

Carolina Constantin^{1,2}, Monica Neagu¹⁻³, Teodora Diana Supeanu⁴, Viorica Chiurciu⁴, Demetrios A. Spandidos⁵

¹ Institutul Național de Patologie "Victor Babes" – București, ² Spitalul Clinic Colentina – București, ³ Facultatea de Biologie – București
⁴ Romvac Company S.A. – Voluntari, ⁵ Laboratorul de Virologie Clinică, Școala de Medicină, ⁶ Universitatea din Creta, Iraklion

Fig. 1. Cromatogramele extractului de Ig Y izolat din gălbenușul ouălor de găini imunizate specific comparativ cu un extract proteic standard.

A – Extract Ig Y specific de concentrație 1 mg/ml

B – Extract proteic standard pentru identificarea maselor moleculare.

Sistemul cromatografic a fost format din: faza staționară - coloana ENRICH SEC 650, faza mobilă – tampon fosfat salin, viteza de curgere – 0,8 ml/min, lungimea de undă – 280 nm

- Existența crescută a tulpinilor virale care provoacă infecții pandemice a dus la orientarea către noi tipuri de tratament, inclusiv la utilizarea imunizării pasive cu imunoglobuline de tip Ig Y.
- Imunoglobulinele de gâină Ig Y prezintă o bună monoclonalitate, fiind, astfel, mai specifice și cu afinitate mai mare decât imunoglobulinele de tip Ig G obținute prin imunizarea mamiferelor.
- Comparativ cu imunoglobulinele de tip G, obținerea prin inginerie genetică a lanțurilor simple variabile de Ig Y este o metodă mult mai simplă.
- Principalul avantaj al obținerii Ig Y este procedeul non invaziv.
- Producerea și utilizarea Ig Y în tratarea infecțiilor respiratorii deschide, astfel, o nouă perspectivă de tratament.

Tabel 1. Principalele modele experimentale de studiu in vivo și in vitro, utilizând Ig Y anti viral (Ig Y – imunoglobulina Y, SARS – sindrom respirator sever acut; SPF – liber de patogeni specifici; BRSV – virus sincițial respirator bovin)

[illegible]

Clasa de exponate G: Sănătate – Medicină – Cosmetică

Viorica Chiurciu, Elena Lupu, Oana Dimulescu, Mariana Oporanu, Victor Iordănescu, Cristina Urducea, Elena Oltean¹

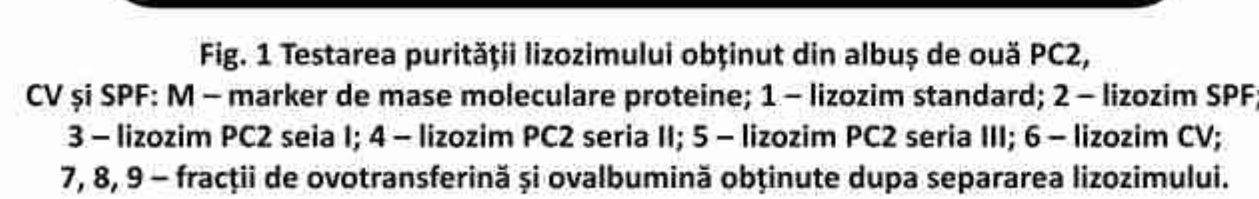
¹ Romvac Company S.A. – Voluntari

INTRODUCERE

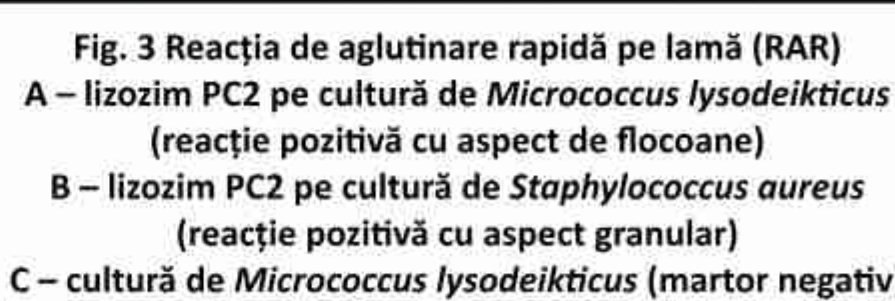
Lizozimul este o glicozid-hidrolază cu rol important în mecanismul de apărare antibacterian. Principala sa acțiune este liza polizaharidelor din peretele celular al bacteriilor prin scindarea legăturii glicozidice β -1,4 dintre acidul N-acetilmuramic și N-acetilglucosamină. Albușul de ou de găină reprezintă sursa cea mai importantă de lizozim (3,5%). Lizozimul din albuș este o polipeptidă formată din 129 aminoacizi, având o masă moleculară de 14 kDa și un punct izoelectric cuprins între 10 și 11. Structura sa moleculară cuprinde două domenii legate printr-un α -helix. Lucrarea de față prezintă cercetările efectuate cu scopul separării și purificării lizozimului din oul de găină și demonstrarea capacității antimicrobiene a acestuia.

1. Obținerea Ouălor Hiperimune PC2 de la găini din rasa Rhode Island Red, cu o greutate medie, în vârstă de 20 - 23 săptămâni, imunizate cu antigene bacteriene (*Micrococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*).

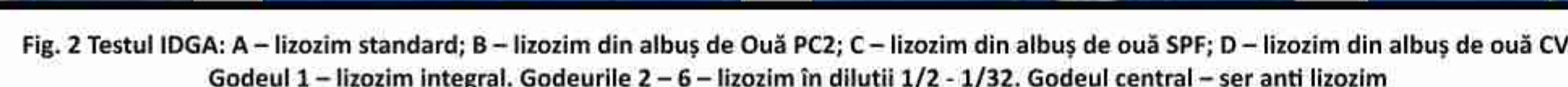
Preparatul purificat de lizozim obținut din albușul Ouălor Hiperimune a fost caracterizat prin SDS-PAGE, testul de imunodifuzie în gel de agar (IDGA) și reacția de aglutinare rapidă pe lamă (RAR).



Tabel 1 Calculul maselor moleculare ale lizozimului din preparatele purificate din albuș de Ou Hiperimun, ou convențional, respectiv ou FPF



Tabel 2 Testarea activității antibacteriene a lizozimului PC2, Cv și SPF față de bacterii Gram pozitive și Gram negative



- Lizozimul a putut fi ușor izolat din albuș de ou prin cromatografie de schimb ionic pe Amberlite FPC 3500. Rezultatele obținute au fost în concordanță cu datele de literatură privind purificarea și caracterizarea acestuia.
- Lizozimul PC2 obținut din albușul Ouălor Hiperimune are capacitatea de a liza membrana bacteriilor Gram pozitive, datorită prezenței straturilor de peptidoglican propriu (substrat pentru lizozim).
- Datorită proprietăților antibacteriene ale lizozimului, acesta poate fi folosit în industria alimentară (conservarea carcaselor, a brânzeturilor, a vinului), în industria farmaceutică și în medicină (sub formă de aerosoli, profilactic pentru tratarea cariilor dentare, pentru protecția și repararea unor leziuni distrofice și inflamatorii ale pielii și tesuturilor moi).

1. Abayaratne, E.D.N.S., H.V. Abn D.J. (2014). Sequential separation of lysozyme, coagulase, ovastransferin and ovalbumin from egg white. *Poult.* Sci. 93 (1): 1001–1009. 2. Al Awwaly K.A., Manah A., Samik El-Yazidi S.Wt, Yuni S. (2017). Nutritional Properties of Eggs. *Henn Egg White Microbial*. Ap. 5 (3): 347-368. 3. Gemelli, U.M.S., Nilgun Yazici, Fatma Ipek Uskok, Vener F.Y.G., Cidem Mertoglu Gucimles, Specie Alloy Atlayeva, Yemmenigoi A. (2007). Partial Purification of Lysozyme from Chicken Egg Whites by Ion Exchange Chromatography and Characterization of its Lyophilized Form. *Turk J Agric For*, 31, 125 – 124. 4. Letniernikov, G., Remata Golezewska. (2012). Potential possibilities of protein modification and practical application of lysozyme. *J Food Res Int*, 45 (11): 272–280. 5. Wang, L., Yan, Z., Li, W., Wan, Z. (2015). Purification and characterization of lysozyme from chicken egg albumin using ultrafiltration and ion exchange chromatography. *Int. Eng. Chem*, 9, 44, 7610-7616. 6. Spasiano Tereza, Madalida Talita, Cristina Urduea, Ioana Moldoveanu, Lucina Sima, Florica Chiriac, Mariana Oporoscu, C. Chiriac (2019). Hippurine egg as a source of lysozyme. *Revista de Chimia*, 69(1), 103-106. 7. Chiriac Florica, Urduea Ioana, Patrasca C., Chiriac Georgiana Topoliceanu. Specific Chicken Immunoglobulins (IgY) for Prevention and Treatment of Human Bacterial Infections. *European Biotechnology Congress*

Clasa de exponate G: Sănătate – Medicină – Cosmetică



DERIVATE BIOACTIVE CU LIZOZIM, CU EFECT
ANTIINFLAMATOR ȘI ANTIMICROBIAN UTILIZATE ÎN MEDICINA ALTERNATIVĂ

Viorica Chiurciu, Mariana Oporanu, Victor Iordănescu, Elena Lupu, Petru Știube, Lucia Diaconu, Ion Nicolae, Elena Oltean¹

¹ Romvac Company S.A. – Voluntari

INTRODUCERE Lizozimul este o proteină biologic activă prezentă în albușul de ou, având rol esențial în apărarea imună a embrionului. Datorită proprietăților sale antimicrobiene, acesta se extrage și se utilizează în prepararea diferitelor produse cu rol de conservant și/sau de ingredient bioactiv. Lucrarea de față prezintă rezultatele obținute în urma analizei conținutului de lizozim și activității sale specifice antimicrobiene din diferite produse imunologic active (geluri, emulsii, creme, pulberi, liofilizate).

MATERIALE ȘI METODE

1. Izolarea și purificarea secvențială a lizozimului din albușul Ouălor Hiperimune (lizozim PC2).
2. Testarea activității antibacteriene a lizozimului PC2 prin metoda difuzimetrică de determinare a lizei în placă.
3. Încorporarea lizozimului PC2 în geluri, emulsii, creme, pulberi liofilizate.
4. Utilizarea testului ELISA sandwich pentru cuantificarea lizozimului din extractele apoase de albuș de Ou Hiperimun și din produsele biologice.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

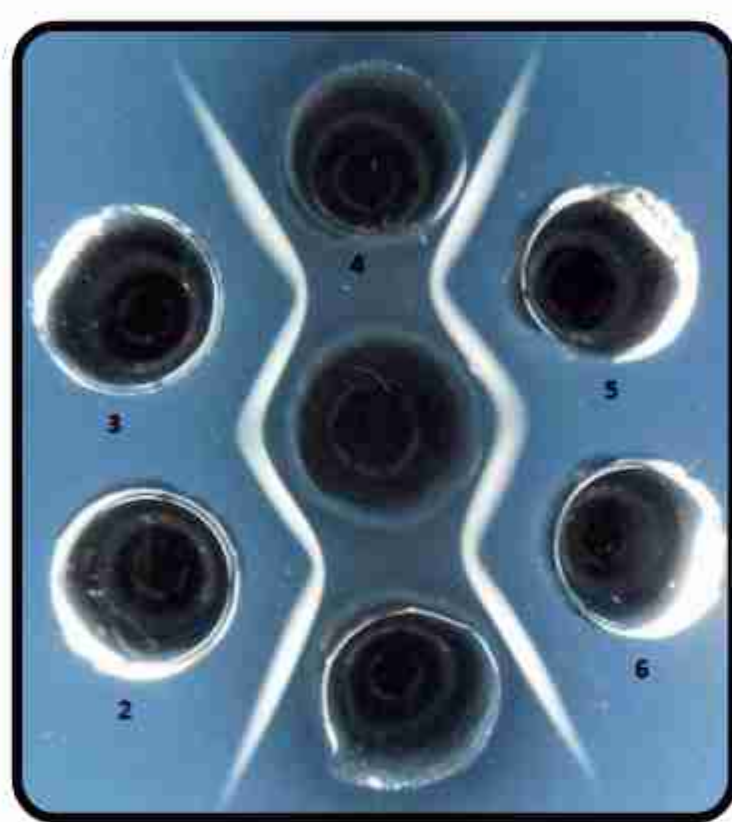


Fig. 1. Testul de imunodifuzie în agar pentru stabilirea identității dintre lizozimul standard (godeurile 3 și 5) și lizozimul PC2 (godeurile 2 și 4). Ser de igurare anti lizozim - godeurile 1, 4 și godeul control.

