



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00411**

(22) Data de depozit: **16/07/2020**

(41) Data publicării cererii:
28/01/2022 BOPI nr. 1/2022

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ A BANATULUI
" REGELE MIHAI I AL ROMÂNIEI " DIN
TIMIȘOARA USAMVB, CALEA ARADULUI,
NR.119, TIMIȘOARA, TM, RO**

(72) Inventatori:
• **OTAVĂ GABRIEL DUMITRU, ORȘOVA,
NR.28, SC.A, ET.1, AP.4, TIMIȘOARA, TM,
RO;**

• **LO PRESTI DANIELE,
VIALE AMEDEO D'AOSTA 22, PALERMO,
IT;**
• **TULCAN CAMELIA,
STR.SAMUIL ȘAGOVICI, NR.82,
TIMIȘOARA, TM, RO;**
• **MIRCU CĂLIN, STR.PRAGA, NR.37,
DUMBRĂVIȚA, TM, RO;**
• **HUȚU IOAN, STR.GH. LAZĂR, NR.34,
ET.VIII, AP.69, TIMIȘOARA, TM, RO;**
• **KUTTESCH ADRIAN,
STR.SIMION BĂRNUȚIU, NR.27, LUGOJ,
TIMIȘOARA, TM, RO**

(54) **METODĂ DE DETERMINARE INDIRECTĂ A MOMENTULUI
OVULAȚIEI LA CĂȚEA PRIN ANALIZAREA SALIVEI CU
AJUTORUL PROGRAMULUI PENTRU STUDIUL GEOMETRIEI
FRACTALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare indirectă a momentului ovulației la cățea prin analizarea salivei cu ajutorul programului pentru studiul geometriei fractale. Metoda, conform invenției, constă din următoarele etape: anamneză, examen citovaginal efectuat când scurgerile sangvinolente s-au diluat din punct de vedere cromatic și cantitativ, recoltarea probei de salivă, uscare la temperatura camerei a probei de salivă, examinare din punct de vedere matematic a unui frotiu cu material biologic, prelucrare imagini biologice, interpretarea cristalizării salivei și analiza valorilor și calcularea circularității fractalilor, iar valoarea circularității fractalilor va fi un număr cuprins între 0 și 1, pe parcursul debutului ciclicității sexuale această valoare avînd un nivel bazal, cu mici oscilații de la o determinare la alta, iar momentul ovulației valoarea circularității fractalilor crește semnificativ, de trei până la câteva zeci de ori.

Revendicări: 2
Figuri: 9

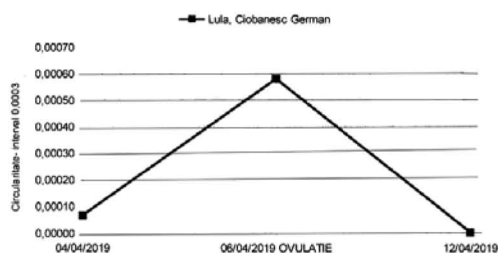


Fig. 7

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2020 00411
Data depozit 16-07-2020

23

**Metodă de determinare indirectă a momentului ovulației la cățea prin analiza
salivei cu ajutorul programului pentru studiul geometriei fractale**

Prezenta invenție se referă la o metodă de determinare indirectă a momentului ovulației la cățea, complet neinvazivă și expeditivă.

În baza acestei metode sau prin coroborarea acesteia cu alte metode neinvazive cum ar fi de exemplu studierea citologiei vaginale, se poate aprecia momentul optim pentru montă sau inseminare artificială la această specie.

După cum se știe, cățeaua este un animal monoestric sau poliestric nesezonier, în funcție de rasă și individ, având un ciclu reproductiv unic. Datorită faptului că ovulația are loc o dată sau de două ori pe an și datorită variabilității foarte mari între rase și indivizii aceleași rase, este foarte greu de stabilit o metodă foarte exactă de determinare a momentului ovulației.

Studierea citologiei vaginale nu reprezintă o metodă certă în vederea stabilirii momentului ovulației la cățea. La momentul de față, stabilirea momentului ovulației se face prin coroborarea a două metode de investigație paraclinică – determinarea nivelului de progesteron (P4) și studiul citologiei vaginale.

Citologia vaginală poate fi folosită, alături de explorarea vaginală și a altor metode subiective, pentru a determina stadiul ciclului estral, respectiv încadrarea acestora în faza luteală - metestru și anestru, sau foliculară - proestru și estru. Prin definiție, citologia vaginală este singura cale de a determina debutul proestrului, care trebuie determinat pentru a putea clasa cățelele în cadrul grupului de femele aflate la debutul fazei foliculare.

Interpretarea frotiului citovaginal prin prisma determinării momentului ovulației se face prin

1. Efectuarea de froțiuni repetate până în momentul în care acesta conține în totalitate celule superficiale cu sau fără nucleu.



