când reacțiile din godeurile martor blank A1, H1 și H2 au valori mai mici de 0,060 OD, când reacțiile din godeurile B1, C1 și D1 martor IgY-SPF (negativ) au valori de 0,060-0,090 OD, iar în godeurile martor pozitiv E1, F1, G1 sunt valori de 1,400-1,800 OD.

Reacția pozitivă la acest control dovedește că imunogenul a produs un răspuns imun corespunzător și specific.

#### Exemplul 7.

Conform prezentei invenții răspunsul imun la I-spga se face folosind imunodifuziunea radiară simplă (IDRS) Mancini care a fost acceptată ca un mijloc sigur de determinare cantitativă a antigenului și/sau a serului folosind un reagent etalon (34-35). Folosind IDRS se poate confirma cu mare acuratețe conținutul de proteină din IgY față de IgG de iepure anti-IgY.

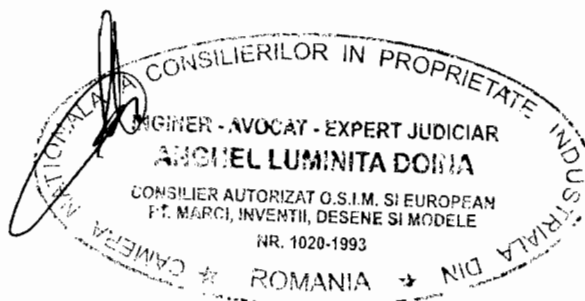
În acest scop se recomandă gelul preparat din geloză sau agar, iar testul se realizează în următoarele etape:

Prepararea amestecului de agaroză 1% în PBSA conținând azidă de sodiu 0,05%: se încălzește agaroză la 80-90 °C; se răcește agaroză la 45- 50 °C și se adaugă ser cu IgG anti-IgY 0,33 ml/ml de agaroză. Se păstrează la 45-50 °C un mililitru de agaroză.

- a) Se toarnă agaroză în placa de unică folosință 4 ml/6 cm diametru, se răcește placa la temperatura camerei.
- b) Se preforează godeuri cu diametrul de 6 mm la distanțe de minimum 20 mm, se repartizează 0,30 ml agar cald în fiecare godeu pentru a etanșeiza fundul godeului și a nu permite trecerea lichidului pe sub agar. Se răcește placa cu agar la temperatura camerei.
- c) Se repartizează 30 μl de IgY brut și în diluții succesive 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 în PBS în godeurile practicate în geloză.
- d) Se păstrează plăcile de reacție la temperatura camerei, în mediu umed și se face citirea reacției la 24, 48 și 72 de ore.

Dacă se consideră necesar, se face colorarea agarului cu Coomassie blue. Se fixează geloză cu metanol conținând 10% acid acetic pentru 30 de minute la temperatura camerei. Se înlătură soluția de fixare. Se colorează gelul cu 10 volume de colorant Coomassie Blue, timp de o oră 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 se fotografiază și se măsoară diametrul fiecărui cerc de precipitare. Concentrația în miligrame de proteină a IgY se face fie prin raportare la un tabel de referință, fie față de un martor etalon.

*Handwritten signature*



## Exemplul 8

Determinarea conținutului de IgY folosind testul de imunodifuziune dubla Ouchterlony

Conform prezentei invenții răspunsul imun al gainilor imunizate cu I-spga se face folosind testul de imunodifuziune în gel de agar, după protocolul AMCAM și se bazează pe migrarea în gelul de agar a antigenului IgY și anticorpilor (ser de iepure anti IgY H&L ab 97136 ABCAM) care la locul de contact se combină specific și formează un precipitat care se vizualizează sub forma unei linii de precipitare.

Toate controalele efectuate folosind testul de imunodifuziune în gel de agar au avut drept scop identificarea IgY față de etaloane internaționale. Aceste controale fac parte din prima categorie de controale care au fost folosite pentru identificarea moleculelor IgY. Acest control de rutină se poate face și cu testul ID realizat în România (bibliografie pct.17)

Testul este valid când linia de precipitare a probei controlate se unește cu linia de precipitare a IgY etalon și nu reacționează cu proba martor negativ.