Preparate	Nr. Ioturi	Diametrul zonei de liză (mm)	Unități litice (mg/ml)
Gel cu lizozim	5	16,6	55,5
Emulsie cu lizozim	4	13,9	49,0
Pulbere liofilizată de lizozim	6	17,7	60,5
Soluție de proteine din Ou Hiperimun PC2	33	14,5	50,0

Tabel 1. Testarea concentrației de lizozim PC2 din produse imunologic active, prin metoda de determinare a lizei în placă

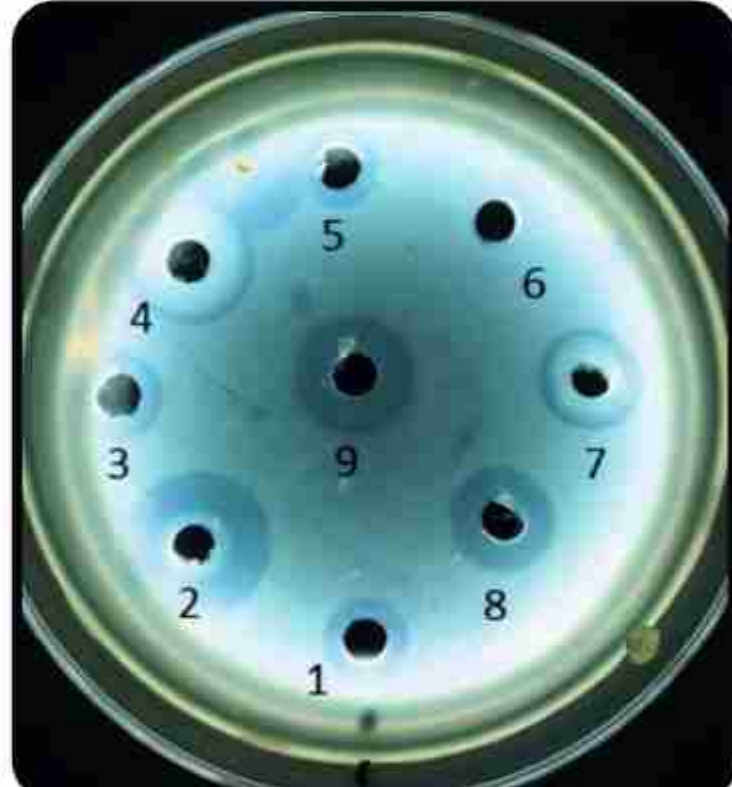


Fig. 2. Dozarea concentrației de lizozim PC2 din produsele imunologic active prin metoda de determinare a lizei în placă. Godeul 1 - emulsie cu lizozim lot I. Godeul 2 - pulbere liofilizată de lizozim. Godeul 3 - emulsie cu lizozim lot II. Godeul 4 - gel cu lizozim. Godeul 5 - lizozim SPF. Godeul 6 - mortar negativ (soluție NaCl 0,15 M). Godeul 7 - soluție de proteine din ouă PC2 lot I. Godeul 8 - soluție de proteine din ouă PC2 lot II. Godeul 9 - lizozim PC2.

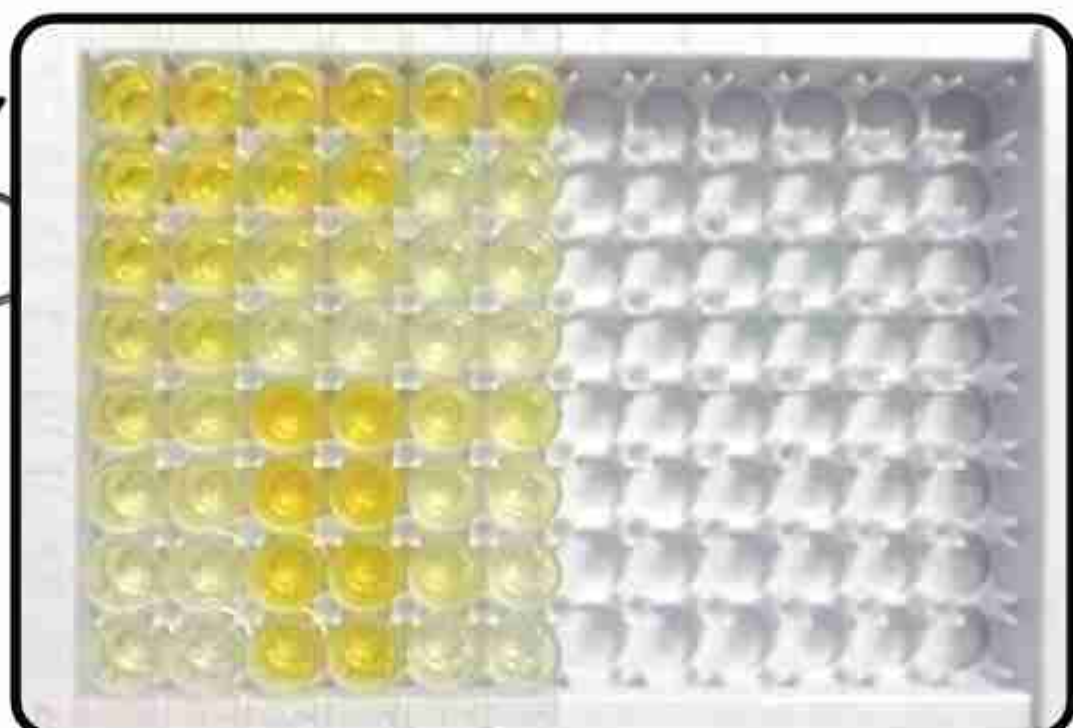


Fig. 3 - Testul ELISA de cuantificare a lizozimului PC2. Au fost utilizate diluții seriiale de lizozim PC2 (0,625 ng/ml; 1,25 ng/ml; 2,5 ng/ml; 5,0 ng/ml; 10,0 ng/ml; 20,0 ng/ml; 40,0 ng/ml. Ecuația curbei de calibrare: $y = 0,0267x + 0,2358$. $R^2 = 0,8976$

Proba	Concentrație lizozim mg%
P1 - soluție apoasă de lizozim	42,547
P2- soluție apoasă de lizozim concentrată	1674,906
P3 - proteine bioactive extrase din albuș de Ou Hiperimun	0,182
P4- lizozim liofilizat	0,397
P5 - soluție apoasă de lizozim obținută din ouă hiperimunizate cu antigen Staphylococcus aureus	386,856
P6 - gel cu 46% lizozim (LizoRepair Gel)	1,628
P7 - gel cu 40% lizozim (LizoRepair Gel)	0,141
P8 - cremă cu lizozim	0,072

Tabel 2. Concentrația de lizozim din diferite produse imunologic active - determinare prin testul ELISA sandwich

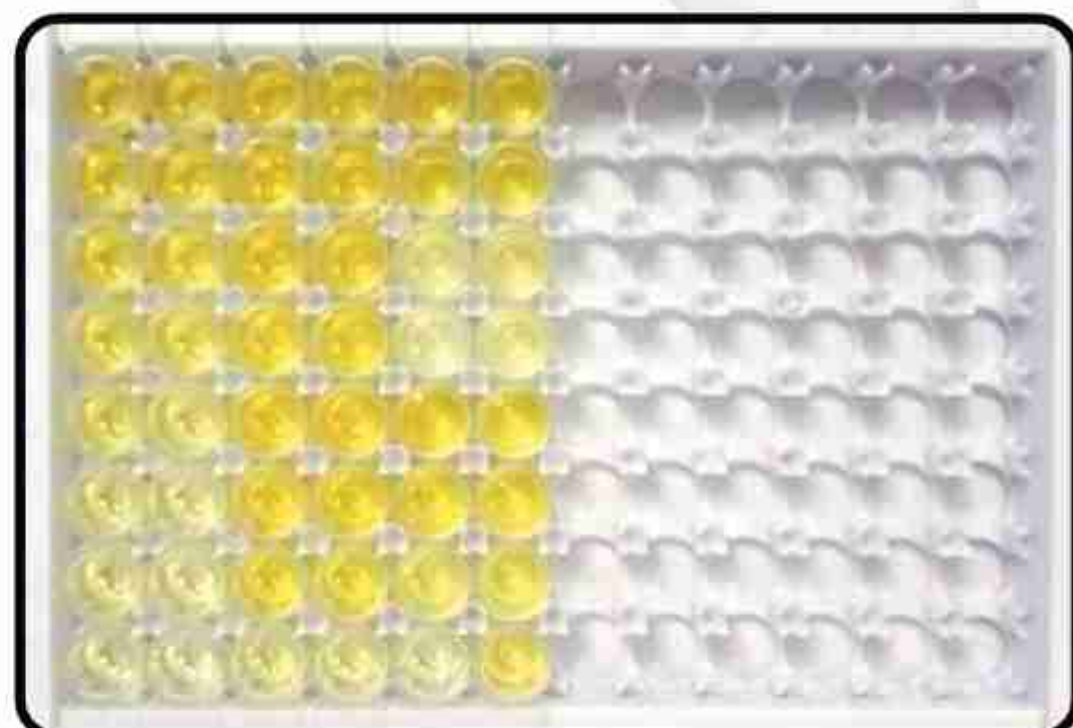


Fig. 4 - Testul ELISA de cuantificare a lizozimului standard. Au fost utilizate diluții seriiale de lizozim standard (0,625 ng/ml; 1,25 ng/ml; 2,5 ng/ml; 5,0 ng/ml; 10,0 ng/ml; 20,0 ng/ml; 40,0 ng/ml. Ecuația curbei de calibrare: $y = 0,0355x + 0,2932$. $R^2 = 0,9269$

