

STUDIU DE CAZ: TERAPIA CU IMUNOGLOBULINE Y (IGY) POLISPECIFICE LA UN PACIENT DIAGNOSTICAT CU CARCINOM SCUAMOS PELVILINGUAL, INFECTAT CU *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO-REZISTENT (MRSA)

CASE STUDY: POLYSPECIFIC IMMUNOGLOBULINE Y (IGY) THERAPY IN A PELVILINGUAL CARCINOMA DIAGNOSED PATIENT INFECTED WITH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO-RESISTANT

Teodora Supeanu¹, Alef Ibram¹, Camelia Apostol¹, Mariana Oporanu¹, Lucica Sima¹,
Viorica Chiurciu¹, C. Chiurciu¹

¹Romvac Company S.A., 7 Centurii Road, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

constantinchiurciu@gmail.com

Cuvinte cheie: *Imunoglobulina Y, Ou hiperimun, Staphylococcus aureus, MRSA*

Key-words: *Immunoglobulin Y, Hyperimmune egg, Staphylococcus aureus, MRSA*

Rezumat

Infecțiile cauzate de agenți microbieni multidrog-rezistenți complică deseori abordarea terapeutică a pacienților cu afecțiuni primare grave, precum neoplasme, insuficiențe de organ sau boli cronice. Stafilococul auriu metilino-rezistent (MRSA) reprezintă una dintre principalele bacterii nosocomiale cu răspândire globală pentru care în momentul de față se fac eforturi importante în elaborarea de noi opțiuni terapeutice. Imunoglobulina aviară (IgY) este utilizată în diverse domenii ale medicinei umane și veterinare, având acțiune dovedită împotriva unei game largi de infecții microbiene (bacteriene, micotice, respectiv virale). În studiul de față, IgY a fost administrată cu succes la un pacient cu neoplasm supraîncălzit cu MRSA, fiind încorporată în produse terapeutice pentru administrare pe cale generală și pentru aplicații locale.

Abstract

Infections caused by multidrug-resistant microbial agents often complicate the treatment of patients with severe primary conditions such as neoplasms, organ failure or chronic diseases. The methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the main global-spread nosocomial bacteria for which significant efforts are currently being made to develop new therapeutic options. Avian immunoglobulin (IgY) is used in various fields of human and veterinary medicine, with proven action against a wide range of microbial infections (bacterial, fungal and viral). In this study, IgY was successfully administered to a patient with MRSA-overloaded neoplasm, being incorporated into therapeutic products for general administration and local applications.

Introducere

Imunoglobulinele Y (IgY) reprezintă o alternativă la imunoglobulinele mamifere; acestea sunt aplicate cu succes în scop științific, de diagnostic, profilactic și terapeutic. Întrucât tehnologia bazată pe anticorpi mamiferi prezintă o serie de dezavantaje

(purificarea anticorpilor din serul mamifer este scăzută, laborioasă și costisitoare, stres crescut pentru animalele implicate), aceasta a fost tot mai mult înlocuită cu tehnologia bazată pe IgY.

Un avantaj major al utilizării păsărilor este faptul că imunoglobulinele aviare se recoltează direct din gălbenușul de ou în loc de ser,

evitând astfel recoltarea de sânge. Astăzi, găinile sunt recunoscute ca sursă convenabilă și ieftină de anticorpi. S-a raportat că dintr-un ou hiperimun se obține o cantitate de imunoglobulină similară cu cea care poate fi obținută din 300 ml de sânge de iepure (Michael și col., 2010).

Utilizată ca alternativă la terapia cu antibiotice, IgY nu induce rezistență antimicrobiană și nu prezintă remanență la nivelul organismului tratat (Chiurciu și col., 2017). Pe mapamond, carcinomul scuamos localizat la nivelul capului și gâtului reprezintă a 8-a cea mai frecventă malignitate, fiind raportate aproximativ 500.000 de cazuri noi în fiecare an. Aceste tumori prezintă aspecte clinice variate, managementul lor implicând intervenție chirurgicală, radioterapie sau chimioterapie, individuale sau în combinație (Li și col., 2003).

Staphylococcus aureus se localizează în mod frecvent la nivel cutanat și intranasal (Guimarães și col., 2009).