## Exemplul 9

Evidențierea răspunsului imun la 8 zile de la imunizare  
Controlul proteinelor imunologic active extrase din oul hiperimun I-spga

Specificare <sup>c)</sup>	IgY <sup>a)</sup>	OTf <sup>b)</sup>
IgY	++++	-
Ovotransferina	-	++++

a) Chicken IgY ELISA Kit (ab189577)

b) Chicken Ovotransferrin ELISA Kit (ab157694)

c) Teste executate conform instrucțiunilor de folosire ABCAM

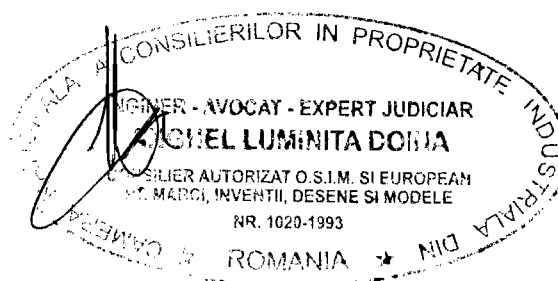
d) S-au luat în considerare câte trei replicare pentru fiecare probă

## Exemplul 10

Conform prezentei invenții răspunsul imun al gainii la 8 zile de la prima imunizare cu I-spga se confirmă folosind testele ELISA recunoscute internațional și menționate mai jos.

Specificare	Ecoli	K pneumoniae	P aeruginosa	Candida Albicans
IgY-Ispga <sup>b)</sup>	2/2 <sup>a)</sup>	2/2	2/2	2/2
Ovotransferina I-spga <sup>c)</sup>	2/2	2/2	2/2	2/2
Ovomucina I-spga <sup>d)</sup>	2/2	2/2	2/2	2/2
Ovoalbumina -I spga <sup>e)</sup>	2/2	2/2	2/2	2/2

*uipatn*



- a) dilutii de lucru 1:1000 si respectiv 1:5000 in SPGA  
 b) Chicken IgY ELISA Kit (ab189577)  
 c) Chicken Ovotransferrin ELISA Kit (ab157694)  
 d) Ovomucine by Chicken MUC6 (Mucin 6) ELISA kit Elabscience E-EL-Ch0799  
 e) Ovoalbumine by Ovoalbumina [OVA sI G1] ELISA kit Blue Genue

Controlul, folosind testele ELISA se poate face la un numar limitat de antigeni, de referinta, sau la toti antigenii din lista componentelor imunogenului I-spga. Testul si evaluarea se realizeaza conform instructiunilor producatorului.

#### Exemplul 11

Răspunsul imun al găinilor imunizate cu imunogenul I-spga

Conform prezentei inventii, raspunsul imun al gaini la admnistrarea I-spga se face folosind testul ELISA la care reactia pozitiva specifica de evalueaza pentru IgY la dilutia de lucru de 1:1000 si trebuie sa fie mai mare de 0.200 OD.

#### Exemplul 12

Conform prezentei inventii evaluarea raspunsului imun al gainilor imuniuzate cu imunogenul I-spga, pentru proieinele imunologic active din albus se face pentru ovotransferina, ovolabumina, ovomucina, lisozim.

Determinarea calitativa si cantitativa folosind testele de seroaglutinare rapida si lenta ( in tub sau pe placa de 96 de godeuri), ID radiara Mancini sau ID dubla difuziune Oucerloni sau ELISA directa sau competitiva.

RSAR se realizeaza cu reagenti preparati "in house". Antigenii sunt suspensii de bacterii inactivate la densitatea optica 0.3 la 650 nm. IgY-poly si PIA s-au folosit nedialuate sau in dilutii succesive, binare in PBS. 30 µl de antigen si 30 µl de IgY sau PIA s-au amestecat 30 de secunde, pe lama, si s-a citit reactia de aglutinare in 3-5 minute. Reactia este pozitiva cand probele martor negativ pentru care s-a folosit PBS, sau IgY extras din ouale gainilor inainte de imunizare au reactionat negativ.