2. Aprecierea momentului ovulației se face într-un mod subiectiv, cu ochiul liber, și anume când celulele superficiale fără nucleu reprezintă 75% din totalul celulelor (fig. 1).

Măsurarea concentrației serice a hormonului progesteron pe parcursul sfârșitului proestrului și începutului de estru permite detectarea momentului optim pentru montă sau înseminare artificială.

Nivelul seric al progesteronului începe să crească la sfârșitul proestrului, cu 2-3 zile înainte de ovulație. Această creștere a progesteronului se datorează luteinizării preovulatorii a foliculilor. La momentul peak-ului de LH nivelul progesteronului este de aproximativ 2ng/ ml. În momentul ovulației nivelul progesteronului variază între 4-10 ng ml (Fig. 1). După ovulație valoarea progesteronului seric crește atingând valori cuprinse între 15 - 90 ng ml la 15-30 zile de la peak-ul de LH. Acest interval mare se datorează, cel puțin în parte, numărului de foliculi respectiv corpi luteali prezenți la nivelul ovarelor. După acest nivel maxim, nivelul progesteronului începe să scadă gradual timp de 5-6 săptămâni până la atingerea nivelurilor bazale.

Recoltarea probelor de sânge în vederea determinării nivelului de P4 are anumite neajunsuri.

1. Astfel, punționarea venei cefalice creează disconfort sau stres femelelor
2. Punerea în pericol a integrității corporale a medicului prin riscul de a fi mușcat de către pacient
3. Dacă recoltarea de sânge nu se efectuează în condiții riguroase de antisepsie și asepsie există risc de infecție
4. Primirea rezultatelor este limitată de trimiterea probelor la laborator, punerea în lucru a acestora și de faptul că laboratoarele nu lucrează pe perioada de sfârșit de săptămână și a sărbătorilor legale
5. Costul destul de ridicat a fiecărei analize sanguine.

Din documentul **WO2008029130** este cunoscută o metodă de furnizare a informațiilor referitoare la fertilitatea unui mamifer feminin care cuprinde etapele următoare: prelevarea de temperaturi multiple de la mamiferul feminin în timpul unei



- perioade îndelungate; identificarea și ignorarea valorilor de temperatură care au una sau mai multe caracteristici ale datelor irelevante sau defecte; obținerea uneia sau a mai multor valori reprezentative ale temperaturii pentru perioada prelungită; repetarea primelor etape pe mai multe perioade prelungite; analizarea valorilor reprezentative ale temperaturii obținute pe mai multe perioade prelungite pentru unul sau mai multe modele în valorile reprezentative ale temperaturii indicative sau predictive ale ovulației, pentru a furniza informațiilor referitoare la fertilitatea mamiferului feminin unui utilizator, în care valorile reprezentative ale temperaturii nu sunt valorile maxime sau minime de temperatură obținute pentru perioada prelungită; și utilizări și aparate conexe.

Un alt document **WO2008019121** prezintă tehnicile manuale de monitorizare a ciclului ovulației animalelor, pentru a determina cel mai bun moment pentru a reproduce animale tehnici care utilizează căldura ca indicator pentru ovulație, dar care nu corespund întotdeauna ovulației, și unde monitorizarea și aprecierea momentului ovulației se realizează folosind un dispozitiv de mână automat, care încorporează un computer și o sondă pentru detectarea modificărilor fizice din fluidul corpului animal. Modificările nivelului de electroliți sunt detectate ca modificări ale rezistenței care corespund unor intervale specifice din ciclul de ovulație.

Documentul **WO9108484CE** prezintă o metodă pentru detectarea stării fertilității la o canină de sex feminin cuprinzând detectarea metaboliților de LH canin în urină, pe baza identificării anumitor peptide LH caracteristice și a unor proteine purtătoare care se găsesc în urina canină.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în monitorizarea și determinarea momentului indirect al ovulației la cățea, în scopul de a determina momentul optim pentru montă sau inseminare artificială.

Această problemă este realizată printr-o metodă de determinare a momentului optim al ovulației la cățea conform prezentei invenții, metodă care constă în:

- Preluarea anamnezei ce are ca scop identificarea fazei ciclului sexual al cățelei, ținând cont că debutul acestei metode indirecte de stabilire a momentului



ovulației la cătea trebuie începută înainte ovulației, la începutul fazei de estru sau încă din faza de proestru a ciclului sexual. Se va avea în vedere momentul debutului scurgerilor sanvinolente, semn al debutului fazei de proestru, iar testarea va începe la momentul diluării scurgerilor vaginale din punct de vedere cromatic și cantitativ, examinarea clinică a femeiei va urmări aceleași semne, aspectul scurgerilor vaginale să aibe o culoare roz- roșietică.

