

EVALUAREA RĂSPUNSULUI IMUN AL GĂINILOR IMUNIZATE CU UN COMPLEX DE ANTIGENE PRIN TESTAREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A IMUNOGLOBULINELOR Y OBȚINUTE DIN OUĂ HIPERIMUNE PROVENITE DE LA ACESTEA

IMMUNE ANALYSIS ASSESMENT OF IMUNIZED HENS WITH A COMPLEX OF ANTIGENES BY QUALITATIVE AND QUANTITATIVE TESTING OF IMMUNOGLOBULINES OBTAINED FROM THEIR HIPERIMUNE EGGS

Mariana Oporanu¹, Mădălina Tablică¹, Teodora Supeanu¹, 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, răspuns imun, titru, inoculare, antigen multiplu, test ELISA
Key words: Immunoglobulin Y, immune response, hyper immune eggs, titer, inoculation, multiple antigens, ELISA tests

Rezumat

Imunoglobulinele Y (IgY) reprezintă principalul anticorp sintetizat de către organismul păsărilor, reptilelor, amfibienilor și unor specii de pești. În ultimele decenii, IgY se bucură de o atenție tot mai mare din partea specialiștilor din domeniul medical. Acesta prezintă o serie de diferențe structurale față de IgG de la mamifere și multiple beneficii comparativ cu anticorpii mamiferi. IgY prezintă aplicabilitate în diagnosticul, prevenția și terapia unor afecțiuni de natură infecțioasă date de bacterii, fungi sau virusuri patogene. Studiul de față a avut ca scop evaluarea titrului de anticorpi specifici față de 18 antigene pe o perioadă de 13 luni. Pe întreaga perioadă a experimentului s-au efectuat testări de tip ELISA pentru determinarea concentrației imunoglobulinelor totale din ouăle hiperimune obținute și a specificității IgY-ului extras față de fiecare antigen în parte.

Abstract

Immunoglobulins Y (IgY) are the main antibody synthesized by the body of birds, reptiles, amphibians and some fish species. In the last decades, IgY has been receiving a growing attention from medical specialists. It presents a number of structural differences from mammalian IgG and multiple benefits compared to mammalian antibodies. IgY can be applicable in the diagnosis, prevention and therapy of infectious diseases of pathogenic bacteria, fungi or viruses. This study aimed to evaluate the specific antibody titre against 18 antigens for a period of 13 months. Throughout the experiment, ELISA assays were performed to determine the total immunoglobulin concentration in the obtained hyperimmune eggs and the specificity of the extracted IgG to each antigen.

Introducere

Imunoglobulina Y (IgY) este principalul anticorp sintetizat de către găina ouătoare (*Gallus domesticus*). Este sintetizată în mod continuu, secretată în sânge și transferată în gălbenușul de ou, unde se acumulează

(Young, 2007).

IgY reprezintă strămoșul evolutiv al IgG sintetizat de către mamifere și reprezintă principalul mecanism de apărare împotriva infecțiilor sistemice (de Paula, 2011).

Spre deosebire de nou-născuții de la mamifere, care după naștere beneficiază de

anticorpilor materni din colostru, la găini, toate imunoglobulinele materne care trebuie să protejeze puii nou-eclozați sunt încorporate în ou în timpul ovogenezei. Transferul IgY de la găină la pui se desfășoară în două etape; inițial se transferă IgY din sângele găinii în foliculul ovarian (gălbenușul de ou) și apoi către embrion (Hamal, 2006).

Producția de IgY este o alternativă non-invazivă a metodelor curente și prezintă următoarele avantaje: întreținerea găinilor este accesibilă, animalele sunt ușor de manevrat, obținerea anticorpilor nu necesită sângerări repetate și nu cauzează durere animalelor în cauză. În plus, titrul IgY din gălbenușul ouălor provenite de la găini imunizate rămâne ridicat o lungă perioadă de timp (Carlander D., 2000).

Într-un singur gălbenuș de ou se regăsește o cantitate mai mare de anticorpi comparativ cu media izolată din sângele iepurilor imunizați (Tini, 2002; Kovacs-Nolan, 2005).