#### Tabelul nr 1.

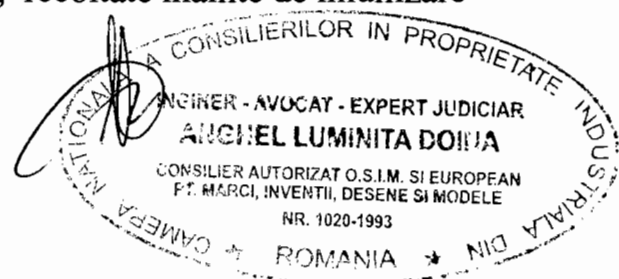
##### Seroaglutinarea rapida pentru IgY-poly I-spga

Specificare IgY- obtinut inainte de imunizare IgY- poly I-spga	Pozitive	Testate
E coli	0/6 <sup>b)</sup>	20/20 <sup>a)</sup>
K pneumoniae	0/6	7/7
Candida albicans	0/6	4/4

<sup>a)</sup> IgY-poly I-spga a fost extras din oul hiperimun obtinut de la gaini hiperimunizate cu Imunogenul I-spga care a continut antigenii de E coli, K pneumoniae si Candida albicans.

<sup>b)</sup> IgY extras din oua de la acelesi gaini, recoltate inainte de imunizare

*uzelz*



65

Tabelul nr 2

## Testul rapid de seroaglutinare pentru proteinele imunologic active

Specificatii	Inainte de imunizare	La 8 zile de la imunizare	IgY Imunoinstant <sup>c)</sup> -
OTf-poly I-spga <sup>a)</sup>			
Candida albicans	0/6	6/6	6/6
E coli	0/6	6/6	6/6
PIA -poly I-spga <sup>b)</sup>	0/6	6/6	ND
Candida albicans	0/6	6/6	6/6
E coli	0/6	6/6	6/6

a) Probe de OTf preparate din oua prelevate de la gaini inainte de imunizare

b) PIA reprezentat de o solutie de 1/1 de albus in SPGA

c) IgY Imunoinstant (imunogen I-PC2) poly martor pozitiv

## Seroaglutinarea lenta

Fiecare suspensie de bacterii, inactivata cu formol, a fost ajustata la 0.3 densitate optica 525 nm la un spectofotometru Coleman Junior.

Tuburi de cultura de 12 mm, s-au folosit pentru reactia lenta. 0.5 ml de antigen si 0.5 ml de IgY -poly I-spga sau PIA I-spga au fost adaugate peste suspensie. Probele de control au fost reprezentate de suspensia de bacterii in PBS. Tuburile au fost puse sub agitare la 37C 3 ore dupa care la +4C 24 de ore. Aglutinarea a fost evaluata de la zero, fara aglutinare pana la ++++aglutinare totala

Tabelul nr 3

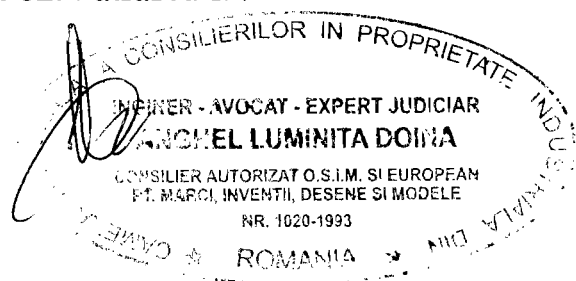
## Reactia de seroaglutinare lenta pentru IgY-poly si PIA-poly

Specificare	titul maxim de reactie
Eserichia coli	1:320
Klebsiella pneumoniae	1:320
Candida albicans	1:160

## Bibliografie

1. Calnek B.W. S.B.Hitchner, and H.K. Adlinger. Lyophilization of Cell-Free Marek's Disease Herpesvirus and a Herpesvirus from Turkeys. Applied Microbiology, Vol. 20, Nov. 1970, p. 723-726
2. BREVET. Procedeu de preparare a vaccinului contraboliului Marek dintr-o tulpina de virus herpes de curca. 56778 din 27/06/1973. Patrascu I. V.
3. Vaccin inactivat contra leucozei enzootice bovine și ovine și procedeu de preparare. Brevet nr. 75101 din 10/08/1980. Patrascu I.V., Stube P, Sofia Coman, Sandu I., Maria Ciobanu.
4. Brevet. Procedeu de preparare a vaccinului contra bolii Marek. Completare la inventia 56778. Nr 80570 din 14/10/1982. Patrascu I.V