- Recoltarea probei de salivă se va face din regiunea sublinguală și a vestibulului bucal cu un bețișor cu vată, ce se va îmbiba în totalitate pentru a se evita formarea de bule de aer în momentul etalării.
- Etalarea salivei pe o lamă printr-o mișcare de rotație, comprimând vârful îmbibat pe sticlă și storcând cantitatea cea mai mare disponibilă.
- Uscarea probei de salivă la temperatura camerei, 22 °C, timp de 20 minute .
- Examinarea frotiului obținut, unde proba de salivă cristalizată se examinează cu ajutorul unui microscop prevăzut cu funcție captare imagine, vizualizarea imaginilor salivei se face cu ajutorul obiectivului x10. Se scanează frotiul pe o suprafață cât mai mare, în vederea obținerii de imagini cât mai clare, fără bule de aer, microparticule etc.. după care imaginea astfel obținută se va capta și transfera într-un calculator în vederea interpretării amprente electronice, având la bază un protocol de elaborare a imaginilor, utilizând un software (ImageJ) de analiză a imaginilor.
- Sunt efectuate ajustări tehnice aplicate imaginilor care au ca scop izolarea și punerea în evidență a desenului efectuat de cristalizarea salivei, sub forma unei frunze de ferigă sau a acelor de brad, și de a elimina eventualele erori.
- Se analizează automat valorile ariei și perimetrului tuturor formelor tip fractal cu aria mai mare de 25 de pixeli, furnizând o lista de date, valorile fiind afișate în mod crescător.
- se calculează circularitatea, un parametru adimensional dependent de aria și perimetrul, ce are valoarea maximă 1 pentru forma unui cerc și tinde spre zero cu cât forma este mai alungită, după formula:

$$f_{circular} = 4\pi A/P^2$$

unde $\pi = 3,14$,



A = aria medie

P = reprezintă suma perimetrelor

Avantajele aplicării metodei conform prezentei invenții constau în:

- metoda este neinvazivă;
- se elimină traumatizarea fizică a femelei;
- se detectează indirect, cu exactitate momentul ovulației la cățea.

În cele ce urmează este prezentat un exemplu de realizare a invenției în legătură și cu figurile 1 - 10 și tabelele 1- 6, în care :

Fig. 1 – Grafic reprezentând aprecierea momentului ovulației la cățea cu ajutorul frotiului citovaginal și determinării nivelului de progesteron (după England)

Fig. 2 - Imagine înainte de procesare

Fig. 3- Imagine după aplicarea protocolului

Fig. 4 Reprezentarea valorii de circularitate obținută în diferite zile ale ciclului sexual (Esme - Golden Retriever)

Tabel 1 - Reprezentarea valorilor de circularitate și progesteron seric în diferite zile și faze ale ciclului sexual (Esme - Golden Retriever);

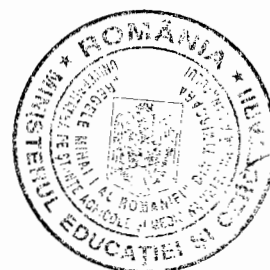
Fig 5 -Reprezentarea valorii de circularitate obținută în diferite zile ale ciclului sexual (Aida - Golden Retriever);

Tabel 2- Reprezentarea valorilor de circularitate și progesteron seric în diferite zile și faze ale ciclului sexual (Aida - Golden Retriever)

Fig.6 - Reprezentarea valorii de circularitate obținută în diferite zile ale ciclului sexual (Angel – Golden Retriever)

Tabel 3- Reprezentarea valorilor de circularitate și progesteron seric în diferite zile și faze ale ciclului sexual (Angel - Golden Retriever)

Fig 7 - Repreentarea valorii de circularitate obținută în diferite zile ale ciclului sexual (Lula - Ciobanesc German)



Tabel 4- Reprezentarea valorilor de circularitate și progesteron seric în diferite zile și faze ale ciclului sexual (Lula - Ciobanesc German)

Fig 8 - Reprezentarea valorii de circularitate obținută în diferite zile ale ciclului sexual (Sofi - Ciobanesc German)

Tabel 5- Reprezentarea valorilor de circularitate și progesteron seric în diferite zile și faze ale ciclului sexual (Sofi - Ciobanesc German)

Fig 9 - Reprezentarea valorii de circularitate obținută în diferite zile ale ciclului sexual (Asi - Ciobănesc German)

Tabel 6- Reprezentarea valorilor de circularitate și progesteron seric în diferite zile și faze ale ciclului sexual (Asi - Ciobanesc German)

Metoda de determinare a momentului indirect al ovulației la cățea, conform invenției este mai puțin invazivă și expeditivă și are ca scop determinarea momentului optim pentru montă sau inseminare artificială a cățelelor.