Oamenii și animalele reprezintă un rezervor natural pentru stafilococi, inclusiv *Staphylococcus aureus*.

Astfel, colonizarea asimptomatică este mult mai frecventă decât infecția. Transmiterea stafilococilor are loc prin contact direct cu purtătorul, iar colonizarea poate fi tranzitorie sau persistentă (Chambers, 2001).

Staphylococcus aureus cuprinde o paletă largă de tulpini cu patogenitate variabilă (Tobias și col., 2012).

Stafilococii sunt în mod firesc sensibili la majoritatea antibioticelor (Guimarães și col., 2009), însă, utilizarea excesivă a antimicrobienei a dus la dezvoltarea de

tulpini multi-drog rezistente.

Atunci când se raportează infecții cu *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent (MRSA), o investigație aprofundată dezvăluie de cele mai multe ori o spitalizare recentă, contactul cu o persoană care a fost spitalizată sau o terapie recentă cu antimicrobiene (Chambers, 2001).

Astfel, MRSA s-a răspândit masiv în întreaga lume, devenind unul dintre principalii agenți patogeni cauzatori de infecții nosocomiale. Întrucât creează probleme importante în domeniul medical, dar și în cadrul comunităților fără legătură aparentă cu spitalizarea, diagnosticul său cât mai rapid și aplicarea unei terapii eficiente au devenit obiective prioritare pentru combaterea sa (Yamada și col., 2013; Klevens și col., 2007).

Întrucât antibioticele au un spectru de acțiune tot mai redus, se studiază abordarea unor variante alternative. Imunizarea pasivă a pacienților suferinzi de infecții cu MRSA utilizând imunoglobuline aviare (IgY) cu specificitate față de acest patogen pare a fi o opțiune tot mai abordabilă în viitorul apropiat.

În cadrul **Departamentului de Cercetare-Dezvoltare Imunoinstant al Companiei Romvac S.A.** se obțin imunoglobuline aviare cu specificitate pentru numeroși agenți infecțioși, respectiv bacterieni, micotici și virali, cu patogenitate atât pentru om, cât și pentru diverse specii animale (Chiurciu și col., 2017; Topilescu și col., 2014).

În studiul de față, utilizând oul hiperimun și produse derivate din acesta, s-a elaborat un protocol pentru terapia complementară a unui pacient cu carcinom scuamos infectat cu MRSA.

1. Materiale și metode

Oul hiperimun și produsele derivate din acesta

Toate procedurile aplicate în cadrul Departamentului sunt conforme cu Directiva UE 2010/63 privind manipularea animalelor utilizate în scopuri științifice.

Toate studiile efectuate sunt aprobate în prealabil de către Comitetul de Etică al Companiei Romvac S.A.

În cadrul Departamentului de Cercetare-Dezvoltare Imunoinstant al Companiei Romvac S.A., se obțin ouă hiperimune și produse derivate din acesta, utilizate la pacienți umani, cât și din spectrul medicinei veterinare.

Produsele adresate pacienților umani sunt atât pentru administrare pe cale generală (notificate ca suplimente alimentare), cât și pentru aplicații topice (notificate ca produse dermato-cosmetice).

Pentru obținerea oului hiperimun sunt utilizate găini oăutoare (*Gallus domesticus*), clinic sănătoase, din rasa Rhode Island, în vârstă de 18-19 săptămâni și greutate corporală de aproximativ 2,6 kg.

Păsările sunt cazate în sistem de creștere în baterii, în hale cu factori de microclimat controlați. Păsările sunt hrănite cu o dietă standardizată, ecologică, pe principiul *ad libitum*.

Antigenele utilizate

Pentru imunizarea găinilor ouătoare se utilizează un inocul preparat din 18 tulpini patogene, bacteriene și micotice: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella spp.*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus grup B*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile-corpi bacterieni*, *Clostridium difficile-anatoxina*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*.

Imunizarea găinilor și colectarea ouălor

După prepararea inoculului, acesta se administrează intramuscular găinilor ouătoare conform unei scheme de imunizare: trei inoculări cu câte 0.5 ml antigen în două puncte separate în musculatura pieptului.

Colectarea ouălor se efectuează începând cu a 14-a zi de la cea de-a treia imunizare, când titrul anticorpilor din gălbenuș atinge un nivel maxim, iar concentrația acestora se încadrează între 100-250 mg IgY / ou.

