



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00791**

(22) Data de depozit: **16/12/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**30/06/2022** BOPI nr. **6/2022**

(71) Solicitant:  
• **LAZĂR LIDIA-ELENA,**  
**STR. ȘTIRBEI-VODĂ, NR.164, BL.21,**  
**AP.13, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **LAZĂR LIDIA-ELENA,**  
**STR. ȘTIRBEI-VODĂ, NR.164, BL.21,**  
**AP.13, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **METODĂ DE PURIFICARE CU AMIDOTRIZOAT SODIC  
A OCHISTURILOR DE COCCIDII DIGESTIVE PATOGENE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de separare și purificare a oochisturilor de coccidii digestive patogene. Metoda, conform invenției, constă în etapele: izolarea oochisturilor de coccidii digestive patogene din eșantioane fecale, purificarea în gradient linear la interfața 0,5% Ficoll-16% amidotrizoat sodic, ultrasonare la 8...10 cicl/sec, minimum 75% dintre oochistii purificați

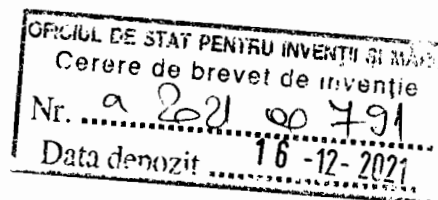
fiind ruți, utilizarea oochistilor purificați pentru obținerea unui antigen total parazitar (mural și citosolic) cu un nivel optim de concentrație proteică parazitară de 2,3 mg%.

Revendicări: 1



1

Descriere



## METODA DE PURIFICARE CU AMIDOTRIZOAT SODIC A OCHISTURILOR DE COCCIDIILOR DIGESTIVE PATOGENE

### Domenii de aplicabilitate:

Cercetare fundamentala microbiologie-parazitologie; Medicina umana si veterinara; Biologie moleculara; Imunologie generala si imunodiagnostic; Genetica microbiologica; Ecologia mediului

### Stadiul metodei:

Metoda de purificare in gradient linear cu amidotrizoat sodic (N-N'-diacetil-3,5-diamino-2,4,6-triiodbenzoic) reprezinta o tehnica rapida, economica, simplificata si fiabila pentru obtinerea oochisturilor coccidiilor digestive (*Cryptosporidium* spp; *Cyclospora cayetanensis*; *Eimeria* spp;) patogene la om si animale. Oochistii purificati vor permite trecerea la etapa ulterioara in vederea obtinerii antigenului parazitlar coccidian total (mural si cytosolic), element esential necesar studiilor teoretice si solutiilor practice consecutive.

Evaluarea metodelor de purificare consacrate si recomandate in literaturile de specialitate internationale permit observatia ca unele protocoale in gradient discontinuu sunt considerate arhaice, iar altele laborioase si costisitoare in termeni de materiale utilizate, complexitate procedurala si de timp, existente ca produse de laborator comerciale premium.

O sumarizare a metodelor utilizate in separarea si purificarea oochisturilor coccidiene, precum si in domeniul microbiologiei si biologiei celulare cuprinde urmatoarele metode :

1) Combinarea sedimentarii in TFS /PBS (tampon-fosfat de sodiu/phosphate-buffered saline) cu centrifugarea in gradient discontinuu de sucroza –metoda Arrowood-Sterling (1987); 2) Gradient discontinuu Percoll (suspensie coloidala de particule de siliciu invelit cu monostrat de polivinil pirolidona)-osmolaritate si toxicitate scazute (Kawazoe, 1992; Bautista, 1999)-necesita diluare, resuspendare in PBS si centrifugare; 3) Gradient continuu Ficoll (copolymer dendrimeric de sucroza si epiclorohidrina)-osmolaritate joasa-are forme comerciale endoxin-free (care lipsesc la Percoll-) mai rapida, dar scumpe (Chang, 2009); 4) Sucroza in gradient variabil cu pompa peristaltica –(Kazuo, 2009); 5) Gradient discontinuu in 3 nivele de solutie clorura de cesiu (KILANI & SEKLA, 1987), cu subvarianta cu solutie de bromura de potasiu (28%, 16% si 6%) in Tris-EDTA- mai ieftina (Bridle & Schultz, 2014)- ambele utile la evaluarea (dupa filtrare) a oochisturilor din apele de suprafata; 6) Gradient monodens de iodixanol (sol iodate 30 %)- ( Quasem, 2017)-practicata in micologie, virusologie, hematologie.

**Problema tehnica**

Oochisturile de coccidii intestinale patogene sunt excretate in materiile fecale (la om si animale, unele dintre ele avand si rezervor animal), contaminand mediul inconjurator, cu remarcabila rezistenta, inclusiv in apa. Separarea si purificarea oochisturilor de debriuri reprezinta secvente esentiale in realizarea oricarei activitati de cercetare. Oochisturile coccidiene prezinta structura antigenica complexa, concordant cu morfologia parazitara (taxonomic, Sporozoare din clasa Coccidia), perete multilamelar, componentele endocelulare de virulenta sau sporozoiti, organela specifica –corpul cristalin Tyzzer. Antigenul total coccidian reprezinta o componenta suficient de sensibila si specifica pentru diverse determinari teoretice (studii de genetica si/sau imunopatologie parazitara) si practice (metode de screening de diagnostic coprologic si ecologic in ape de suprafata, determinari serologice si epidemiologice). Antigenul total parazitara presupune o biomasa de oochisti izolati si purificati, cu posibilitatea identificarii componentei murale (peretii oochisturilor). Datele de viabilitate ale sporozoitilor nu sunt relevante si nici nu fac obiectul prezentei inovatii.