Saliva este un lichid transparent cu vâscozitate variabilă, care este atribuită acidului sialic. Este inodor ca apa. Compoziția și pH-ul salivei variază în funcție de stimuli cum ar fi mirosul sau viziunea alimentelor. Valoarea normală a pH-ului salivar variază între 6,5 și 7.

Compoziția salivei este similară cu cea a plasmei și se caracterizează prin următoarele componente:

- Apă: reprezintă 99,5%. Permite alimentelor să se dizolve și gustul poate fi perceput;
- Bicarbonat și fosfat: neutralizează pH-ul alimentelor acide și corodarea bacteriană;



17

- Mucus: conține mucină, o glicoproteină fundamentală a salivei, care conferă vâscozitatea necesară pentru funcțiile de lubrifiere și formarea bolusului alimentar care facilitează deglutiția și trecerea în tractul digestiv, fără a se deteriora;
- Lizozim: este o substanță antimicrobiană care distruge bacteriile conținute în alimente, protejând parțial dinții de dezintegrare și infecții;
- Enzime: ca și ptialină, care este o amilază care hidrolizează amidonul parțial în gură și începe digestia carbohidraților. Lipaza linguală inițiază și digestia grăsimilor;
- Staterina: cu un grup aminic terminal extrem de acid, inhibă precipitarea fosfatului de calciu prin legarea la cristalele de hidroxiapatită. În plus, are și funcția antibacteriană și antifungică;
- Alte substanțe: salivă conține, de asemenea, imunoglobuline specifice, transferină și lactoferină.
- Calciu: saliva este saturată cu Ca^{++} , care împiedică pierderea dinților și ajută la digerarea alimentelor.

Metoda conform invenției constă în următoarele etape :

- Anamneză,
- Examen citovaginal efectuat când scurgerile sangvinolente s-au diluat din punct de vedere cromatic și cantitativ
- Recoltarea probei de salivă
- Uscare la temperatura camerei a probei de salivă
- Examinare din punct de vedere matematic a unui frotiu cu material biologic
- Prelucrare imagini biologice
- Interpretarea cristalizării salivei și analiza valorilor
- Calcularea circularității fractalilor



16

În acest studiu fost luate un număr de 6 cățele din rasele Golden Retriever (Esme, Aida, Angel) și Ciobănesc German (Lula, Sofi, Asi). Cercetările au început de la prima consultație, în care proprietarul a exprimat dorința de a reproduce femela. '1

După anamneză, s-a stabilit ca următoarea consultație să aibă loc la diluarea scurgerile sangvinolente din punct de vedere cromatic dar și cantitativ.

În a doua întâlnire s-a procedat cu examenul citovaginal. Deoarece, conform literaturii de specialitate, există diferențe cu privire la interpretarea frotiului citovaginal al cățelei între vestibulul vaginal sau vaginul posterior și vaginul anterior, s-a evitat fosa clitoridiene care conține fragmente de celule cheratinizate. S-a ajuns cu ansa în vaginul anterior unde au fost executate mișcări de rotație în sens opus sensului de rotire la confecționarea ansei. Proba astfel recoltată a fost etalată pe o lamă de sticlă. Colorarea frotiului astfel obținut s-a făcut prin metoda "Diff-Quick". Descriem mai jos tehnica de colorare:

- Etalarea materialului biologic
- Uscarea frotiului (prin agitare la temperatura laboratorului)
- Introducerea frotiului în soluția fixator timp de 2 minute
- Îndepărtarea prin scuturarea soluției fixator de pe frotiu
- Introducerea frotiului în soluția Eozina G timp de 2 minute
- Îndepărtarea prin scuturare a soluției de Eozină de pe frotiu
- Introducerea frotiului în soluția thiazină timp de 2 minute
- Se spală frotiul prin plonjări repetate în apă distilată
- Se usucă la temperatura camerei

Imediat după prelevarea celulelor din vagin s-a trecut la recoltarea probei se salivă în vederea studierii modelului de cristalizare a salivei. Proba de salivă a fost recoltată din regiunea sublinguală și a vestibulului bucal cu un bețișor cu vată.



15

Procesul de recoltare a ținut cont de eventuale reziduuri de furaj sau elemente din mediu ca nisip, pământ sau iarbă. O dată ce bețișorul a fost introdus în cavitatea bucală, acesta a fost îmbibat în totalitate, pentru a se evita formarea de bule de aer în momentul etalării.

Datorită cantități mari de salivă spumoasă, plină de bule de aer și în consecință nepotrivită pentru examinare, uneori recoltarea a fost repetată până când rezultatele au fost satisfăcătoare și în consecință potrivite pentru examinare.

După recoltare, saliva a fost etalată pe o lamă și apoi s-a lăsat lama să se usuce la temperatură camerei, la 22°C timp de 20 minute.

Frotiul citovaginal împreună cu probă de salivă cristalizată s-au examinat cu ajutorul microscopului Leica. Vizualizarea atât a frotiurilor citovaginale cât și a imaginii salivei s-a făcut cu ajutorul obiectivului x10.