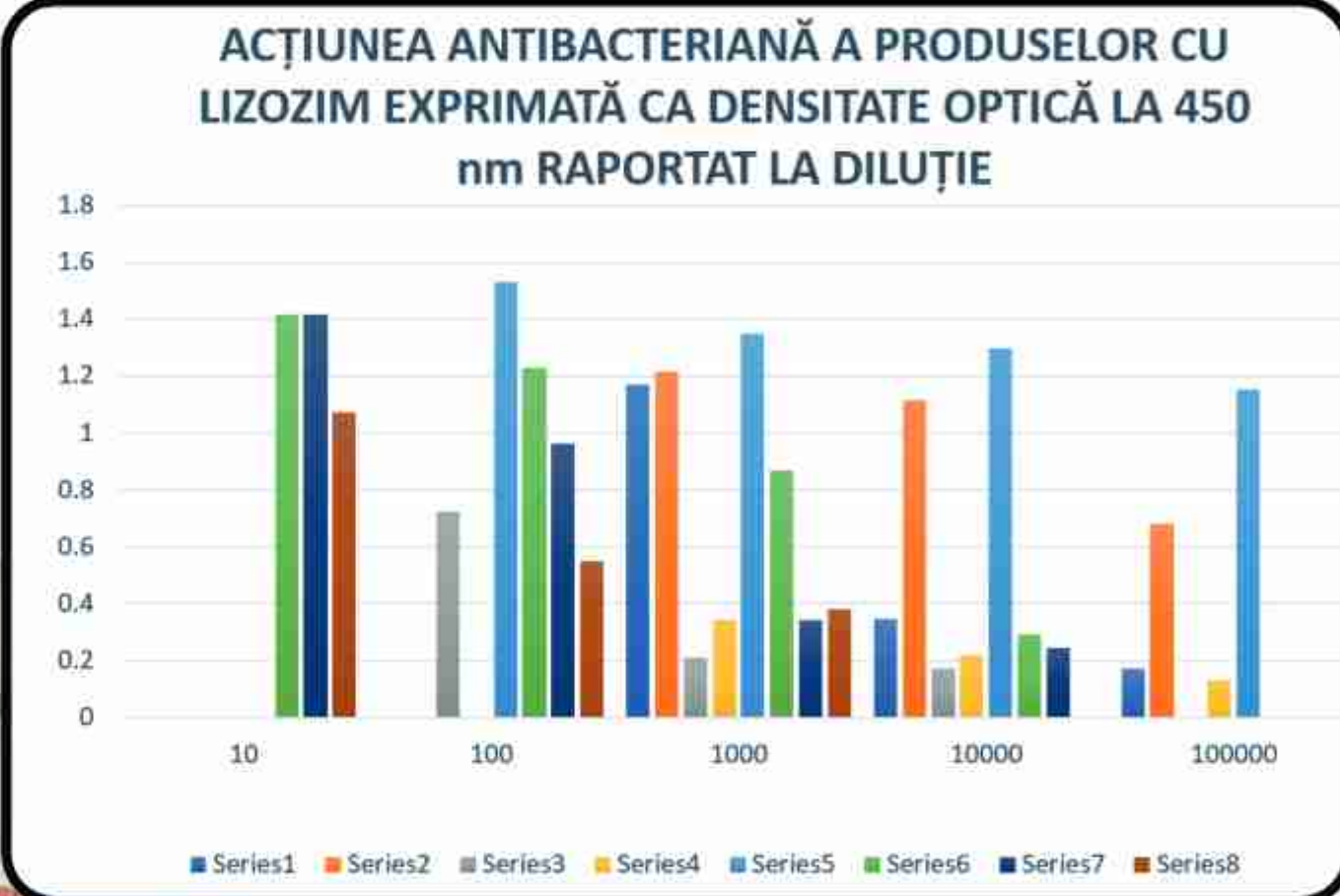


Fig. 5 - Valoriile densităților optice DO la 450 nm determinate prin testul ELISA efectuat pe diluții seriiale cu ratia 10 ale probelor cu lizozim în diferite matrice (seria 1 = P1; seria 2 = P2, seria 3 = P3; seria 4 = P4; seria 5 = P5; seria 6 = P6, seria 7 = P7; seria 8 = P8)

CONCLUZII

- Preparatele imunologic active obținute și testate au prezentat activitate antimicrobiană diferită, în funcție de suportul folosit. Activitatea antimicrobiană a fost apropiată de cea a unui preparat standard de lizozim. S-a constatat eficiența preparatelor purificate de lizozim încorporate în diferite matrici, acestea acționând la concentrații foarte mici (0,625 ng/ml).
- Din datele obținute în acest studiu se poate afirma că lizozimul ar putea fi utilizat ca o alternativă viabilă la antibiotice, în special în cazul infecțiilor cu germeni rezistenți la antibiotice.
- Datorită proprietăților sale antimicrobiene lizozimul PC2 poate fi utilizat în industria farmaceutică pentru obținerea preparatelor cu potențial imunoterapeutic. Componentele bioactive ajută la întărirea sistemului imunitar al organismelor, reprezentând o modalitate eficientă de a asigura imunitate împotriva unor agenți patogeni bacterieni sau virali.

BIBLIOGRAFIE

1. Thomas, E. J. M. A., Susan B. Feist, Fassbender, K., Jenu, M. E., Matzke, B. L., Kottner, K. E., (1988). Quantification of hen egg white lysozyme in eggwhite by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Connect. Cell and Tissue Research*, 12, 181-198. 2. Vidal, Mary-Laure, Gaudin, J., Nys, Y., (2005). Development of an ELISA for Quantifying Lysozyme in Hen Egg White. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2775-2783. 3. Gellera, L., Michalski, J. (2000) Lysozyme in the animal kingdom. *J. Biosci.* 13, 17-24. 4. Derré, M., Lechevalier, M., Guerin-Dubard, C. et al. (2013) Hen egg white lysozyme: bioactive, bactericidal, cell cycle and "killer" membrane. *J. Agric. Food Chem.* 61, 9923-9928. <https://doi.org/10.1021/jf4029199>. 5. Hancock, R. E. W., Scott, M. G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8896-8899. 6. Ibrahim, H. R., Masad, D., Abdou, A. et al. (2005) Processing of lysozyme (EC 3.2.1.30) by a specific action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach. *Biochim. Biophys. Acta* 1726:102-114. <https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2005.07.008>. 7. Ibrahim, H. R., Hamada, K., Mulya, T. (2017) Novel peptide motifs from lysozyme suppress pro-inflammatory cytokines in macrophages by antagonizing toll-like receptor and TLR-4 scavenging action. *Eur. J. Pharm. Sci.* 107:240-248. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.07.005>

Clasa de expozate G: Sănătate – Medicină – Cosmetică



UTILIZAREA UNEI METODE HPLC ÎN MODELAREA EXPERIMENTALĂ
A UNUI VACCIN CONTRA PESTEI PORCINE AFRICANE

Viorica Chiurciu¹, Elena Oltean¹, Elena Lupu¹, Silvia Stănculescu¹, I. Nicolae¹, Narcisia Mederle²

¹ Romvac Company S.A. – Voluntari, ² Universitatea de Științe Veterinare "Regele Mihai I" Timișoara

INTRODUCERE Saponinele sunt derivați secundari de origine vegetală, cu gust amar și cu proprietatea de a spuma în soluții apoase. Natura amfipatică a saponinelor permite utilizarea lor ca și agenți de suprafață, datorită capacității lor de a interacționa cu componentele celulare (fosfolipide și colesterol). Diferite tipuri de saponine sunt utilizate ca și adjuvanți ai vaccinurilor și imunostimulatori, datorită capacității lor de a stimula răspunsul imun, crescând, astfel, eficiența vaccinului. VET SAP este o saponină triterpenică înalt purificată extrasă din Quillaja Saponaria Molina. Este cunoscută ca QS21 și este considerată adjuvantul "standard de aur" datorită proprietăților de a potența răspunsul imun față de antigenele vaccinale. Acidul nicotinic este prezent în mediul MEM și a fost considerat marker de doze.

MATERIALE ȘI METODE

(Thermo Fischer Scientific - SUA), echipat cu pompă RS, autosampler RS, compartiment pentru coloane RS și detector diode array RS.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