Un avantaj suplimentar a utilizării IgY include obținerea unei reacții imunitare mai eficiente față de antigenele de mamifere datorită distanței filogenetice dintre găini și mamifere (Schade și col., 2005).

Pentru a obține anticorpi IgY cu specificitate față de un antigen de interes, găinile ouătoare sunt inoculate cu antigenul respectiv; apoi, anticorpilor sunt purificați din ouăle recoltate. Această metodă non-invazivă de obținere de anticorpi reprezintă unul dintre avantajele utilizării IgY în imunodiagnostic (Kovacs-Nolan, 2012, Chiurciu și col., 2017; Topilescu și col., 2014).

Gălbenușul de ou conține 8–10 mg IgY/mL și dintr-un singur ou se pot extrage

aproximativ 100-200 mg de IgY total, din care 2-10% este antigen-specific (Davison, 2008).

Anticorpi aviați cu specificitate au fost sintetizați cu succes împotriva unei largi varietăți de antigene, precum proteine, peptide, hormoni lipidici, virusuri, bacterii, fungi (Hamal, 2006; Spillner E., 2012; Chiurciu și col., 2017; Topilescu și col., 2014).

1. Material și metodă

Animalele incluse în studiu

Studiul a fost realizat în cadrul Departamentului de Cercetare-Dezvoltare Imunoinstant al Companiei Romvac S.A.

Toate procedurile au fost efectuate conform cu Directiva 63/2010 a UE referitoare la manipularea animalelor utilizate în scop științific. Studiul a fost aprobat de Comitetul etic al Romvac Company S.A.

Pentru obținerea de imunoglobuline Y specifice, au fost incluse în studiu găini ouătoare (*Gallus domesticus*), clinic sănătoase, în vârstă de 19 săptămâni, cu greutatea corporală de 2,5 kg.

Acestea au fost găzduite în sistem de creștere în baterii, în hale cu parametrii de temperatură, umiditate, luminozitate și zgomot controlați. Păsările au fost hrănite cu dietă standard, *ad libitum*.

Antigenele utilizate în prepararea inoculului

Tulpinile microbiene utilizate în studiu au fost achiziționate fie de la laboratoarele microbiologice ale spitalelor cu care Departamentul colaborează, fie izolate de la pacienții umani tratați în cadrul Cabinetului de

Medicină Complementară Imunoinstant.

S-a preparat un inocul multiplu pe baza următoarelor 18 tulpini bacteriene și micotice: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus Grup B*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile-corpi bacterieni*, *Clostridium difficile-anatoxina*, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*.

Inocularea păsărilor

Găinile au fost inoculate de 3 ori, intramuscular, în 2 puncte diferite la nivelul musculaturii pieptului (0,5 ml în fiecare punct). Inoculările de rapel s-au efectuat la 14 zile, respectiv 28 de zile de la inocularea inițială.

Colectarea ouălor hiperimune a fost realizată zilnic, începând cu a 14-a zi de la ultima inoculare. Acestea s-au depozitat la 2-8°C. Pentru testări comparative au fost utilizate găini SPF în vârstă de 20 de săptămâni, găzduite în izolatoare, în hale proprii.

Extracția IgY

Pentru extracția imunoglobulinei Y a fost aplicată o procedură fizico-chimică. S-a separat gălbenușul de albuș, s-a prelevat câte 1 ml gălbenuș care a fost apoi diluat cu apă MilliQ, în diluție de 1:8.

Amestecul a fost omogenizat, iar apoi a fost ajustat pH-ul la 4,5-5. Probele au fost incubate timp de 24 h la temperatura de -20°C.

După decongelare, probele au fost centrifugate la 10500 rpm și 4°C, timp de 20 de

minute. Au fost extrase probe din supernatant care au fost filtrate prin filtre de 0,45 μm. Până la testare probele au fost păstrate la 2-8°C.

Testarea calitativă și cantitativă a imunoglobulinelor Y

Au fost efectuate teste ELISA, metodele calitativă și cantitativă, pentru identificarea și cuantificarea imunoglobulinelor Y din ouăle hiperimune.