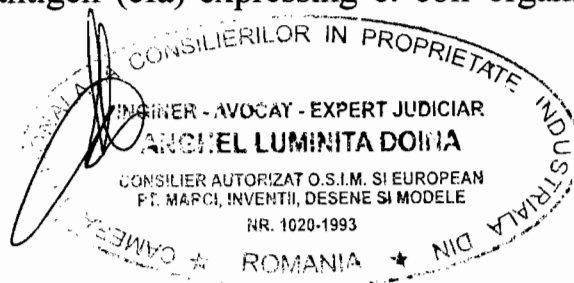
*upezly*



26

5. Patrascu, I. V., B. W. Calnek, and M. W. Smith. HVT vaccine and challenged with virulent Marek's disease virus. Avian Dis. 17:137-141. 1973.
6. Patrascu I.V., B.W. Calnek. în vitro assay of cell-free turkey herpesvirus (1972) .Avian Diseases vol.16. nr.2. p:357-419
7. Patrascu I.V. Tuschak N., Elena Tuschak, P. Stiube, Veronica Niteanu, V. Popa, D. Mihailescu. Marek's disease and its control în the Socialist Republic of Romania. Acta Vet. Bruno 43.1974. p:171-182.
8. Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application. R. Schadeet al., 2000, Springer-Verlag, Lab Manuals, ISBN 3-540-66679-6. Video tutorial of IgY purification.
9. Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S, You J, Wang L Application of chicken egg yolk immunoglobulins în the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. Biotechnol Adv. 2011 Nov-Dec; 29(6):860-8. Epub 2011 Jul 20.
10. Rodrigo Pacheco, Teresa Gallart, Carmen Lluís, Rafael Franco. Role of glutamate on T-cell mediated immunity. Neuroimmunology. April 2007, Volume 185, Issues 1-2, Pages 9–19.
11. Patrascu I.V., Chiurciu C., Viorica Chiurciu, Sima Lucica, Mihai Iuliana, Violeta Ionescu, Ioana Dimulescu, Dana Tiplea, Cristina Casaru, Andreia Dinu, Gerogiana Topilescu, Georgiana Radu, Angelescu C. ISBN 978-973-0-2282-9. Psoriazisul privit dintr-un alt punct de vedere. Bucuresti 2016
12. Bahnemann HG. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. Arch Virol. 1975;47(1):47-56
13. Patent nr. A/00156 din 25.02.2014 – “Procedeu de obținere și utilizare a imunoglobulinelor de găină (IgY) ”Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Georgiana Topilescu
14. Patent 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, Georgiana Topilescu.
15. Patent nr.A/00653 din 28.08.2014 – “Producerea și utilizarea ovotransferinelor moderne (OTF-M)” Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Mariana Oporanu, Georgiana Topilescu.
16. Patent nr. A/00810 din 29.10.2014 – “Producerea și folosirea oului hiperimun PC2” Pătrașcu Ionel Victor, Viorica Chiurciu, Chiurciu Constantin, Mariana Oporanu, Georgiana Topilescu, Iuliana Mihai.
17. Patent nr. A/00008/13.01.2015- Producerea și utilizarea ovotransferinei PC2 (OTf-PC2) Patrascu I.V., Viorica Chiurciu, Chiurciu C, Mariana Oporanu, Georgiana Topilescu și Iuliana Mihai.
18. Brevet nr. 84576 din 27/04/1984. Procedeu de obținere a unei linii celulare infectată cronic cu virusul leucozei bovine. Patrascu I.V.
19. US 6558678 B1. Jan Holmgren, Ann-Mari Svennerholm. Preparation and use of formalin- killed colonization-factor-antigen (cfa)-expressing e. coli organisms

*u/ra/lu*

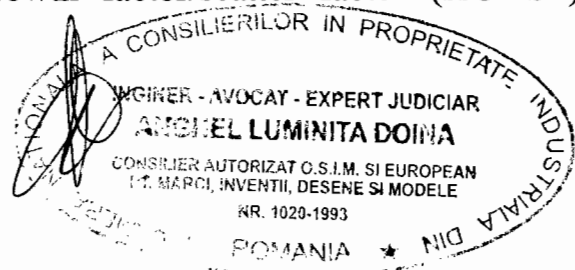




for vaccination against enteric infection/diarrhea caused by enterotoxigenic e. coli bacteria in humans.