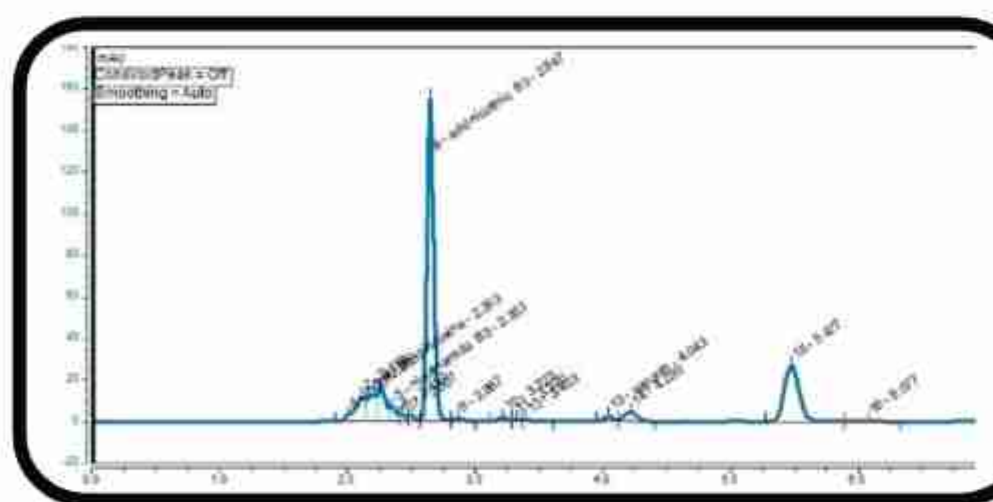


Fig. 1. Cromatograma modelului experimental nr. 1



Fig. 2. Cromatograma modelului experimental nr. 2

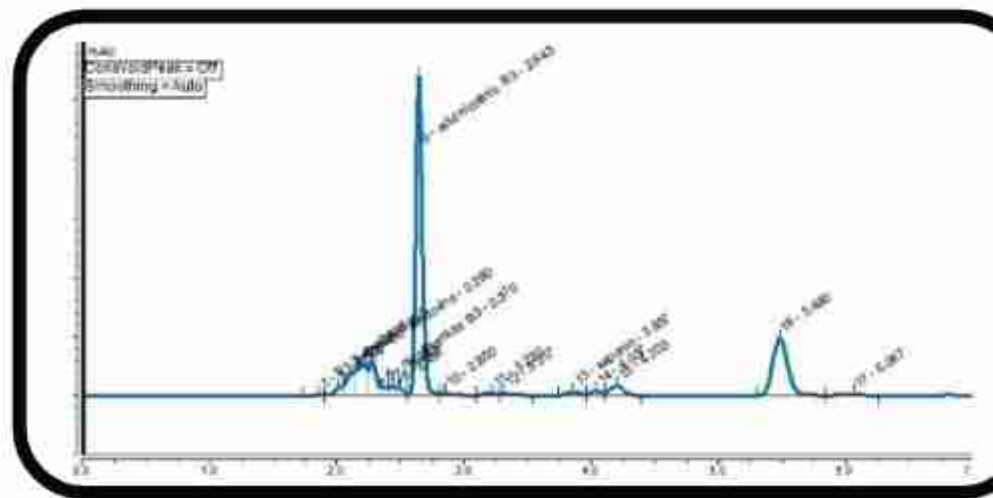


Fig. 3. Cromatograma modelului experimental nr. 3

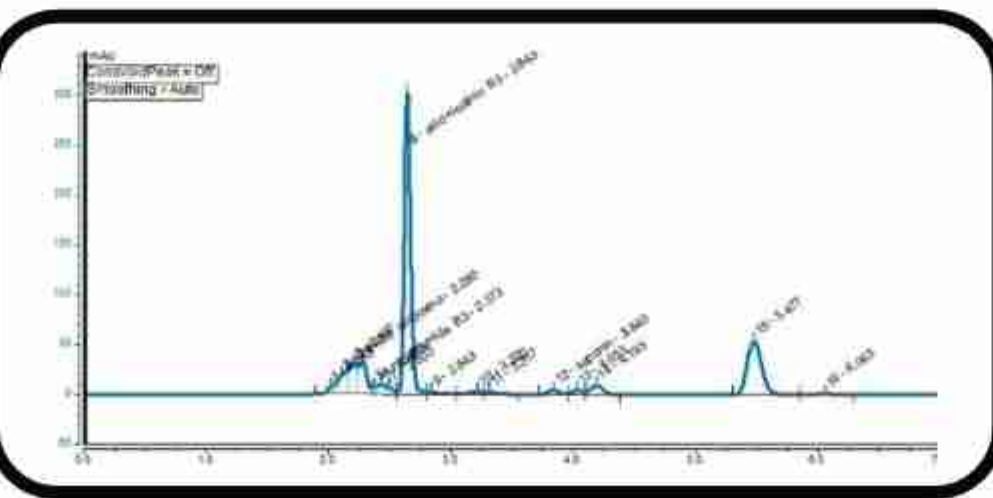


Fig. 4. Cromatograma modelului experimental nr. 4

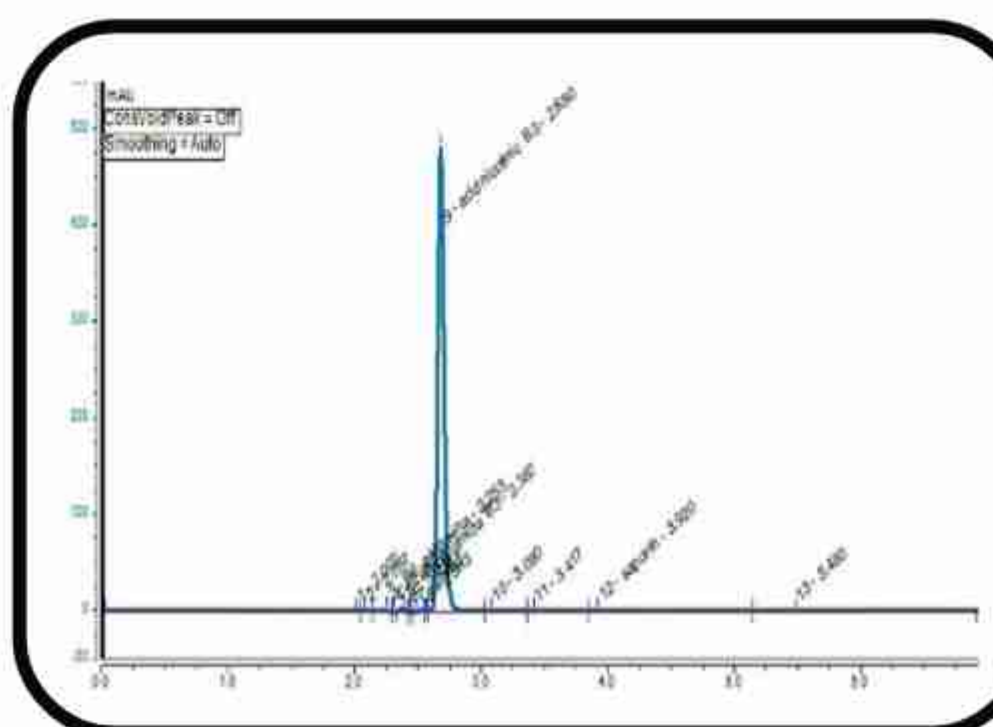


Fig. 5. Cromatograma standard saponină

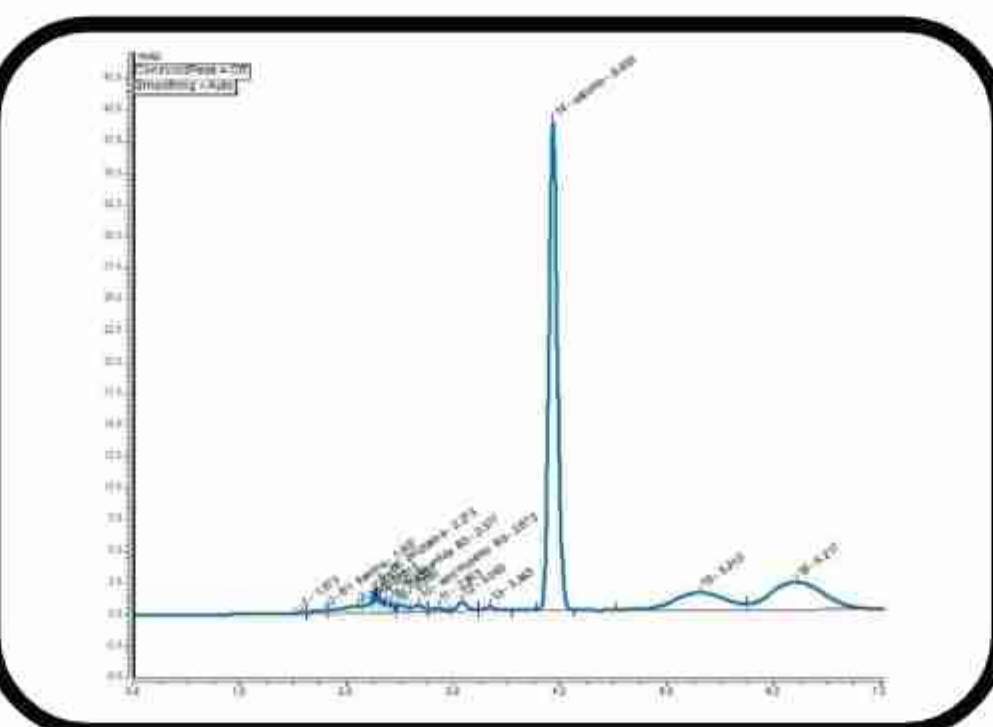
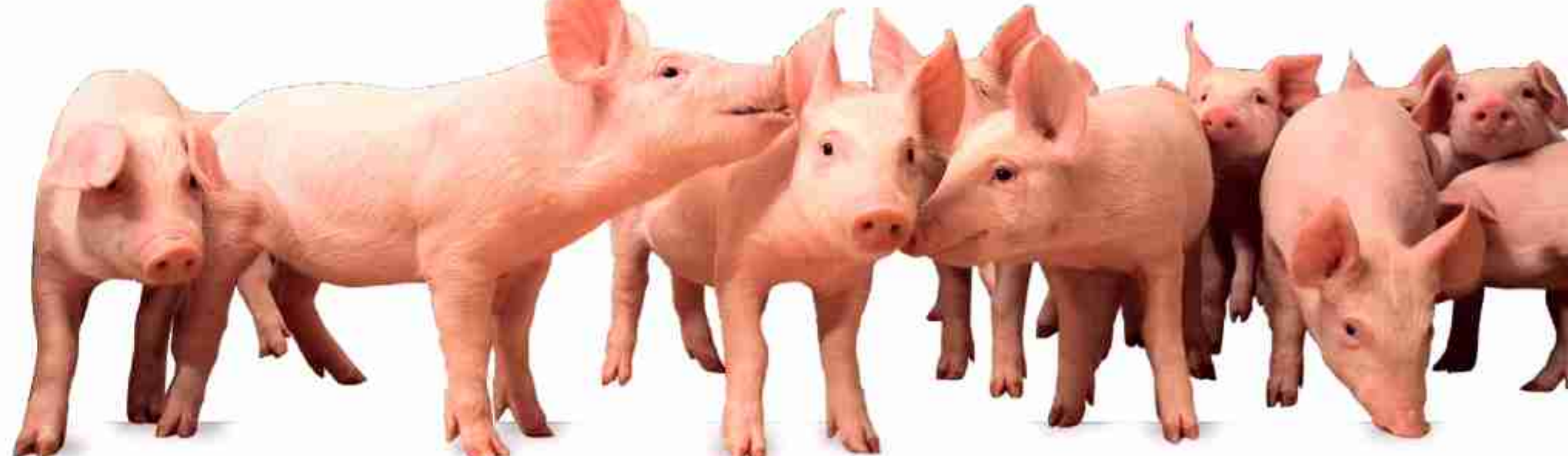


Fig. 6. Cromatograma standard acid nicotinic

CONCLUZII

- A fost dezvoltată și validată o metodă HPLC simplă, exactă, precisă și selectivă pentru determinarea saponinei și acidului nicotinic din diferite tipuri de adjuvanți pentru vaccinul contra pestei porcine africane. • Metoda prezintă o bună liniaritate și separare a saponinei și acidului nicotinic de matricea vaccinului. Valorile LOD și LOQ scăzute permit detecția și cuantificarea concentrațiilor mici. Metoda de analiză este simplă, timpul de analiză este scurt, eluția izocratică și detectorul UV fiind disponibile în majoritatea laboratoarelor de separare. • Rezultatele prezentate în acest studiu confirmă că metoda HPLC poate fi utilizată pentru studiile calitative și cantitative ale suportului de vaccin contra pestei porcine africane. • Metoda prezentată permite dozarea de finețe a adjuvantului VET SAP prezent în formula de vaccin, precum și componenta mediului de cultură viral, prin intermediul acidului nicotinic, considerat marker specific al acestuia. • De asemenea, metoda poate fi extinsă și pentru alte modele experimentale de suport vaccinal sau chiar pentru vaccinurile care au în compoziție saponine.



PARAMETER	RETENTION TIME min.		AREA mAU/min		THEORETIC PLATES EP	
	Saponin	Nicotinic acid	Saponin	Nicotinic acid	Saponin	Nicotinic acid
Saponin 1 mg/ml	3,933	-	55,240	-	11591	-
Nicotinic acid 0.1 mg/ml	-	2,680	-	27,851	-	14922
Experimental model V1	4,043	2,647	0,213	9,388	10933	12722
Experimental model V2	3,867	2,643	0,263	14,723	6285	12593
Experimental model V3	3,857	2,643	0,354	16,495	6085	12449
Experimental model V4	3,840	2,643	0,434	18,480	7748	12489

Tabel 1. Specificitatea metodei HPLC pentru determinarea saponinei și acidului nicotinic în patru modele experimentale de adjuvant pentru vaccinul contra pestei porcine africane

PARAMETER	EXPERIMENTAL VALUES	
	Saponin	Nicotinic acid
Correlation coefficient (r ²)	0.9989	0.9980
Standard (mg/ml) range	0.50 - 1.30	0.05 - 0.13
Accuracy (%)	121.90	108.10
Precision (%)	0.94	1.00
LOD (mg/ml)	0.02905	0.002878
LOQ (mg/ml)	0.0802	0.008720
Theoretical plates (EP)	101941	11147
Asymmetry (EP)	1.30	1.24

Tabel 2. Parametri cromatografici pentru picurile de saponină și acid nicotinic separate în soluție standard

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abouyou, S. E., Barriento, R., Torres, D. B., Sweeney, S., Whalen, S., Whalen, C., Matyas, S. R., (2023). A liquid chromatograph high-resolution tandem mass spectrometry method for the determination of QS-21 in vaccine formulations. *ACS Omega*, 8, 13, 23181-23185. 2. Oshibara, A. M., (2017). Adjuvant system QS-21: a review of its use and development. *Vaccine*, 35(12), 2275-2283. 3. Gellera, L., Michalski, J., (2000). Lysozyme in the animal kingdom. *J. Biosci.* 13, 17-24. 4. Derré, M., Lechevalier, M., Guerin-Dubard, C. et al. (2013) Hen egg white lysozyme: bioactive, bactericidal, cell cycle and "killer" membrane. *J. Agric. Food Chem.* 61, 9923-9928. <https://doi.org/10.1021/jf4029199>. 5. Hancock, R. E. W., Scott, M. G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8896-8899. 6. Ibrahim, H. R., Masad, D., Abdou, A. et al. (2005) Processing of lysozyme (EC 3.2.1.30) by a specific action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach. *Biochim. Biophys. Acta* 1726:102-114. <https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2005.07.008>. 7. Ibrahim, H. R., Hamada, K., Mulya, T. (2017) Novel peptide motifs from lysozyme suppress pro-inflammatory cytokines in macrophages by antagonizing toll-like receptor and TLR-4 scavenging action. *Eur. J. Pharm. Sci.* 107:240-248. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.07.005>

Clasa de expozate G: Sănătate – Medicină – Cosmetică



UTILIZAREA CAPACITĂȚII DE INHIBARE "IN VITRO" A MULTIPLICĂRII BACTERIENE, ÎN PREZENȚA OVOTRANSFERINEI, ÎN MEDICINA ALTERNATIVĂ (GELURI CU OVOTRANSFERINĂ)

Ionel Victor Pătrașcu, Viorica Chiurciu, Constantin Chiurciu, Mariana Oporanu, Elena Oltean, Georgiana Topilescu, Iuliana Mihai¹

¹ Romvac Company S.A. – Voluntari

INTRODUCERE

Ovotransferina este o componentă semnificativă a oului de pasăre (găină), cu rol în sistemul de apărare nativ față de germeii patogeni. Această capacitate de apărare nativă are la bază proprietatea ovalbuminei de a lega ioni trivalenți de fier Fe³⁺, necesari multiplicării bacteriene. În lipsa fierului, bacteriile nu se pot deplasa, demonstrând astfel, și acțiunea bacteriostatică a ovotransferinei. Există date privind activitatea antifungică și antivirală a ovotransferinei. Cercetările cuprinse în acest studiu au avut drept scop obținerea unei ovotransferine specifice față de un anumit antigen, prin imunizarea selectivă a găinilor. Pentru prepararea antigenelor folosite pentru imunizarea specifică a găinilor au fost izolate bacterii, virusuri și ciuperci provenite de la pacienți internați în spitalele din România, microorganisme rezistente la antibiotice. În plus, găinilor folosite pentru imunizare li s-a administrat în furaje un imunomodulator P, pentru stimularea răspunsului imun.

MATERIALE ȘI METODE

1. Recoltarea de bacterii, virusuri și ciuperci de la pacienți din România și prepararea antigenelor specifice. 2. Imunizarea specifică a găinilor, cu fiecare antigen în parte sau cu antigen multiplu, în amestec cu adjuvant Q-21, și administrarea orală, în paralel, a unui imunomodulator P în furajele găinilor. 3. Recoltarea ouălor după ultima imunizare și precipitarea selectivă, urmată de purificare, a ovotransferinei. 4. Testarea calitativă și cantitativă a purificatului de ovotransferină obținut. 5. Efectul bacteriostatic și bactericid al preparatelor cu ovotransferină (geluri cu ovotransferină).