Ouăle colectate se păstrează la 2-8 °C.

Elaborarea de produse pe bază de imunoglobuline Y polispecifice

Din ouăle hiperimune se prepară o gamă largă de produse de uz uman, care cuprinde soluții buvabile poli- și monovalente, pulberi liofilizate, spray-uri, soluții pentru aerosoli, comprimate, geluri, creme, suspensii, șampoane. Alte categorii de produse sunt în curs de cercetare.

Testarea calitativă și cantitativă a imunoglobulinelor Y din ouă și produsele derivate

Ouăle hiperimune recoltate se testează pentru specificitatea imunoglobulinelor conținute față de antigenele inoculate, prin

testul ELISA *in house*, metodă indirectă.

Pentru produsele derivate, se testează concentrația totală de imunoglobuline Y prin testul ELISA *in house*, metodă directă.

Controlul microbiologic urmărește sterilitatea pentru soluția buvabilă cu IgY, respectiv contaminarea microbiologică pentru pulberea liofilizată, spray și cremă, conform normelor Farmacopeei Române, ediția a X-a.

Pacientul inclus în studiu

Pacientul M.B., în vârstă de 39 ani, sex masculin, suferă de carcinom scuamos pelvilingual drept, primele semne clinice fiind observate în ianuarie 2018.

Anterior consultului în cadrul Cabinetului de Medicină Complementară Imunoinstant, acesta a fost internat de două ori.

În cadrul primei internări, survenită la scurt timp după observarea neoplasmului de către pacient, acesta a suferit o intervenție chirurgicală la nivelul respectiv, radioterapie și chimioterapie.

În mai 2018, pacientul a fost reinternat acuzând disfație la solide, apariția unei formațiuni tumorale retroauriculare drepte ulcerate, supurate și a unei formațiuni tumorale cervicale anterioare, ambele vechi de aproximativ 1 lună și cu agravare progresivă.

Consultul clinic a relevat cicatrici latero-cervicale bilaterale postoperatorii, o formațiune tumorală retroauriculară dreaptă supurată, ulcerată, extinsă latero-cervical și parotidian drept (Figura 1), o formațiune tumorală cervicală anterioară cu zone de supurație, de consistență semidură, fixată la planurile profunde, dureroasă spontan și la palpare, cu fenomene inflamatorii supraadăugate, status

post pelviglosectomie dreaptă, vestibul nazal liber, fose nazale libere, cavum liber, coroană laringiană de aspect normal, corzi vocale mobile și spațiu glotic suficient.



Fig. 1. Formațiune tumorală retroauriculară dreaptă supurată, ulcerată, extinsă latero-cervical și parotidian drept

Ce-a de-a doua internare s-a desfășurat pe parcursul a 5 luni.

În septembrie 2018, a fost efectuat un examen radiologic la nivel pulmonar, concluziile acestuia fiind: fără imagini nodulare sugestive pentru determinări secundare pulmonare vizibile radiografic, cord cu dimensiuni în limite normale.

Analizele de laborator efectuate în aceeași lună au relevat următoarele modificări patologice:

- HCT ↓ (34.1%);
- HGB ↓ (11.2 g/dl);
- RBC ↓ ($3.97 \times 10^6/\mu\text{l}$);
- Neutrofile ↑ ($8.31 \times 10^3/\mu\text{l}$);
- Limfocite ↓ ($1.14 \times 10^3/\mu\text{l}$);
- PLT ↑ ($446 \times 10^3/\mu\text{l}$);
- VSH ↑ (111 mm/oră);
- Fibrinogen ↑ (750 mg/dl);
- Sodiu ↑ (146.4 mmol/l).

În septembrie 2018, pacientul a suferit

următoarele proceduri medicale:

- Incizie și drenaj formațiune tumorală cervicală anterioară;
- Traheotomie;
- Ancorare trahee la piele;
- Montare canulă cu balonaș.

S-a efectuat un examen bacteriologic din tumora ulcerată, în urma căruia s-a identificat infecția cu *Staphylococcus aureus*.

Evoluția postoperatorie este favorabilă sub tratament și se decide externarea pacientului în luna septembrie 2018, cu următoarele recomandări:

- Regim igienico-dietetic, respectiv schimbarea canulei o dată/zi, schimbarea și spălarea mandrenului de 5x/zi;
- Continuarea tratamentului oncologic.