20. Valenti P., Antonini G., Fanelli M. R. R., Orsi N., Antonini E. Antibacterial activity of matrix-bound ovotransferrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982;21:840-841
21. Ibrahim H. R., Sugmito Y., Akoi T. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 2000;1523:196-205.
22. Tankrathok A., Daduang S., Patramanon R., Arakai T., Thammasirirak S. Purification process for the preparation and characterization of hen egg white ovalbumin, lysozyme, ovotransferrin and ovomucoid. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2009;39:380-399.
23. Radziejewska R. C., Leśniewski G., Kijowski J. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations - A review. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 2008;58:5-10.
24. Alderton, M., Ward W. H., Fevold H. L. Isolation of lysozyme from egg white. *J. Biol. Chem.* 1945;157:43-58.
25. Safarik I., Sabatkova Z., Oldrich T., Safarikov M. Magnetic cation exchange isolation of lysozyme from native hen egg white. *Food Technol. Biotechnol.* 2007;45:355-359.
26. Chang H. M., Yang C. C., Chang Y. C. Rapid separation of lysozyme from chicken egg white by reductants and thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:161-164.
27. Wang J., Wu J. Effect of operating conditions on the extraction of ovomucin. *Process Biochem.* 2012;47:94-98.
28. Durance T. D. *Egg Uses and Processing Technologies, New Developments.* CAB Int. Wallingford, UK; 1994. Separation, purification and thermal stability of lysozyme and avidin from chicken egg white; p. 77-93.
29. MORTON, D. M. Requirements for the toxicological testing of drugs in the USA, Canada and Japan. In: GORROD, J. W. (Ed.). *Testing for toxicity*. London: Taylor & Francis, 1981. p.11-19.,
30. MORTON, D. M. Importance of species selection in drug toxicity testing. *Toxicol. Lett.*, v.102, p.545-550, 1998.]
31. SWANSTON, D. W. Assessment of the validity of animal techniques in eye-irritation testing. *Food Chem. Toxicol.* v.23, p.169-173, 1985
32. Evonuk KS et al. Inhibition of System Xc(-) Transporter Attenuates Autoimmune Inflammatory Demyelination. *J Immunol* 195:450-63 (2015).
33. Sloniecka M et al. Expression Profiles of Neuropeptides, Neurotransmitters, and Their Receptors in Human Keratocytes in Vitro and in Situ. *PLoS One* 10:e0134157 (2015). Functional
34. Ohnishi, T., et al. (2000). Development of highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF):

*upala*



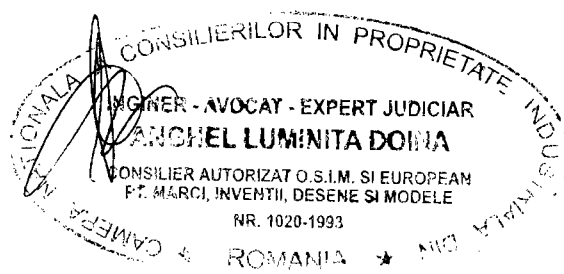
determination of HGF/SF in serum and urine from normal human subjects. Journal of Immunological Methods 244, 163-173

35. Pelosi, E., Lambden, P.R., Caul, E.O., Liu, B., Dingle, K., Deng, Y. & Clarke, I.N. (1999). The seroepidemiology of genogroup 1 and genogroup 2 Norwalk-like viruses in Italy. Journal of Medical Virology 58, 93-99.

36. Tini M. Jewell, U.R Camenisch, G Chilov, D & Gassman, M(2002) Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. Comparative Biochemistry and Physiology -A Molecular and Integrative Physiology 131,569-574.

37. Mittermeier, P. (1995). Das Lipopeptid Pam3Cys-Ser-(Lys)4-eine Alternative zu Freundschem komplettem Adjuvans (FCA) Ludwig Maximilians Universität. 99pp. Munich, Germany: Ludwig Maximilians University.