REZULTATE ȘI DISCUȚII



Fig. 1 - Testul de seroaglutinare pentru punerea în evidență a inhibării multiplicării bacteriene. A - Reacție pozitivă, inhibarea multiplicării culturii de Salmonella enteritidis în prezența preparatului purificat de ovotransferină specifică, provenită de la ouălele găinilor imunizate cu Salmonella enteritidis. B - Reacție negativă - cultură de Salmonella enteritidis în prezența unui preparat purificat de ovotransferină obținută din ouă provenite de la găini SPF (libere de germeni).

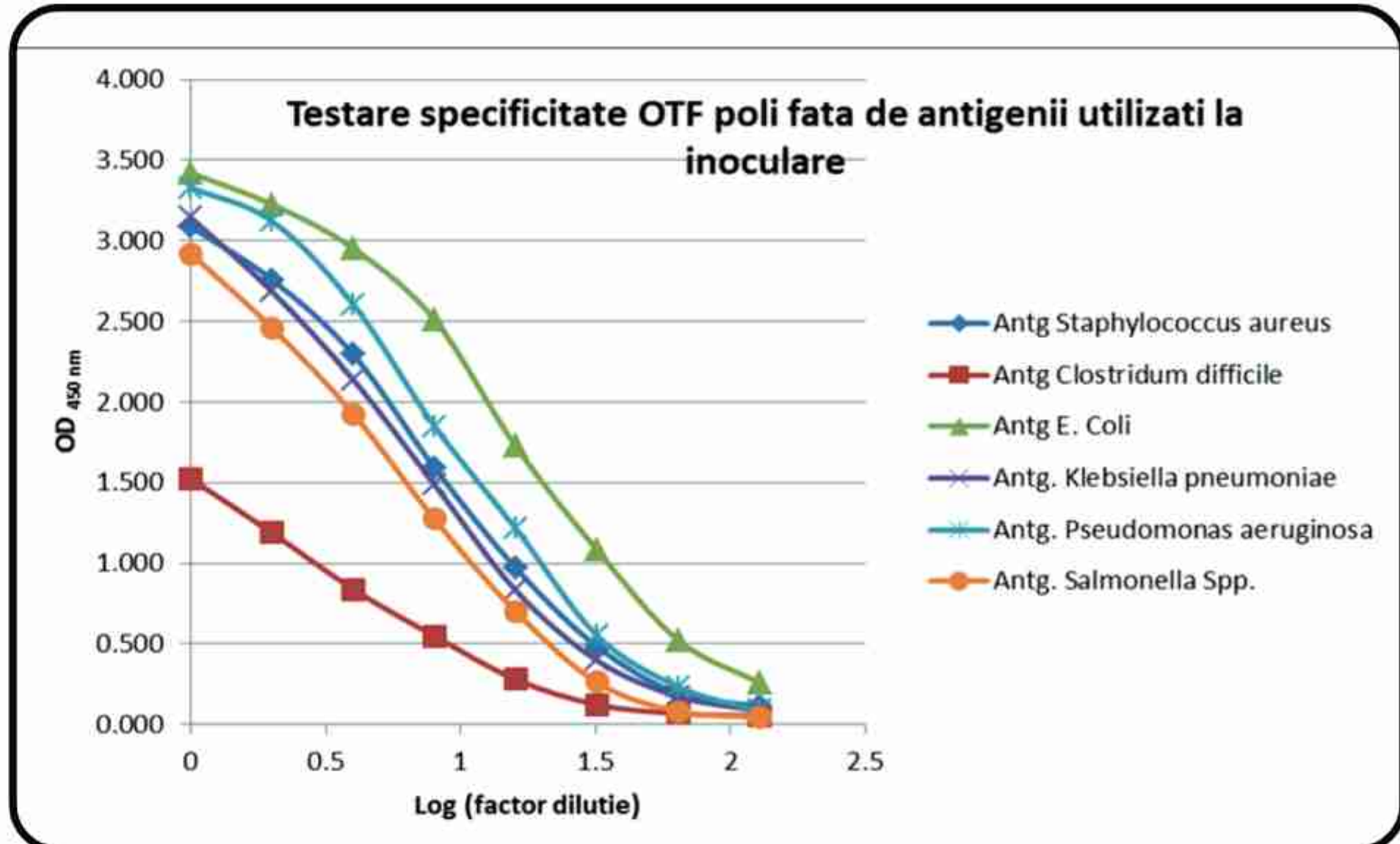


Fig. 2 - Testarea specificității preparatelor purificate de ovotransferină specifică față de antigenele folosite pentru imunizarea găinilor (metoda ELISA). Reprezentarea grafică a variației densității optice DO la 450 nm față de diluția probelor. Toate antigenele folosite pentru imunizare au fost preparate prin recoltare de la pacienți din România.

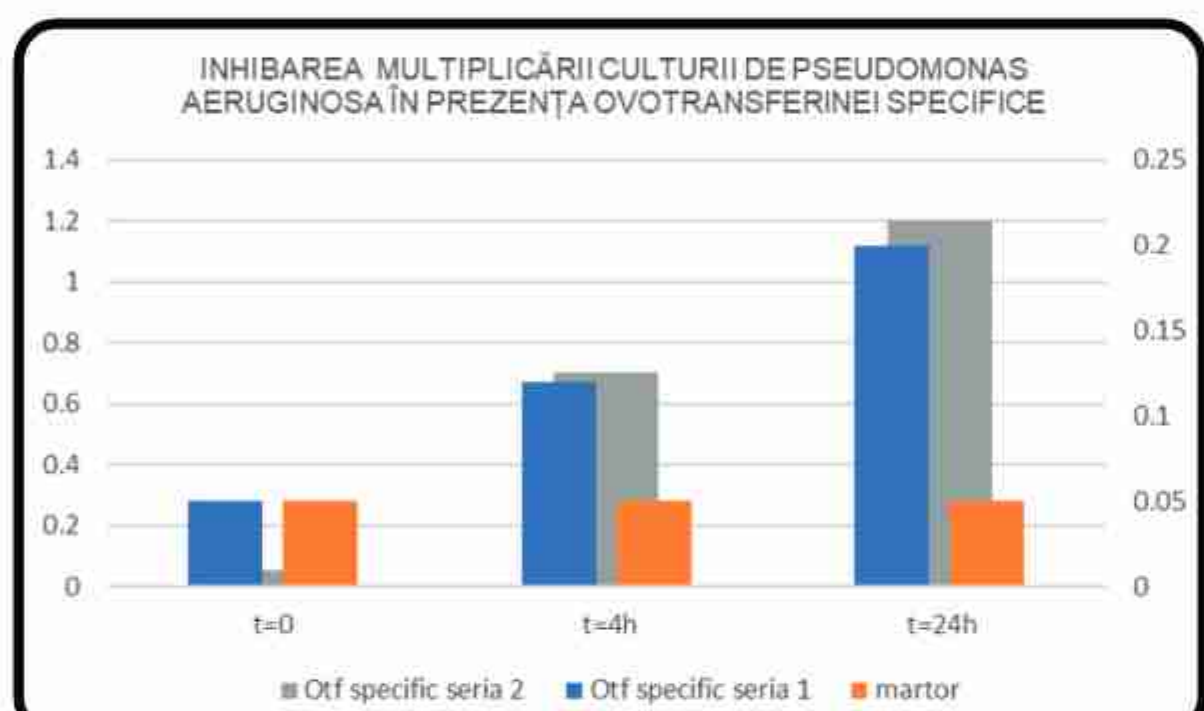


Fig. 3 - Inhibarea multiplicării culturii de Pseudomonas aeruginosa în prezența ovotransferinei specifice. Seria 1 și 2 reprezintă serii de preparate purificate de ovotransferină specifică obținută din ouă de găini imunizate cu antigen E. coli recoltat de la bolnavii de febră tifoidă și controlul cu ouă de găini. Materialul este reprezentat de ovotransferină purificată din ouă de găini SPF (libere de germeni). Timpul de reacție au fost de 0, 6, și respectiv 24 ore.

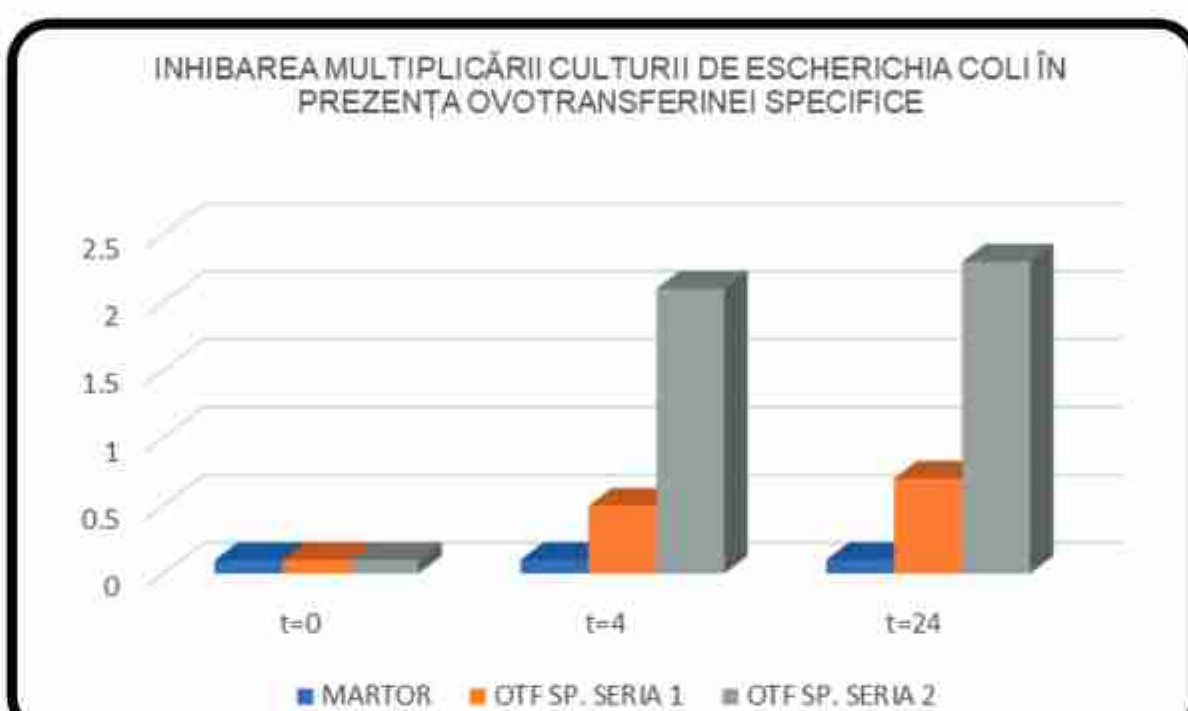


Fig. 4 - Inhibarea multiplicării culturii de Escherichia coli în prezența ovotransferinei specifice. Seria 1 și 2 reprezintă serii de preparate purificate de ovotransferină specifică obținută din ouă de găini imunizate cu antigen E. coli recoltat de la bolnavii de febră tifoidă și controlul cu ouă de găini. Materialul este reprezentat de ovotransferină purificată din ouă de găini SPF (libere de germeni). Timpul de reacție au fost de 0, 6, și respectiv 24 ore.