Testările s-au făcut la interval de 30 de zile, pe o perioadă de 13 luni, începând cu a 14-a zi de la ultima inoculare.

Determinarea calitativă a imunoglobulinelor Y conținute de către ouăle hiperimune față de antigenele inoculate a fost efectuată prin testul ELISA indirectă, metodă elaborate *in house*.

Determinarea cantitativă a conținutului global de imunoglobuline Y a fost realizată prin testul ELISA directă, metodă elaborate *in house*.

2. Rezultate și discuții

Testarea concentrației în IgY total prin metoda ELISA directă

Pentru probele cu IgY extrasă din ouăle hiperimune, au fost obținute valori ale densităților optice (DO₄₅₀), care au variat între 2.000 și 3.000.

Aceste valori au fost utilizate pentru calculul concentrației în imunoglobuline totale utilizând o ecuație a dreptei (Figura 1), obținută pe baza unui IgY standard.

S-au obținut concentrații variind între 250 și 400 mg IgY total/ou hiperimun.

În mod comparativ, au fost efectuate determinări ale concentrației în IgY și pentru

ouă SPF pentru care s-au obținut valori de 100-150 mg IgY/ou.

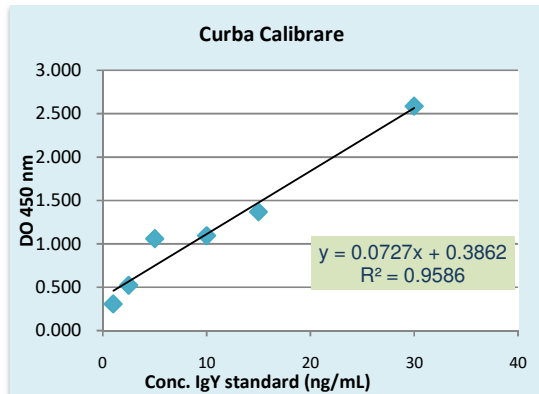


Fig. 1. Curbă de calibrare efectuată utilizând IgY standard pentru calculul concentrației de IgY din ouăle hiperimune

Testarea specificității imunoglobulinelor din ouăle hiperimune prin metoda ELISA indirectă

Rezultatele obținute prin testul ELISA au permis confirmarea prezenței imunoglobulinelor specific în ouăle hiperimune recoltate pe parcursul celor 13 luni de experiment. Ouăle hiperimune recoltate au prezentat un conținut în imunoglobuline cu specificitate față de toate cele 18 antigene utilizate în prepararea inoculului.

În **Figura 2** se evidențiază faptul că IgY prezintă specificitate pentru 4 dintre antigenele utilizate la imunizarea găinilor:

- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Escherichia coli*.

Titul anticorpilor specifici este ridicat pentru fiecare antigen în parte, evidențiind astfel faptul că sistemul imunitar al găinilor inoculate a răspuns față de toți stimuli antigenici inoculați.

Pentru confirmarea rezultatelor s-a folosit

ca martor negativ de reactive IgY izolat din ouă provenind de la găini SPF.

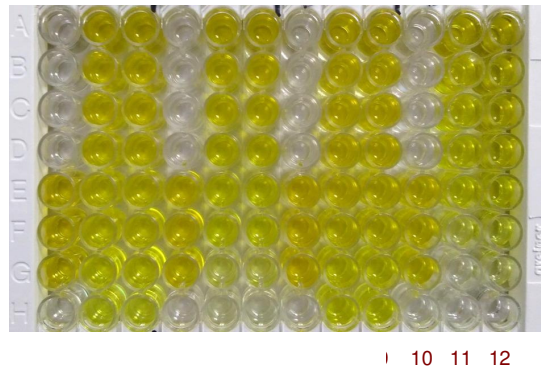


Fig. 2. Test ELISA calitativ pentru stabilirea specificității anticorpilor față de 4 antigene componente ale inoculului multiplu (*Pseudomonas aeruginosa* – stripurile 1-3, *Staphylococcus aureus* – stripurile 4-6, *Klebsiella pneumoniae* – stripurile 7-9, *Escherichia coli* – stripurile 10-12)

Pentru determinarea specificității anticorpilor IgY au fost efectuate diluții pornind de la 1:100 la 1:64000 care au fost repartizate în plăci ELISA căptușite cu antigene specifice (**Figura 2**).