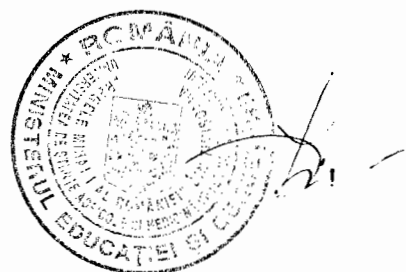
În funcție de rezultatul frotiului citovaginal, s-a stabilit data următoarei întâlniri, pentru a se repeta examinările de mai sus până la detectarea momentului optim pentru montă. Examinările au fost făcute la un interval de 2-3 zile.

Cățelele au fost tunse în regiunea antebrațială, regiunea a fost spălată și antiseptizată și după aplicarea unui garou pentru a menține hemostază, s-a prelevat sângele din vena brachială în cantitate de 1 ml într-o eprubetă. Împreună cu aceste examene s-a recoltat o probă de sânge, pentru a stabili nivelul de progesteron.

Toate pozele achiziționate cu microscopul au fost transferate și stocate într-o bază de date.

Datorită faptului că diferențele de la o zi la altă dintre lamele cu salivă erau greu de decelat la o simplă observare directă la microscop, interpretarea imaginilor a fost realizată prin utilizarea unui software (ImageJ) de analiză a imaginilor. Acest software utilizat în domeniul imagisticii medical-biologice permite vizualizarea 3D a celulelor, procesarea imaginilor biologice, compararea unor sisteme de date imagistice multiple și în cadrul sistemelor automate de hematologie.

S-a constatat că procesul de "ferning", adică de ferigizare, în urmă etalării și uscării de salivă pe o lamă, produce figuri geometrice care pot fi definite ca fiind fractali.



Cea mai simplă metodă de analiză este aceea de a calcula circularitatea.

O anumită caracteristică a fractalilor o reprezintă faptul că această figură geometrică are perimetrul care tinde spre infinit, deși aria pe care o conturează rămâne constantă.

Circularitatea este un parametru adimensional dependent de arie și perimetru, are valoarea maximă 1 pentru forma unui cerc și tinde spre zero cu cât formă este mai alungită. Acest parametru poate să fie calculat după formulă:

$$f_{\text{circ}} = 4\pi A/P^2$$

unde $\pi = 3,14$,

A = aria medie

P = suma perimetrelor

În urma examinării și interpretării din punct de vedere matematic a unui frotiu cu material biologic am concluzionat că frotiurile de salivă cristalizată au prezentat caracteristici diferite în diferite stadii ale ciclului sexual.

Astfel din fig 1 se observă că este evidentă diferența dintre tipurile de ferigizare în diferite stadii ale ciclului sexual. Observarea directă a frotiului ne oferă indicii aproximative asupra momentului ciclului sexual, structura ferigii organizându-se în lanțuri mai lungi și mai ordonate în faza de estru.

Pentru a avea date calculabile, a fost elaborat un protocol de modificare a imaginilor pentru a calcula circularitatea. Protocolul au avut ca scop, de a izola frunze de ferigă scoțând impuritățile și fundalul din măsurători, astfel încât valorile de arie și perimetru să fie calculate doar din lanțuri de ferigi.

Din fig 2 și 3 reiese evident diferență de claritate dintre poza originală și poza elaborată.

O dată ce pozele au fost elaborate, s-a procedat la analiza propriu zisă cu ajutorul softwerului "Imagej", care analizează valorile de arie și perimetru a toate particulelor.

Datele au fost procesate în programul "Excel". Prin acest program au fost calculate aria totală și perimetru total, împreună cu aria medie. O dată ce s-au calculat aceste valori a fost posibilă aplicarea formulei, pentru a calcula circularitatea:



$$f_{\text{circ}} = 4\pi A/P^2$$

Pentru un singur frotiu de salivă au fost luate cel puțin 5 imagini, din zone diferite ale câmpului microscopului din zone cele mai caracteristice din punct de vedere al ferigizării. Circularitatea a fost calculată pentru fiecare poză, găsind 5 valori diferite. Media dintre aceste valori ne-a dat valoarea finală de circularitate pentru frotiul din ziua respectivă.

Din 6 cățele luate în studiu, s-au luat probe de salivă aproximativ în 4-5 zile diferite pentru a analiza randamentul în timpul ciclului sexual, pentru a evidenția schimbările dintre faze diferite.

Se observă faptul că, valoarea circularității la începutul monitorizării femelelor s-a situat la valori mici la primele două determinări efectuate înainte de ovulație și a crescut exponențial la momentul ovulației, iar după ovulație se constată valori inferioare celei înregistrate la momentul ovulației.