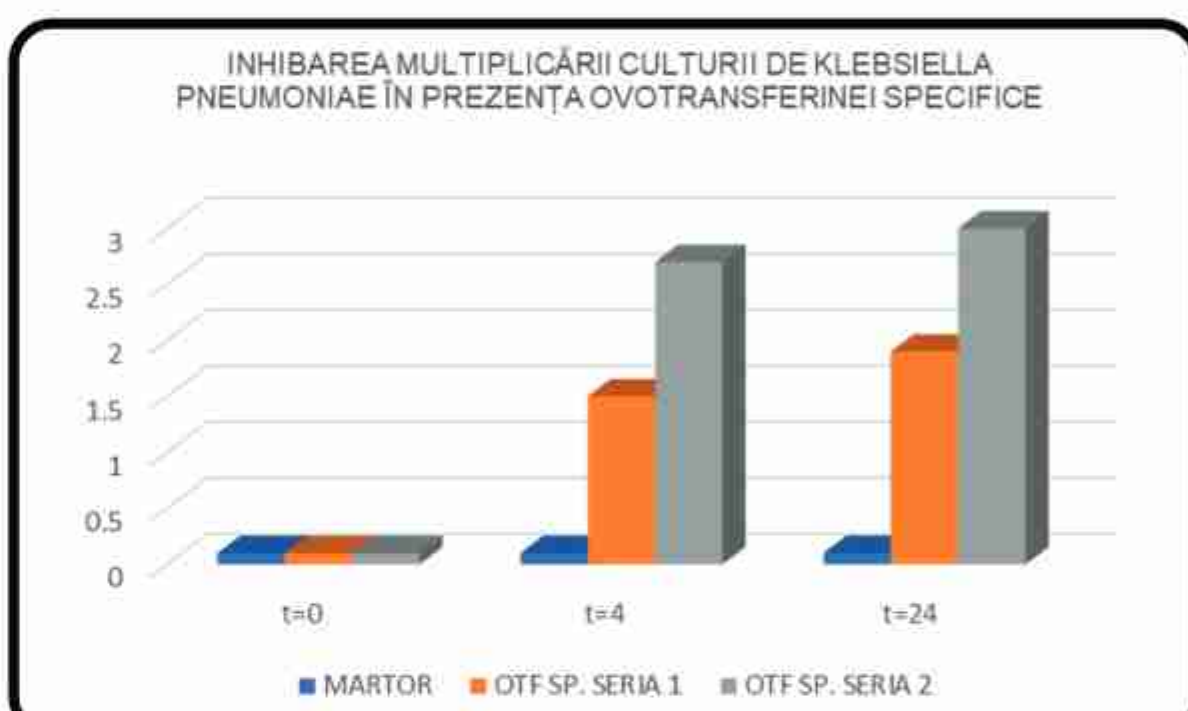


Fig. 5 - Inhibarea multiplicării culturii de Klebsiella pneumoniae în prezența ovotransferinei specifice. Seria 1 și 2 reprezintă serii de preparate purificate de ovotransferină specifică obținută din ouă de găini imunizate cu antigen E. coli recoltat de la bolnavii de febră tifoidă și controlul cu ouă de găini. Materialul este reprezentat de ovotransferină purificată din ouă de găini SPF (libere de germeni). Timpul de reacție au fost de 0, 6, și respectiv 24 ore.

CONCLUZII

- Ovotransferina specifică joacă un rol important în apărarea organismelor față de infecțiile bacteriene, virale și fungice. Prin stimularea antigenică a găinilor cu antigene bacteriene, virale sau fungice specifice, se obține o ovotransferină înalt reactivă față de agentul patogen folosit ca și antigen, comparativ cu ovotransferina purificată din ouă de găină SPF (libere de germeni).
- Prin incorporarea preparatelor purificate de ovotransferină specifică în matrice de gel, se obțin produse farmaceutice, cu utilizare în medicina alternativă. Gelurile cu ovotransferină determină inhibarea specifică a creșterii și dezvoltării agenților infecțioși față de care a fost sintetizată.
- Prin incorporarea altor ingrediente (vitamina E, pantenol, gel de Aloe Vera, ulei de cocos, ulei de mentă), aceste geluri au o acțiune calmantă și hidratantă la nivel tegumentar. Datorită acestor proprietăți, gelurile cu ovotransferină specifică reprezintă o alternativă la tratamentul cu antibiotic și antiinflamatoare chimice, de sinteză.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Elison R.T. (1994) The Effects of Lactoferrin on Gram-Negative Bacteria. Br. J. Exp. Path. 70, 697-704.
- Suava R. W., Xiaole Kong, Hider R.C. (2012) Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents. Bioch. Bioph. Act. 1820, 282-290. 2. Ferrandini J. P. (1982) Lactoferrin, J. of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, Raven Press, New York. 3. Reiter B., Brock J.H., Steel E.D. (1975) Inhibition of Escherichia coli by bovine colostrum and post-colostrum milk. II. The bacteriostatic effect of lactoferrin on a serum susceptible and serum resistant strain of E. coli. Immunology. 28: 83-95. 4. Jiaoping Wu, Jiaoping Wu (2012). Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation Food Research International Volume 46, Issue 2, May 2012, Pages 480-487. 5. Baron, F.; Nias, F.; Guéhen-Dubard, C.; Bonmassie, S.; Gautier, M.; Andrews, S.C.; Jan, S. (2016) Egg White versus Salmonella Enteritidis: A harsh Medium Meets a Resilient Pathogen. Food Microbiol., 53, 80-93. 6. Chen, J.; Thesmar, H.S.; Kerr, W.L. (2008) Outgrowth of Salmonellae and the Physical Property of Albumen and Vitelline Membrane as Influenced by Egg Storage Conditions. J. Food Prot., 68, 2552-2558. 7. Clavijo, R.L.; Lou, C.; Andersen, S.L.; Rhee, M.C.; Lu, S. (2008) Identification of Genes Associated with Survival of Salmonella Enterica Serovar Enteritidis in Chicken Egg Albumen. Appl. Environ. Microbiol., 72, 1055-1064.

Clasa de expozate G: Sănătate – Medicină – Cosmetică



OVOTRANSFERINA MODERNĂ – ANTIGEN SPECIFIC CU ROL ÎN STIMULAREA RĂSPUNSULUI IMUN ÎN INFECȚIILE CU SALMONELLA ENTERITIDIS ȘI ESCHERICHIA COLI

Viorica Chiurciu, Constantin Chiurciu, Ionel Victor Pătrașcu, Mariana Oporanu, Elena Oltean, Georgiana Topilescu¹

¹ Romvac Company S.A. – Voluntari

INTRODUCERE

Lucrarea se referă la o metodă de producere a ovotransferinei specifice OTF-M pentru un antigen țintă cu aplicații în medicină. Metoda constă în imunizarea găinilor ouătoare cu un antigen format dintr-un amestec de tulpini bacteriene de Salmonella enteritidis și E. coli rezistente la antibiotice, izolarea albușului din ouăle care provin de la găinile imunizate, diluarea acestuia în raport de 1:1 cu apă deionizată, ajustarea pH la 5, precipitarea în două etape cu sulfat de amoniu și acid citric, urmată de dializă și liofilizare. OTF aparține grupului de proteine numite metaloproteine care induc formarea de compuși responsabili de șocul termic. Datorită acestei caracteristici, OTF poate fi utilizată în creme și unguente de protecție contra stresului la frig sau la alți factori de mediu.

MATERIALE ȘI METODE

1. Prepararea antigenului - s-au folosit tulpini bacteriene din colecția ROMVAC COMPANY (*Salmonella enteritidis* RO-TL 248) sau obținute din spitalele din România (*Escherichia coli*), rezistente la antibiotice. 2. Imunizarea găinilor ouătoare cu antigenele în combinație cu adjuvantul QS21 (acesta crește titrul răspunsului imun și nu produce reacții la locul de inoculare) și colectarea ouălor la interval de 14 zile de la ultima inoculare cu antigen. 3. Prepararea ovotransferinei din albușul de ou provenit de la găinile imunizate specific, prin diluare cu apă deionizată, urmată de corecția de pH la valoarea 4,5 - 5,0. 4. Purificarea ovotransferinei prin precipitare în două etape, cu sulfat de amoniu și acid citric, urmată de dializă față de o soluție de NaCl 0,15 M. 5. Purificarea finală prin filtrare tangențială folosind casete de 30 kDa, în prezență de tampon fosfat diluat (PBS) pH 7. 6. Liofilizarea preparatului purificat de ovotransferină și/ sau repartizarea sterilă în flacoane pentru tratament oro-faringo-gastro-intestinal. 7. Pentru utilizarea în tratamentele locale cutanate, se amestecă cu bază de gel/ unguent.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Ovotransferina modernă OTF-M a fost caracterizată calitativ și cantitativ, în timpul etapelor de preparare și purificare, prin:

- Testul de imunodifuziune în gel de agar (SPGA), pentru care se folosește serul de iepure anti-pasăre în comparație cu OTF standard.
- Testul SPGA în care se folosesc diluții binare de OTF-M testate față de antigenul dat. Se apreciază diluția maximă la care există un răspuns specific și se compară cu etalonul propriu.
- Testul ELISA calitativ
- Testul ELISA cantitativ
- Testul Bradford pentru determinarea proteinei
- Testul IMB-specific PaChi.

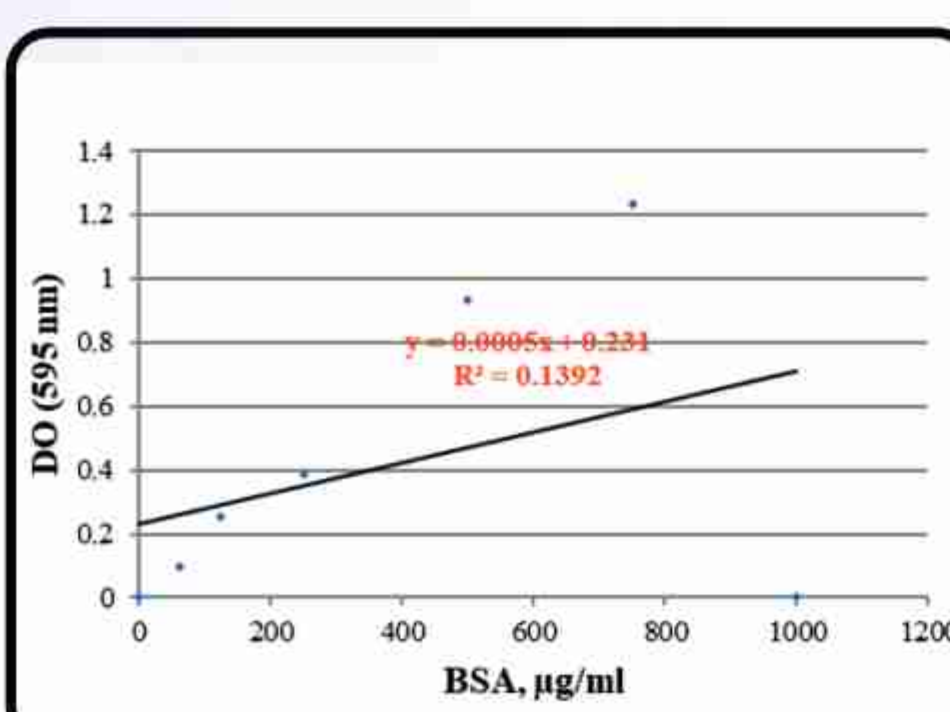


Fig. 3 - Liniaritatea testului Bradford pentru determinarea cantității de proteină totală din preparatul purificat de OTF-M

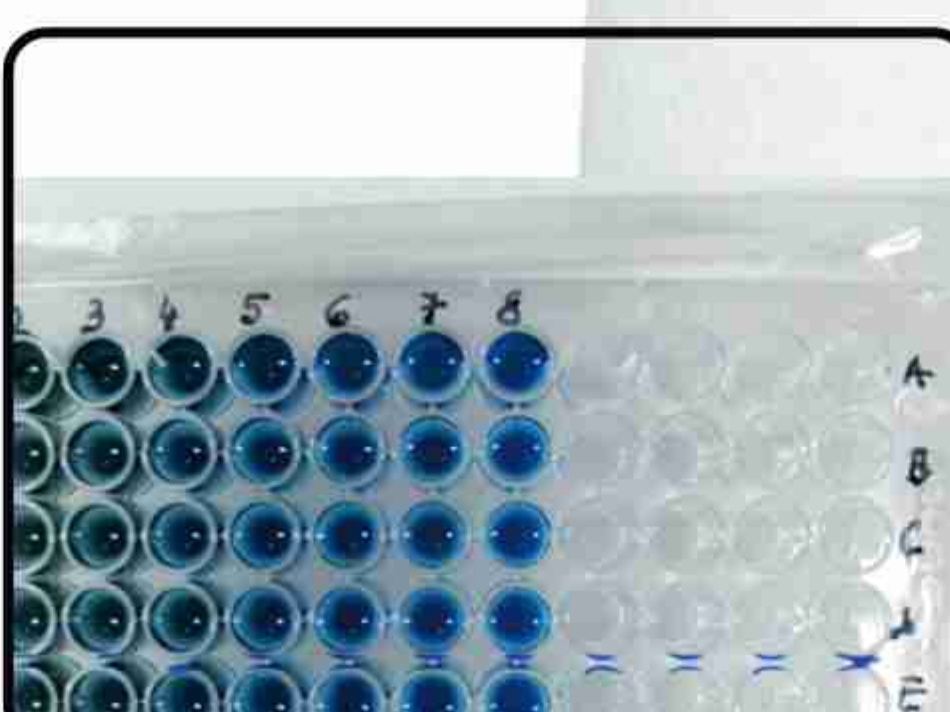


Fig. 4 - Curba de calibrare pentru determinarea cantitativă a proteinei totale prin metoda Bradford - test pe plăcuță - martor reactiv; 2 - 62,5 µg/ml BSA; 3 - 125 µg/ml BSA; 4 - 250 µg/ml BSA; 5 - 500 µg/ml BSA; 6 - 750 µg/ml BSA; 7 - 1000 µg/ml BSA; 8 - 1500 µg/ml BSA, BSA - albumina serică bovină.