Terapia cu imunoglobuline aviare

În octombrie 2018, pacientul este consultat în cadrul Cabinetului de Medicină Complementară Imunoinstant.

La momentul respectiv, tumora retroauriculară dreaptă ulcerată supura și nu prezenta tendință de vindecare, în ciuda terapiei cu antibiotice prescrisă la data externării.

Se recoltează probe din secreția purulentă, în vederea identificării agenților patogeni care împiedică vindecarea leziunii.

Este identificat *Staphylococcus aureus* meticilino-rezistent (MRSA).

În continuare, se efectuează testări ELISA în vederea stabilirii specificității imunoglobulinelor conținute de produsele derivate din oul hiperimun față de tulpina

bacteriană identificată (Figura 2).

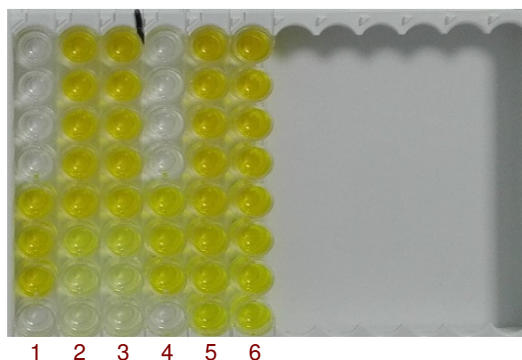


Fig. 2. Testarea specificității imunoglobulinei Y conținute de către pulberea liofilizată (stripurile 1-3) și soluția buvabilă sterilă (stripurile 4-6) administrate la pacient, față de stafilococul identificat în plagă

Medicul terapeut stabilește următorul protocol terapeutic:

Pentru administrare orală:

- Pulbere liofilizată obținută din ou hiperimun integral, cu un conținut de 100 mg IgY / doză, 2 doze / zi, administrate dimineața, după micul-dejun, timp de 4 luni. După ingerarea produsului, pacientul nu mai consumă nimic timp de 2 ore.
- IgY purificat, extract apos, 80 mL soluție sterilă cu un conținut total de 150 mg IgY, un flacon administrat seara, înainte de culcare, timp de 4 luni. După ingerarea soluției buvabile, pacientul nu consumă nimic până dimineața.
- Local: spray cu IgY purificat, extract apos, steril; pulverizări de 3 ori/zi, timp de 4 luni. Se aplică după toaleta locală. Zona nu se șterge (se așteaptă uscarea).
- După aplicarea spray-ului, se aplică o cremă pe bază de membrană cochilieră obținută din ou hiperimun, cu rol cicatrizant.

2. Rezultate și discuții

Pacientul a respectat întocmai protocolul

terapeutic stabilit de către medic.

Acesta nu a semnalat efecte adverse în urma administrării produselor pe bază de imunoglobuline aviare.

Terapia cu IgY a fost complementară tratamentului oncologic, nu a interferat cu acesta, ci, dimpotrivă, a constituit un suport imunitar. Pacientul a resimțit ameliorarea efectelor secundare tratamentului oncologic.

În februarie 2019, plaga este complet vindecată (Figura 3).



Fig. 3. Pacientul vindecat clinic după 4 luni de terapie complementară cu imunoglobulină aviară (ianuarie 2019)

Pacientul efectuează o examinare computer-tomografică (CT), în urma căreia sunt identificate următoarele aspecte: regresie dimensională certă a maselor tumorale cervicale, cu menținerea unor leziuni nodulare supratrahostomă dreaptă, respectiv cu aspect infiltrativ supraclavicular drept; mici adenopatii cervicale bilaterale și mediastinale cu aspect global stabil dimensional și numeric comparativ cu examinările precedente; fără determinări secundare nodulare pulmonare bilaterale certe decelabile CT; în rest, examinarea CT nu a

prezentat particularități notabile.

Pacientul repetă analizele microbiologice.

Se recoltează cruste din aria cutanată unde anterior a fost localizată tumora ulcerată. Rezultatul este negativ pentru floră microbiană patogenă.