**Expunerea inventiei**

Probele coprologice continand oochisti de coccidii digestive patogene (obisnuit esantioane umane sau bovine in cazul celor cu rezervor animal), ori din probe de apa de suprafata/ape recreationale (filtre) pot fi pastrate in solutii de bicromat de potasiu 2,5% la + 4°C, minimum 3 luni de la recoltare. Izolarea lor de debriuri se realizeaza prin tehnica cu eter-TFS sau prin flotare in solutie de sulfat de zinc (proceduri clasice de sedimentare). Utilizarea solutiilor iodate (acidul aminotrizoic de sodiu sau meglumina) ca substante de contrast reprezinta procedura bine-cunocuta in imagistica medicala (radiografii, CT-scan) cu toleranta buna si toxicitate redusa. Aminotrizoatul sodic este un compus iodat electron-dens, solubil in apa, larg-folosit atat oral, cat si parenteral (intravenous, intraarterial, intratecal, intraabdominal si pelvian). In practica de laborator (in general, parazitologic in particular), nu a fost utilizat, dar alti compusi iodati (iodixanol) stau la baza izolarii cu succes a diverselor celule si organite celulare (mastocite sanguine, spermatozoizi mobili, izolare retrovirusi, peroxizomi etc).

**Purificarea oochistilor coccidieni intestinali** : Se introduc in tuburi de centrifuga in gradient linear, respectiv volume egale de 0,5%, 1,2 %, 4% si 6% Ficoll in TFS continand 16% diatrizoat de sodiu/amidotrizoat sodic-(concentratia si densitatea pot fi masurate prin DMA-Anton Paar Density Meter). Se centrifugheaza la 900 g 60 minute, la temperatura camerei. Oochistii de coccidii intestinale sunt obtinuti in banda clara de la interfata cu 0,5% Ficoll- amidotrizoat sodic. Se spala de 3 ori in TFS, iar sedimentul se resuspenda intr-un mililitru TFS la pH=7,2.

**Prepararea antigenului total parazitara coccidian**: oochisturile purificate sunt supuse ultrasonarii la un ultrasonicator cu puterea de 8-10 cicli /sec, putere la care peste 75% dintre ei sunt sparti. Componenta finala este un amestec denumit antigen total, care insumeaza componente antigenice de perete (murale), sporozoitare, compusii ultrastructurali specifici (organelle) si restul de oochisti integri. Determinarea proteinei totale se face dupa metoda calsica Lowry, nivelul optim de concentratie proteica parazitara fiind de 2,3 mg%.

**3**

Peretii oochisturilor se pot identifica prin coloratia cu Calcofluor White M2R (Fluorescent Brightener 28) la o concentratie finala de 100 ug/mL. Citirea se face cu microscop de Epifluorescenta, folosind 365 nm si filtre de emisie de 445/50 nm.

**Premize pentru exploatare comerciala**

Metoda de purificare a oochistilor coccidieni intestinali patogeni permite obtinerea antigenului total care insumeaza componentele antigenice de perete (murale), sporozoitare, compusi ultrastructurali specifici printr-o tehnica eficienta, rapida, simpla si ieftina aplicabila unor proceduri de analiza extinsa (morfologica, imunologica, genetica-tip PCR/polymerase-chain-reaction/ si LAMP/loop-mediated isothermal amplification/ , spectroscopie de masa tip MALDI-TOF-MS/matrix assisted laser-desorbion-ionization-time on flight mass spectrometry) cu valoare diagnostica , epidemiologica (expunerea populatiei la parazit/riscuri ocupationale/siguranta hidrica ape potabile si ape recreationale pentru riscul transmiterii hidrice) si ecologica (nise ecologice de paraziti coccidieni patogeni la nivelul molustelor bivalve).

**Avantajele metodei:**

Simplitate in executie; Rapiditate de efectuare; Costuri procedurale scazute; Fiabilitate mare, cu buna sensibilitate si specificitate; Siguranta buna, fara biohazard identificabil.

**Revendicari** referitoare la inovatia cu titlul:

**METODA DE PURIFICARE CU AMIDOTRIZOAT SODIC A OOCISTURILOR DE COCCIDII DIGESTIVE PATOGENE**

**Preambul**

Metoda de purificare a oocisturilor de coccidii digestive patogene, etapa esentiala ce asigura obtinerea antigenului total (mural si citosolic) coccidian, utilizeaza procedura inovatoare originala in gradient linear de solutie iodata amidotrizoat sodic.

**Revendicari Caracterizate prin aceea ca:**

- foloseste gradientul linear
- interfata cu solutia 16% de amidotrizoat sodic (diatrizoat sodic)
- obtine antigenul total parazitara coccidian (mural si citosolic)

**Produse interdependente si utilizari potentiale derivate revendicate:**

- cercetari teoretice si aplicate pentru identificarea biodiversitatii parazitare in Romania (genotipuri parazitare circulante pe teritoriul tarii)
- metodologii de diagnostic coprologic si/sau seroepidemiologic in populatia umana si animala (risc ocupational, risc nosocomial)
- metodologii de investigare ecologica (de mediu) si de siguranta hidrica si alimentara (risc epidemic, risc bioteorist, calitatea apelor potabile de suprafata, inclusiv ape minerale, termale si recreationale, HACCP, nise ecologice cu moluste bivalve).