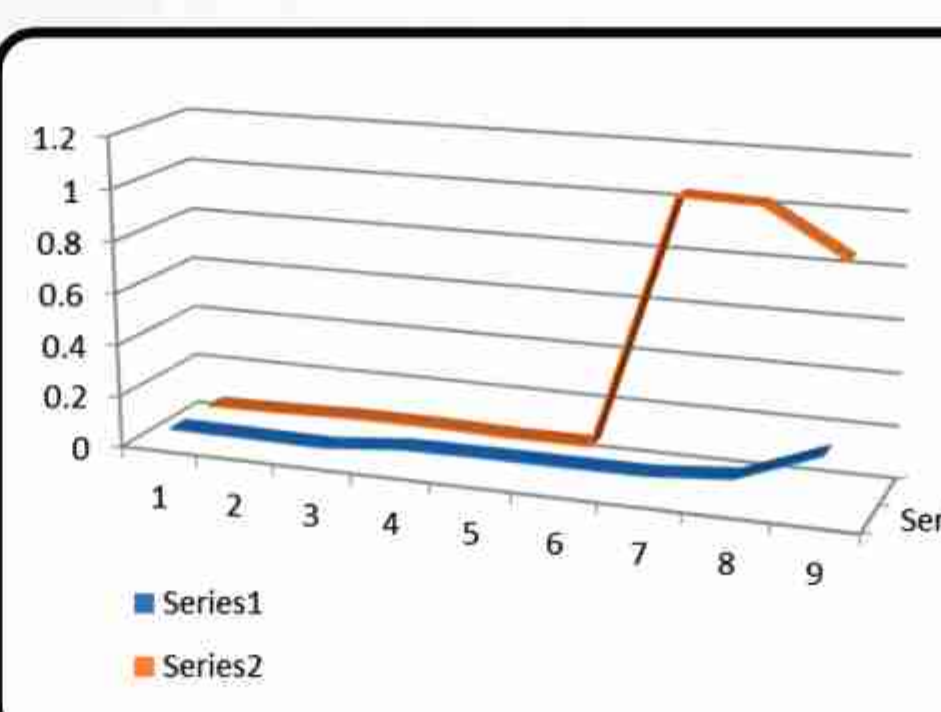


Fig. 5 - Testul PaChi - inhibarea specifică a multiplicării bacteriene (Salmonella enteritidis) în prezența preparatului liofilizat de OTF-M (albastru - proba martor de OTF-SPF; roșu - OTF-M specific anti Salmonella enteritidis). Reprezentarea grafică a densității optice DO 450 nm față de timp (ore).

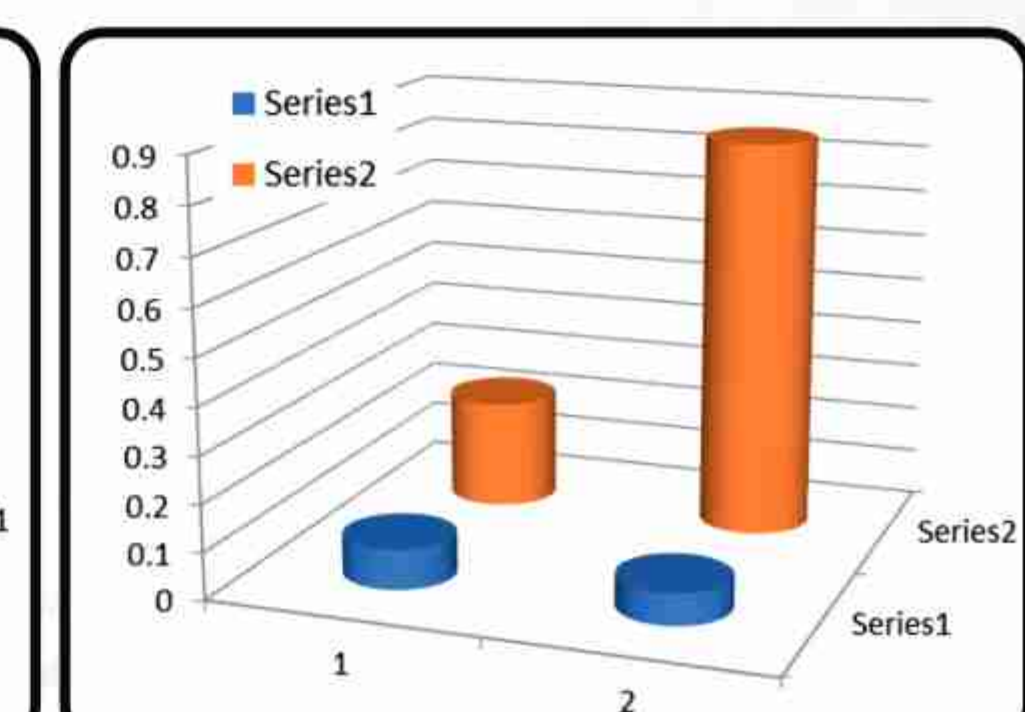


Fig. 6 - Testul PaChi - inhibarea specifică a multiplicării bacteriene (Escherichia coli) în prezența preparatului liofilizat de OTF-M (albastru - proba martor de OTF-SPF; roșu - OTF-M specific anti Escherichia coli). Reprezentarea grafică a densității optice DO 450 nm față de timp (ore).

CONCLUZII

- Prepararea ovotransferinei prin această metodă este mai simplă și mai puțin costisitoare decât cele descrise în literatură. Prin această metodă se menține structura naturală și stabilitatea ovotransferinei. Metoda este simplă, iar ciclul de extracție este scurt.
- Ovotransferina poate fi utilizată în laboratoare și clinici, fiind specifică pentru unele tulpini existente în România, tulpini care sunt frecvent rezistente la antibiotice.
- Ovotransferina se poate comercializa sub forma unui produs monovalent, fiind specifică față de un singur germe patogen sau ca o proteină complexă, naturală, având proprietăți antibacteriene față de mai multe specii bacteriene izolate de la om. Ovotransferina-specifică poate fi utilizată în tratamente antimicrobiene, antivirale și ca supliment cu fier în medicina umană.

BIBLIOGRAFIE

- Al. MASHIKH S.A. și S. NAKAI (1987) - Separation of ovotransferin from egg white by immobilized metal affinity chromatography to the isolation and the purification of hen egg white and egg yolk proteins. Eur. Food Res. Technol., 202: 1-14. 2. AMADI, A. C. (1996) - On hen egg fractionation: Application of liquid chromatography to the isolation and the purification of hen egg white and egg yolk proteins. Eur. Food Res. Technol., 202: 1-14. 3. BATTISTUZZI G., M. SOGA (1992) - α - β 2-binding to ovotransferrin in the presence of α -amino acids. Bioch., Bioph. Acta 1118, 313-317. EVANS R. W., XIAOLE KONG, R.C. HIDER (2012) - Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents - Bioch. Bioph. Act. 1820, 282-290. 4. EVANS R. W., XIAOLE KONG, R.C. HIDER (2012) - Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents - Bioch. Bioph. Act. 1820, 282-290. 5. GIAN SANTINI, P. ROSSI, MARIA TERESA MASSUCCI, D. BOTTI, G. ANTONINI, F. VALENTI, L. SEGANTI (2002) - Antiviral activity of ovotransferrin: disclosure an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin. Biol. 125-130. 6. NOLAN J.K., M. PHILLIPS, Y. MINE (2005) - Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health, J. Agric. Food Chem., 53, 8423-8431. 7. CHIURCIU VIOERICA, V. PATRASCU, C.G. CHIURCIU, GEORGIANA TOPILESCU, B. FRUNZAREANU (2014) - IMB-PaChi Assay for Growth Inhibition of Bacteria by Neutralizing IgY Antibodies. European Biotechnology Congress Lecce 2014.