Este evident faptul că valoarea de circularitate crește în apropierea momentului ovulației și scade spre sfârșitul ei. Cu scopul de a schematiza și a face mai ușor de decelat diferențele zecimale dintre aceste valori, în tabelele anexate sunt redată valorile circularității cu 6 poziții zecimale, împreună cu nivelul de progesteron seric.

Concluzii generale pe toate cazurile avute în studiu.

Se observa faptul că, la toate cele 6 cățele avute în studiu, în prima fază a ciclului sexual, cea de proestru, valoarea circularității a fost mică iar odată cu apropierea momentului ovulației din faza de estru a ciclului sexual (determinată indirect prin măsurarea nivelului hormonului progesteron) a crescut semnificativ. Menționăm faptul că, pentru relevanță din punct de vedere statistic, circularitatea de pe frotiul cristalizării sălivei a fost măsurată din 5 puncte diferite, valoarea circularității fiind deci una medie.

Nu s-a evidențiat o valoare bazală unitară a valorii circularității pe parcursul fazei de proestru a ciclului sexual la cele 6 cățele. Astfel, putem concluziona faptul că, această metodă indirectă de stabilire a momentului ovulației se poate utiliza cu succes



ca rutină pentru stabilire a momentului optim pentru inseminarea artificială sau montă naturală la cățea, doar dacă analiza valorii circularității se calculează începând cu faza de proestru a ciclului sexual.

Valoarea circularității fractalilor va fi un număr cuprins între 0 și 1. Pe parcursul debutului ciclicității sexuale această valoare are un nivel bazal, cu mici oscilații de la o determinare la alta. La momentul ovulației valoarea circularității fractalilor crește semnificativ, de 3 până la câteva zeci de ori.

Prin aplicarea acestei metode, a reieșit faptul că, din multitudinea de parametri calculați de către programul de analiză pentru fractali, dinamica valorilor circularității, a evidențiat momentul ovulației.

Metoda de recoltare și etalare a salivei este un procedură facilă și minim invazivă pentru animale, iar prelucrarea datelor și procesarea imaginilor cu un software de înaltă performanță, adaugă un grad de complexitate în plus.

Metoda de determinare a momentului optim al ovulației la cățea, conform invenției, prin interpretarea cristalizării salivei cu ajutorul programelor de analiză pentru fractali, poate reprezenta un examen complementar în vederea detectării cu exactitate a momentului ovulației.



REVENDICĂRI

- Metoda de determinare a momentului optim pentru montă sau inseminare artificială la cățea prin cuantificare a gradului de cristalizare salivei implică următoarele etape de lucru:
- Preluarea anamnezei are ca scop identificarea fazei ciclului sexual al căței, ținând cont că debutul acestei metode indirecte de stabilire a momentului ovulației la cățea trebuie începută înaintea ovulației, la începutul fazei de estru sau încă din faza de proestru a ciclului sexual. Se va avea în vedere momentul debutului scurgerilor sanvinolente, semn al debutului fazei de proestru, iar testarea va începe la momentul diluării scurgerilor vaginale din punct de vedere cromatic și cantitativ.
- Examinarea clinică a femelei va urmări aceleași semne, aspectul scurgerilor vaginale să aibe o culoare roz- roșietică
- Recoltarea probei de salivă se va face din regiunea sublinguală, cu ajutorul unui bețișor cu vată. Se va avea în vedere ca vata să fie bine îmbibată cu salivă. Eventual, înaintea recoltării, se poate stimula secreția salivară a căței prin intermediul unei recompense sau cu ajutorul hranei.
- Etalarea se va face prin rotirea bețișorului pe lamă, astfel încât examinatorul să observe un film consistent de salivă.
- Uscare probei de salivă se poate face la temperatura camerei (22°C) timp de aproximativ 20 de minute sau uscarea se poate grăbi prin amplasarea probei în apropierea unei surse de căldură. Se va analiza doar în momentul în care întreaga cantitate de salivă se va solidifica.
- Examinarea frotiului obținut se va face la un microscop prevăzut cu funcție de captare a imaginii. Se va utiliza obiectivul de examinare x 10. Se va avea în vedere ca imaginea ce urmează a fi captată să nu conțină alte structuri în afara ferigii rezultate în urma cristalizării salivei, și anume celule epiteliale sau impurități din cavitatea bucală, etc.,
- După captarea imaginii, aceasta se va introduce într-un calculator sau laptop prevăzut cu un program de analiză a fractalilor. Prelucrarea imaginii biologice în program se face în vederea îndepărtării pe cale electronică a eventualelor microparticule care ar duce la posibile erori de calcul.