upat



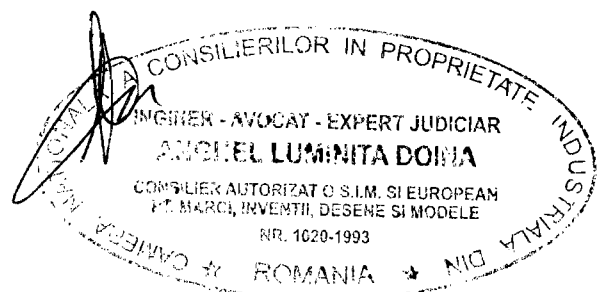
**REVEDICĂRI**

1. Compoziția unui preparat imunogen complex numit I-spga destinat producerii de proteine imunologic active-IVP (proteine imunologic active Ionel Victor Patrascu) (PIA-IVP) si metoda de preparare si evaluare a acestuia, **caracterizate prin aceea că** preparatul imunogen complex cu compozitia conform inventiei, poate fi I-spga standard, I-spga specific și I-spga personalizat si se obtine prin metoda conform inventiei, dintr-un antigen complex alcatuit din 18 până la 26 de specii de microorganisme patogene izolate de la pacienți, inactivate cu etilenimină binară (BEI) și/sau formol, în amestec cu SPGA ca imunopotențiator și cu QS21 ca adjuvant. Cu acest preparat imunogen complex se inoculeaza parental gaini (*Gallus domesticus*) ce produc oua hiperimune ImunoVIP din care se pot prepara proteine imunologic active, cu care se pot trata deficientele imune, psoriasisul, epidermoliza buloasă, alte dermatite, infectii nosocomiale, infecții cu germeni sensibili sau rezistenți la antibiotice in tubul digestiv, aparatul urinar, pe alte mucoase, tesuturi sau organe.
2. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** este alcatuit dintr-un antigen complex preparat din 18 până la 26 specii de microorganisme patogene izolate de la pacienți, inactivate cu etilenimină binară (BEI) și formol/sau, în amestec cu SPGA ca imunopotențiator și cu QS21 ca adjuvant.
3. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga folosita la compozitia și metoda de prepararea a oului hiperimun ImunoIVP, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** aceste ouă hiperimune se obțin de la găini (*Gallus domesticus*) inoculate parenteral cu imunogenul complex I-spga.
4. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** antigenul complex preparat din 18 până la 26 de specii de microorganisme conține un amestec de corpi bacterieni, componente din corpii bacterieni obținute prin ultrasonare, cili, exotoxine, endotoxine, spori, virusuri, ciuperci sau levuri sau detritusuri celulare izolate de la pacienți.
5. Metoda de preparare și compoziția preparatul imunogen complex I-spga, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** antigenul complex I-spga se diluează în SPGA ca imunopotențiator, care conține 0,218 M sucroză, 0,0038 M fosfat monopotasnic, 0,0072 M fosfat dipotasnic, 0,0049 M glutamat monopotasnic și 1% pulbere de albumină bovină



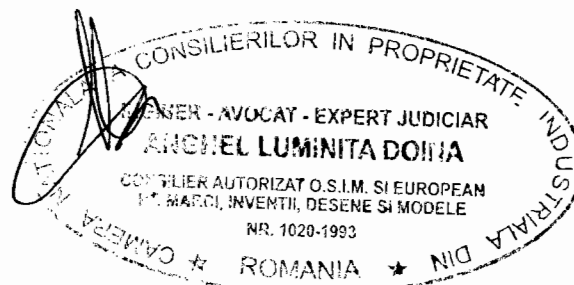
6. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga prin metoda de preparare conform Revendicarii 1, **caracterizată prin aceea că** antigenul complex se diluează în SPGA ca imunopotențiator și se amestecă cu QS21 ca adjuvant.
7. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** antingenul complex I-spga conține corpi bacterieni, componente din corpii bacterieni obținute prin ultrasonare, cili, exotoxine, endotoxine, spori, virusuri, ciuperci sau levuri inactivate cu BEI și/sau formol.
8. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** imunogenul I-spga care conține corpi bacterieni, componente din corpii bacterieni obținuți prin ultrasonare, cili, exotoxine, endotoxine, spori, virusuri, ciuperci sau levuri, poate fi I-spga standard, I-spga specific și I-spga personalizat.
9. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** imunogenul I-spga standard este compus din 18 până la 24 specii bacteriene rezistente sau sensibile la antibiotice izolate de la pacienți.
10. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** imunogenul I-spga specific este compus dintr-un antigen monospecific preparat din 6-8 tulpini de la o singura specie de bacterii, ciuperci sau levuri izolate de la pacienți, inactivat cu BEI, în amestec cu SPGA ca imunopotențiator și cu QS21 ca adjuvant, cu care se imunizează găini care au fost imunizate anterior cu imunogenul I-spga standard.
11. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** imunogenul I-spga personalizat este compus din materialul patologic prelevat de la pacient care conține detritusuri celulare și germeni patogeni, inactivat cu BEI și/sau formol, în amestec cu SPGA ca imunopotențiator și cu QS21 ca adjuvant și cu care imunizează găini care au fost imunizate anterior cu imunogenul I-spga standard.
12. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** în imunogenul I-spga, fiecare antigen specific unei specii de microorganism este un amestec proteic de corpi bacterieni, cili, spori, exo și endotoxine preparate din mai multe tulpini bacteriene ale aceleiași specii rezistente sau sensibile la antibiotice.