Rezultatele obținute pe parcursul celor 13 luni de testare sunt evidențiate în **Figurie 3-6**. În primele 8 luni de testare se constată variații mari ale valorilor obținute pentru toate cele 4 antigene.

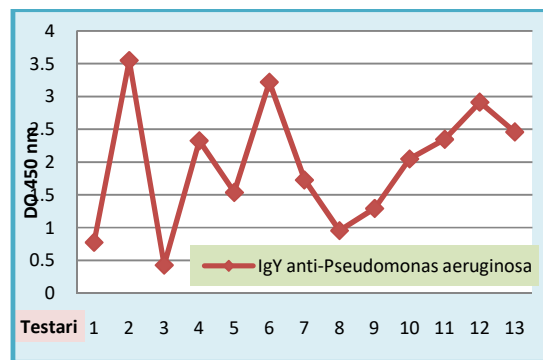


Fig. 3. Variația valorilor citite spectrofotometric la DO_{450nm} pentru titrul de 1:1000; valorile au fost obținute prin testarea ELISA indirectă a specificității IgY extrasă din ouăle hiperimune față de tulpina *Pseudomonas aeruginosa* introdusă în inoculul multiplu

În urma înregistrărilor DO_{450nm} obținute

prin testarea specifică a anticorpilor IgY anti-*Pseudomonas aeruginosa* se constată că valorile acestora cresc aproape constant în ultimele 5 luni de testare, cu o ușoară scădere în ultima lună. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 3.

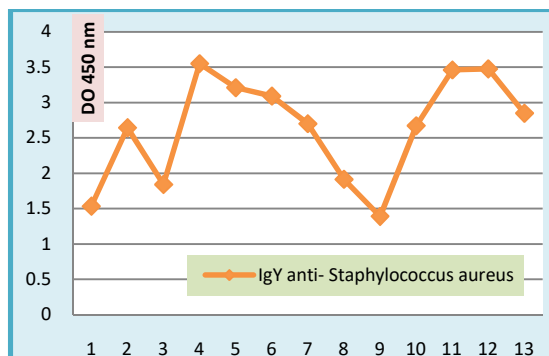


Fig. 4. Variația valorilor citite spectrofotometric la DO_{450nm} pentru titrul de 1:1000; valorile au fost obținute prin testarea ELISA indirectă a specificității IgY extrasă din ouăle hiperimune față de tulpina *Staphylococcus aureus* introdusă în inoculul multiplu

În Figura 4 sunt prezentate valorile obținute în urma testării specificității IgY extras din ouăle recoltate față de antigenul *Staphylococcus aureus*. În ultimele 4 luni de testare se remarcă o creștere a valorilor cu ușoară scădere în ce-a de-a 13-a lună.

Pe întreaga perioadă de testare valorile numerice înregistrate sunt mai mari de 1.000.

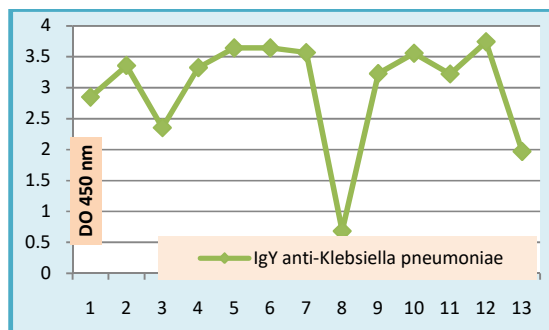


Fig. 5. Variația valorilor citite spectrofotometric la DO_{450nm} pentru titrul de 1:1000; valorile au fost obținute prin testarea ELISA indirectă a specificității IgY extrasă din ouăle hiperimune față de tulpina *Klebsiella pneumoniae* introdusă în inoculul multiplu

În Figura 5 sunt prezentate valorile obținute în urma testării specificității IgY extras din ouăle recoltate față de antigenul *Klebsiella pneumoniae*.