În urma analizei fractalilor de către program se vor obține o multitudine de parametri. Dintre aceștia se vor selecta doar doi, și anume aria și perimetrul. Pentru calcularea circularității, în programul Excel se va calcula media aritmetică a ariilor și suma totală a perimetrelor. Rezultatele obținute se vor introduce în formula $f_{\text{circ}} = 4\pi A/P^2$ unde $\pi = 3,14$, A = aria medie iar P reprezintă suma perimetrelor. Pentru a sesiza mai ușor creșterea valorii circularității la momentul ovulației se recomandă ca valorile obținute în timp să fie reprezentate prin intermediul unui grafic.

- Valoarea circularității fractalilor va fi un număr cuprins între 0 și 1. Pe parcursul debutului ciclicității sexuale această valoare are un nivel bazal, cu mici oscilații de la o determinare la alta. La momentul ovulației valoarea circularității fractalilor, crește semnificativ, de 3 până la câteva zeci de ori.



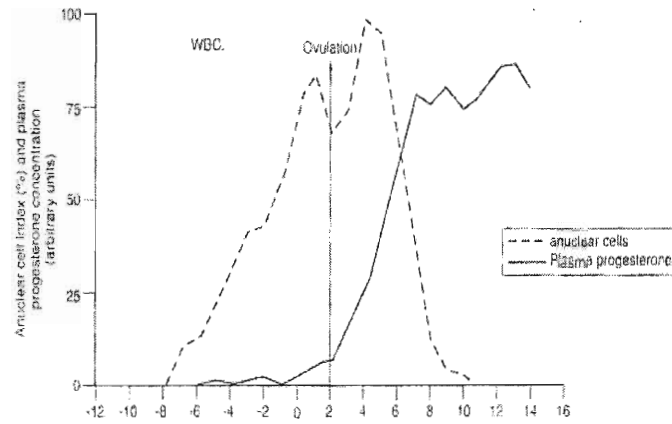


Fig. 1

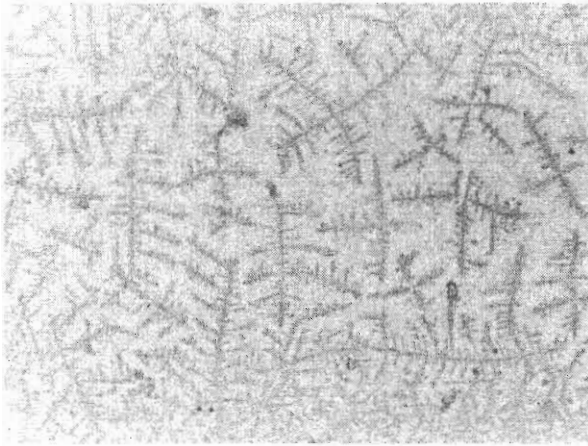


Fig. 2

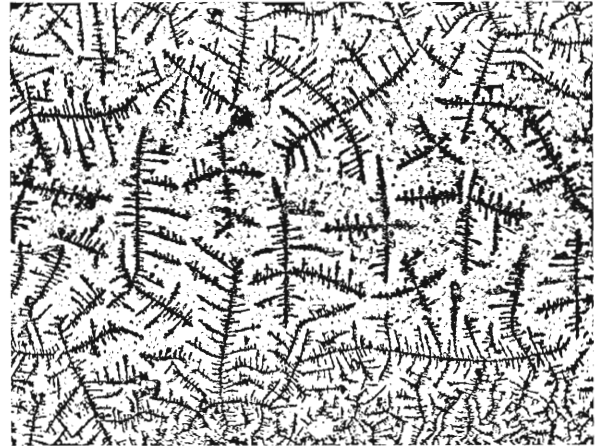


Fig. 3



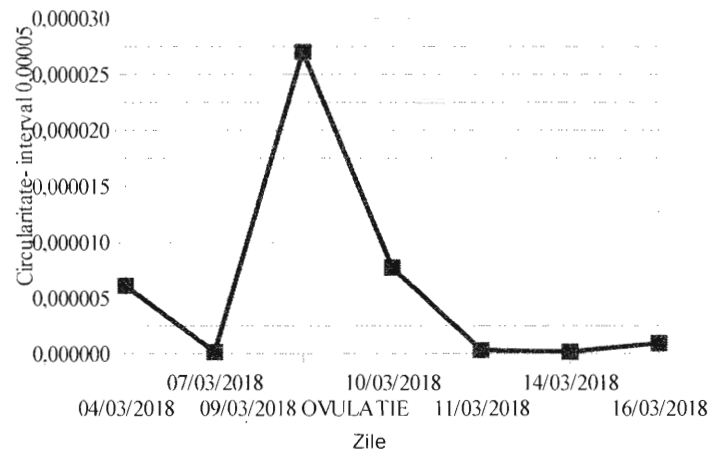


Fig. 4

Tabel 1

Data recoltării	Circularitatea		Nivel de progesteron (ng/ml)	Faza ciclului sexual
04/03/18	0,00000610613	$0,6 \cdot 10^{-5}$		PROESTRU
07/03/18	0,00000014573	$0,01 \cdot 10^{-5}$	2,10	ESTRU
09/03/18	0,00002700435	$2,7 \cdot 10^{-5}$	5,90	ESTRU
10/04/18	0,00000774340	$0,7 \cdot 10^{-5}$		DIESTRU
11/03/18	0,00000031383	$0,03 \cdot 10^{-5}$		METESTRU
14/03/18	0,00000017363	$0,01 \cdot 10^{-5}$		
16/03/18	0,00000092443	$0,09 \cdot 10^{-5}$		