urpartiz



13. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, oul hiperimun I-IVP, obținut de la găini imunzate cu I-spga ca imunogen, poate fi identificat după conținutul specific al unei imunoglobuline (IgY) specifice antingenului țintă și identificat cu numele generic I-spga
14. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că** oul hiperimun obținut de la găini după imunizare, numit ou IMMUNO-IVP conține în albusul lui, membranele cochiliere și în coaja lui proteine imunologic active din gupul ovotransferina apo, ovotransferina holo, ovoalbumina și ovomucina.
15. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, oul hiperimun obținut de la găini după imunizare, numit ou ImunoVIP, conține proteine imunologic active din gupul imunoglobulinei IgY în membrana vitelină.
16. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, oul hiperimun I-IVP ca și componentele acestuia (albuș, gălbenuș, membrane viteline, membrane cochiliere și coajă) provin de la găini hiperimunizate cu imunogen I-spga standard, specific sau personalizat.
17. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, produsele biologice din grupul I-IVP folosite, nu sunt dăunatoare omului și se administrează la om oral sau local, pe piele și mucoase, sub forma de soluție sterilă, granule, soluție în lapte sau sucuri, unguent, spray, comprimate sau cașete, conform instrucțiunilor de folosire.
18. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, produsele biologice folosite, din grupul I-IVP conțin doi markeri G și A cu care se poate diferenția de Imunoinstant sau alte produse similare.
19. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, prin imunizarea găinilor cu imunogenul I-spga se pot obține ouă hiperimune din care se pot prepara proteine imunologic active, pulberi din coajă și membrana cochilieră, creme și unguente din gălbenuș și albuș, soluții sterile conținând proteine imunologic active din galbenus si albuș, cu care se pot trata infecțiile cu germeni rezistenți la antibiotice si alte infectii.

*upst*



20. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, prin imunizarea găinilor cu imunogenul I-spga, se pot obține ouă hiperimune din care se pot prepara proteine imunologic active, pulberi din coajă și membrana cochiliera, creme și unguente din gălbenuș și albuș, soluții sterile conținând proteine imunologic active din galbenus si albuș, cu care se pot trata deficiențe imune, ca epidermoliza buloasă, psoriasisul vulgar si altele.
21. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, prin imunizarea găinilor cu imunogenul I-spga se pot obține ouă hiperimune din care se pot prepara proteine imunologic active, pulberi din coajă și membrana cochilieră, creme și unguente din gălbenuș și albuș, soluții sterile coținand proteine imunologic active din galbenus si albuș, cu care se pot trata infecțiile cu *Staphylococcus aureus* MSSA și MRSA.
22. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, prin imunizarea găinilor cu imunogenul I-spga se pot obține ouă hiperimune din care se pot prepara proteine imunologic active, pulberi din coajă și membrana cochilieră, creme și unguente din gălbenuș și albuș, soluții sterile conținând proteine imunologic active din galbenus si albuș, cu care se pot trata infecțiile cu *Clostridium difficile*.
23. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, prin imunizarea găinilor cu imunogenul I-spga se pot obține ouă hiperimune din care se pot prepara proteine imunologic active, pulberi din coajă și membrana cochilieră, creme și unguente din gălbenuș și albuș, soluții sterile conținând proteine imunologic active din galbenus si albuș, cu care se pot trata infecțiile urinare la copii și adulți.
24. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, prin imunizarea găinilor cu imunogenul I-spga se pot obține ouă hiperimune din care se pot prepara proteine imunologic active, pulberi din coajă și membrana cochilieră, creme și unguente din gălbenuș și albuș, soluții sterile conținând proteine imunologic active din galbenus si albuș, cu care se pot trata infecțiile digestive cu germeni sensibili sau rezistenți la antibiotice.
25. Compoziția preparatului imunogen complex numit I-spga si metoda de preparare, conform Revendicarii 1, **caracterizate prin aceea că**, prin utilizarea gemenilor patogeni izolați din tara si respectiv zona geografica unde urmeaza a se folosi imunogenul, crește valoarea lui terapeutică.

supraty