Evoluția acestora este asemănătoare cu cea în cazul testărilor față de antigenul *Staphylococcus aureus*.

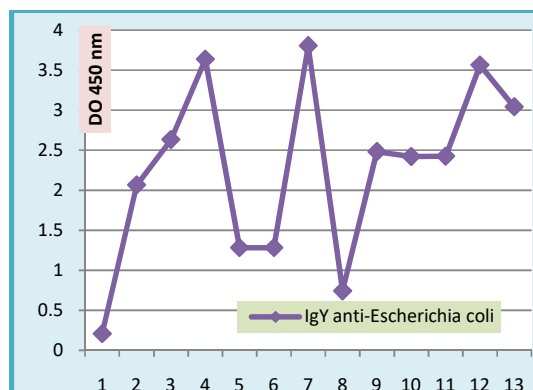


Fig. 6. Variația valorilor citite spectrofotometric la DO_{450nm} pentru titrul de 1:1000; valorile au fost obținute prin testarea ELISA indirectă a specificității IgY extrasă din ouăle hiperimune față de tulpina *Escherichia coli* introdusă în inoculul multiplu

În Figura 6 sunt prezentate valorile obținute în urma testării specificității IgY extras din ouăle recoltate față de antigenul *Escherichia coli*.

Pentru ultimele 5 luni de testare, evoluția este asemănătoare cu cea în cazul testărilor față de antigenul *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Concluzii

- Studiul a permis obținerea de anticorpi specifici (IgY) din gălbenuș de ou hiperimun față de toate cele 18 antigene bacteriene și fungice utilizate la imunizarea găinilor: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Salmonella enteritidis*,

Salmonella typhimurium, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus grup B*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile* – corpi bacterieni, *Clostridium difficile* - anatoxina, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*.

- Testările efectuate prin metoda ELISA au demonstrat specificitatea anticorpilor IgY față de antigenele utilizate la imunizarea găinilor.
- În urma determinărilor efectuate prin testul ELISA, se constată că titrul anticorpilor (IgY) se menține ridicat pe toată perioada experimentului.

Bibliografie

1. **CARLANDER, D., KOLLBERG, H., WEJÅKER, P., LARSSON, A. (2000).** Per oral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunology Research*, **21**, 1–6.
2. **DAVISON, F., MAGOR E.K., KASPERS B. (2008).** Structure and evolution of avian immunoglobulins. *Avian immunology. Amsterdam: Elsevier*, **6**, 107-127.
3. **de PAULA, V.S., da SILVA, ADOS, S., de VASCONCELOS, G.A., IFF, E.T., SILVA, M.E., KAPPEL, L.A., CRUZ, P.B., PINTO, M.A., (2011).** Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. *Journal of Virological Methods*, **171**, 102-106.
4. **HAMAL, K.R., BURGESS, S.C., PEVZNER, I.Y., ERF, G.F. (2006).** Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poultry Science*, **85**, 1364-1372.
5. **KOVACS-NOLAN JENNIFER, MINE, Y. (2012).** Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review of Food Science and Technology*, **3**, 163–182.
6. **KOVACS-NOLAN, J., PHILLIPS, M., MINE, Y. (2005).** Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 8421–31.
7. **SCHADE, R., CALZADO, E.G., SARMIENTO, R., CHACANA, P.A., PORANKIEWICZ-ASPLUND, J., TERZOLO, H.R. (2005).** Chicken egg yolk antibodies (IgY technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to Laboratory Animals*, **33**, 129–154.
8. **SPILLNER, E., BRAREN, I., GREUNKE, K., SEISMANN, H., BLANK, S., du PLESSIS, D. (2012).** Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals*, **40**:5, 313-322.
9. **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>
10. **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.
11. **TINI, M., JEWELL, U.R., CAMENISCH, G., CHILOV, D., GASSMANN, M. (2002).** Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, **131**, 569–74.
12. **YOUNG, CATHERINE A., SILVERSIDES, F.G., JONES, S.R.M. (2007).** Chicken-derived IgY recognizes developing and mature stages of *Loma salmonae* (*Microsporidia*) in Pacific salmon, *Oncorhynchus spp.*, *Aquaculture*, **273**, 398-404.