Clasa de expozate G: Sănătate – Medicină – Cosmetică



OVOTRANSFERINA PC2,
COMPONENT IMUNOLOGIC ACTIV AL OULUI HIPERIMUN

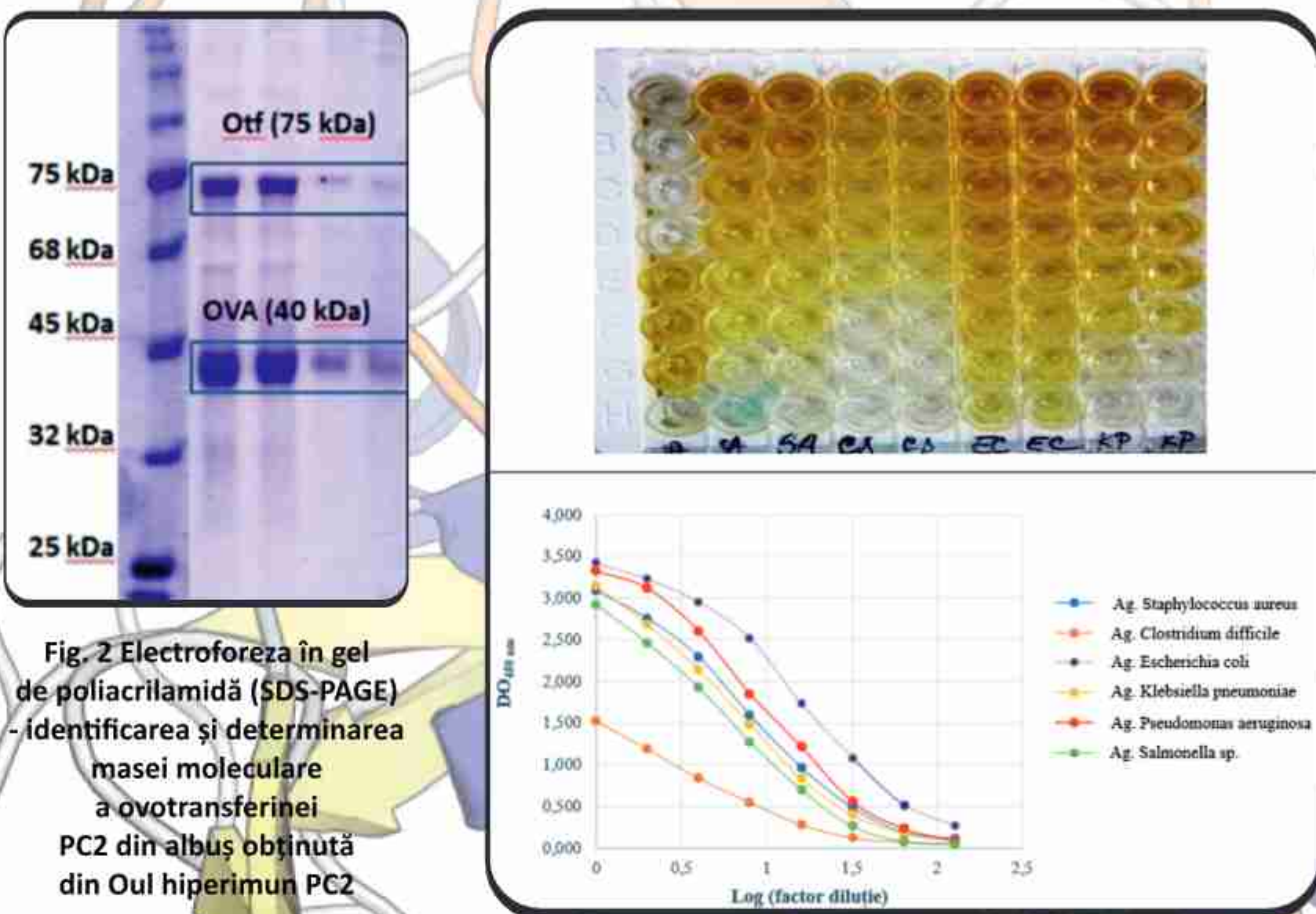
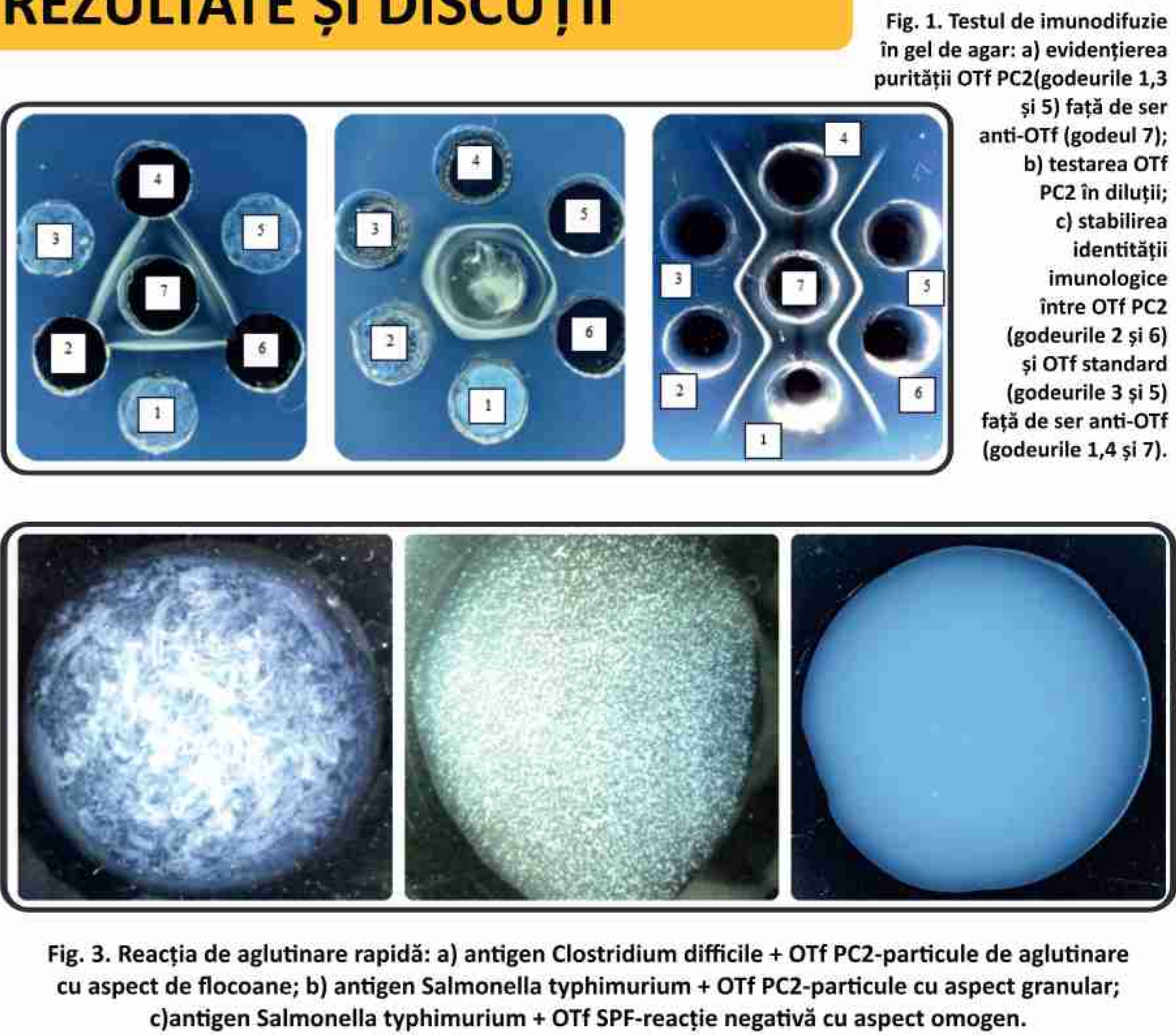
Viorica Chiurciu, Elena Lupu, Mariana Oporanu, Victoraș Iulian Iordănescu, Cristina Urducea, Elena Oltean¹
¹ Romvac Company S.A. – Voluntari

INTRODUCERE Ovotransferina (Otf) denumită și conalbumină, din familia transferinelor reprezintă o glicoproteină monomer izolată din albușul de ou. Proteina este sintetizată în oviductul găinii de gena transferin aviară și este depozitată în albuș. Reprezintă 12-13% din totalul proteinelor conținute de albuș, având o masă moleculară de 78 kDa și aceeași secvență de aminoacizi ca transferina din serul uman. Proteina se pliază sub forma a doi lobi globulari, fiecare conținând câte un locus de cuplare a fierului (Fe3+). Ovotransferina este o proteină funcțională cu bioactivități multiple. Otf și peptidele derivate din aceasta au un potențial ridicat putând fi folosite ca agenți antimicrobieni și antioxidativi în industria alimentară, dar și ca agenți cu rol antihipertensiv, anticancer, antiviral, în industria medicală și farmaceutică.

MATERIALE ȘI METODE

1. Animale - studiul s-a realizat în Laboratorul de Cercetare-Dezvoltare al Romvac Company S.A. Experimentul s-a realizat pe găini aflate la începutul perioadei de ouat în vârstă de 3 săptămâni, din rasa Health Rhode Island. Păsările s-au grupat în baterii și s-au ținut la temperatura de 20±2 °C urmând ciclul 12 ore lumină/ 12 ore întineric.
2. Antigenele - utilizate în lucrare sunt preparate din tulpini bacteriene și micotice ATCC sau din colecția laboratorului de microbiologie, astfel: Escherichia coli (ATCC 25922), Salmonella sp., Salmonella typhimurium (ATCC 14028), Streptococcus grup B, Proteus sp., Streptococcus pneumoniae (ATCC 700669), Candida krusei, Staphylococcus aureus (ATCC 29213), Acinetobacter baumannii, Candida albicans, Enterococcus faecalis (ATCC 29212), Pseudomonas aeruginosa, Clostridium difficile, Streptococcus mutans (ATCC 55677), Klebsiella pneumoniae, Helicobacter pylori (ATCC 49503), Candida glabrata.
3. Imunizarea - antigenul multiplu s-a administrat pe cale intramusculară de trei ori, la interval de 14 zile. Inoculările s-au efectuat în două puncte în musculatura pieptului câte 0,5 ml. Ouăle hiperimune s-au colectat zilnic, după două săptămâni de la ultima inoculare și păstrate la 4 °C până la obținerea ovotransferinei.
4. Prepararea ovotransferinei - Otf PC2 a fost obținută din Ouă hiperimune PC2 provenind de la găini imunizate cu antigen multiplu. Otf PC2 forma apo- s-a preparat după metoda descrisă de Abeyaratne și colab. (2013) cu unele modificări. Albușul s-a separat de gălbenuș și s-a precipitat cu sulfat de amoniu [(NH4)2SO4] 5% (w/v) și acid citric (C6H8O7) 2,5% (w/v). Suspensia s-a menținut la 4 °C timp de 12 ore pentru precipitarea Otf. După centrifugare la 10.000 × g timp de 20 minute la 4 °C, s-a colectat precipitatul (P1). Acesta s-a dizolvat în 4 volume de apă deionizată și s-a reprecipitat cu sulfat de amoniu 2% (w/v) și acid citric 1,5% (w/v). După centrifugare precipitatul (P2) s-a reluat în patru volume de apă deionizată și s-a ultrafiltrat pentru înlăturarea sărurilor. Puriitatea Otf s-a determinat prin electroforeza în gel de poliacrilamidă în sistem denaturant (SDS PAGE) și imunodifuzie în gel de agar (IDGA) față de ser anti-Otf.

REZULTATE ȘI DISCUȚII



Tabel 1. Testarea specificității Otf PC2 multiplu comparativ cu IgY PC2 multiplu

ANTIGENE	Otf PC2 multiplu	IgY PC2 multiplu	Otf SPF
1. Escherichia coli	+	+	-
2. Staphylococcus aureus	+	+	-
3. Klebsiella pneumoniae	+	+	-
4. Helicobacter pylori	+	+	-
5. Streptococcus mutans	+	+	-
6. Acinetobacter baumannii	+	+	-
7. Salmonella typhimurium	+	+	-
8. Salmonella enteritidis	+	+	-
9. Pseudomonas aeruginosa	+	+	-
10. Clostridium difficile	+	+	-
11. Enterococcus faecalis	+	+	-
12. Streptococcus pneumoniae	+	+	-
13. Proteus mirabilis	+	+	-
14. Streptococcus grup B	+	+	-
Total	14/14	14/14	14/14

- Activitatea imunologică evidențiată în acest studiu demonstrează că Otf PC2 poate fi utilizată ca mijloc biologic alternativ pentru obținerea unor soluții terapeutice în medicina umană și veterinară. Prezența reacțiilor imunologice specifice, comparabile cu cele ale imunoglobulinei (IgY), confirmă capacitatea acestei fracțiuni proteice de a recunoaște și reacționa cu antigenele bacteriene utilizate la imunizarea găinilor, aspect esențial pentru potențialul sa utilizare ca agent antimicrobian, antioxidant și imunomodulator.
- Mai mult, specificitatea ridicată demonstrată prin testul ELISA față de epitopii antigenelor bacteriene evidențiază valoarea Otf PC2 în aplicații de diagnostic și tratament. Având în vedere proprietățile sale multifuncționale - activitate antimicrobiană, antivirală, antifungică, antioxidantă și antiinflamatoare - Otf PC2 reprezintă o sursă promițătoare pentru dezvoltarea unor noi produse bioactive cu aplicabilitate în domeniul farmaceutic, nutraceutic și alimentar. Dezvoltarea unor metode simple, eficiente și rentabile de purificare a acestei fracțiuni, alături de conservarea proprietăților sale bioactive, poate deschide perspective inovative în prevenirea și controlul bolilor infecțioase, în susținerea sănătății intestinale și în menținerea statutului imunitar.
- Prin urmare, Otf PC2 poate constitui un câștig valoros în cercetarea biomedicală și nutrițională, susținând dezvoltarea unor terapii complementare și sustenabile, cu potențial de a înlocui sau suplimenta tratamentele clasice, în contextul global actual marcat de rezistența crescută la antibiotice și nevoia de soluții terapeutice sigure și naturale.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Thomas, J. W., Elemen, C., Kingston, M., Abeyaratne, E. D. N. S., Lee, H. Y., Ahn, D. U. (2014). Sequential separation of lysozyme, ovomucin, conalbumin and ovalbumin from egg white. *Food*, 56, 93-101. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.12.011.
2. Gaur, S. B., Wilson, A. G., & Kahan, A. R. (1982). The primary structure of hen egg-white lysozyme. *European Journal of Biochemistry*, 121(2), 2297-2303.
3. Castro, M. M., Lopez-Alonso Fariño, R., Nieto-Sánchez, M. L., Ramos-García, M. M., & de la Hoz, A. R. (2012). Bioactive peptides derived from the proteins of egg white by means of enzymatic hydrolysis. *US Invention Patent*, No. 8227297 B2.
4. Bartolucci, G., & Sola, M. (1992). Fe³⁺ binding to conalbumin in the presence of a amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1118(1), 113-117.
5. Rathnapark, E. C. N., Ahn, D. U., & Abeyaratne, S. (2021). Functional properties of lysozyme from chicken egg white and its derived peptides. *Reviews in Food Science and Biotechnology*, 30(1), 619-630.
6. Valente, P., Antonini, G., von Hundstein, C., Vicsa, P., Orsi, N., & Antonini, E. (1988). Studies on the antimicrobial activity of conalbumin. *International Journal of Tissue Reactions*, 1(1), 57-60.

Clasa de expozate G: Sănătate – Medicină – Cosmetică

UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN CLUJ-NAPOCA

MEMBRĂ A

UNIVERSITATEA EUROPEANĂ DE TEHNOLOGIE

Salon Internațional
al Cercetării Științifice,
Inovării și Inventicii