3. Concluzii

Terapia cu imunoglobuline aviare (IgY) reprezintă o alternativă eficientă și sigură a tratamentului clasic cu substanțe antimicrobiene de sinteză, mai ales în cazul tulpinilor rezistente la moleculele deja consacrate, precum și în cazul pacienților cu diverse afecțiuni (neoplasm, leziuni extinse post-traumatice, insuficiență de organ, alte boli cronice) complicate de infecții bacteriene și/sau micotice.

Terapia cu IgY nu prezintă efecte adverse, însă are o singură contraindicație, aceea că nu se administrează pacienților cu alergii cunoscute la ou.

În cazul de față, imunoglobulinele aviare au constituit suport imunitar, ameliorând efectele adverse cauzate de tratamentul oncologic.

În plus, infecția cu MRSA a fost vindecată, fapt confirmat de analizele microbiologice efectuate după încheierea terapiei.

Bibliografie

1. **CHAMBERS, H.F. (2001).** The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. Emerging Infectious Diseases, 7(2), 178-182.
2. **CHIURCIU, C., TABLICĂ M., SIMA L., SUPEANU T., OPORANU M. (2017).** Time Evolution of Immunoglobulin Y (IgY) Titer in

- the Egg Yolk Harvested from Hens after Three Inoculations with Multiple Antigens. *Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine*, **LXIII** (2), 38-44.
3. **CHIURCIU, C., CHIURCIU, V., OPORANU, M., PĂTRAȘCU, I.V., MIHAI, I., TABLICĂ, M., CRISTINA, R.T. (2017).** PC2 Ovotransferrin: Characterization and Alternative Immunotherapeutic Activity. *Ev-Based Complement Alternat Med*. Volume 2017, Article ID 8671271, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/8671271>
 4. **TOPILESCU, G., CHIURCIU, V., PATRASCU, I.V. CHIURCIU, C., CRISTINA, R.T. (2014).** Growth Inhibition of antibiotic resistant bacteria by neutralizing IgY antibodies, *J. Biotechnol.*, vol. 185, Suppl., pp. S91–S92.
 5. **GUIMARÃES, M.C.C., GOMES AMARAL, LÍVIA, BATISTA AZEVEDO L., RANGEL, SILVA, I.V., GOMES, MATTA, C., DE REZENDE, F., MATTA, M.F. (2009).** Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **57**, 377–382.
 6. **MONINA KLEVENS R., MORRISON M. A., NADLE, J, PETIT, S., GERSHMAN, K., RAY, S., HARRISON, L.H., LYNFIELD, R., DUMYATI, G., TOWNES, J.M., CRAIG, A.S., ZELL, E.R., FOSHEIM, G.E., MCDUGAL, L.K., CAREY, R.B. FRIDKIN, S.K. (2007).** Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *The Journal of the American Medical Association*, **298** (15), 1763-1771.
 7. **LI, W, THOMPSON, C.H., O'BRIEN, C.J., MCNEIL E.B., SCOLYER, R.A., COSSART, Y.E., VENESS, M.J., WALKER, D.M., MORGAN G.J., ROSE. B.R. (2003).** Human Papillomavirus Positivity Predicts Favourable Outcome for Squamous Carcinoma of the Tonsil. *International Journal of Cancer*, **106**, 553–558.
 8. **MEENATCHISUNDARAM, M.A., PARAMESWARI, S., SUBBRAJ, G., SELVAKUMARAN, T., RAMALINGAM, R. (2010).** Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies, *Indian Journal of Science and Technology*, **3**(4), 468-474.
 9. **TOBIAS, F.L., NUNES GARCIA, L.N., KANASHIRO, M.M., MEDINA-ACOSTA, E., BROM-DE-LUNA, J.G., COSTA DE ALMEIDA, C.M., AZEVEDO JUNIOR, R.R., LEMOS, M., VIEIRA-DA-MOTTA, O. (2012).** Growth Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains by Neutralizing IgY Antibodies from Ostrich Egg Yolk. *Brazilian Journal of Microbiology*, **43**, 544-551.
 10. **YAMADA, K., WANCHUN, J., OHKURA, T., MURAI, A., HAYAKAWA, R., KINOSHITA, K., MIZUTANI, M., OKAMOTO, A., NAMIKAWA, T., OHTA, M. (2013).** Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using a Specific Anti-PBP2a Chicken IgY Antibody. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **66**, 103-108.