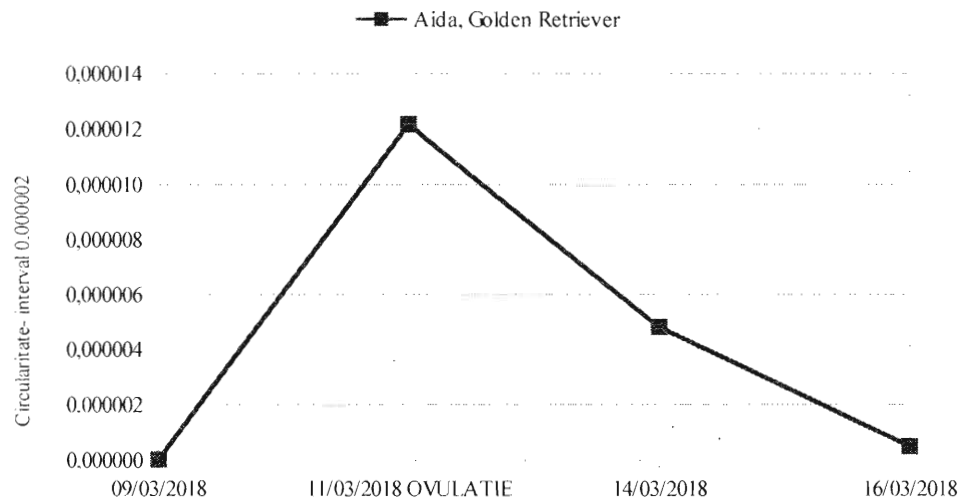


Fig. 5

Tabel 2

Zile	Circularitate (valoarea adimensională)		Nivel Progesteron (ng/ml)	Faza ciclului sexual
09/03/2018	0,0000000249	$0,02 \cdot 10^{-5}$		PROESTRU
11/03/2018	0,0000121649	$1,21 \cdot 10^{-5}$	5,91	ESTRU
14/03/2018	0,0000048080	$0,48 \cdot 10^{-5}$		ESTRU
16/03/2018	0,0000004869	$0,04 \cdot 10^{-5}$		METESTRU



6

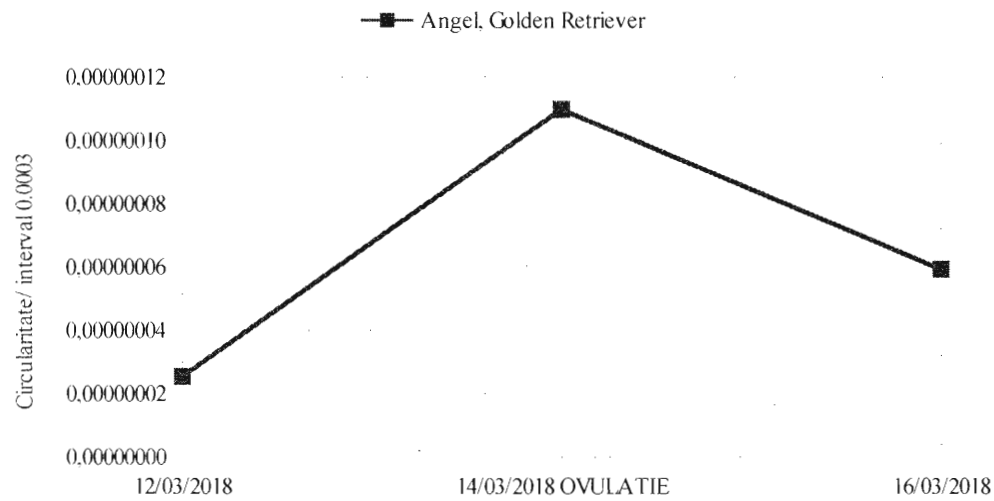


Fig. 6

Tabel 3

Zile	Circularitate		Nivel progesteron (ng/ml)	Faza ciclului sexual
12/03/2018	0,00000002531	$0,002 \cdot 10^{-5}$		PROESTRU
14/03/2018	0,00000010982	$0,01 \cdot 10^{-5}$	7,28	ESTRU
16/03/2018	0,00000005951	$0,005 \cdot 10^{-5}$		DIESTRU



Handwritten signature and initials.

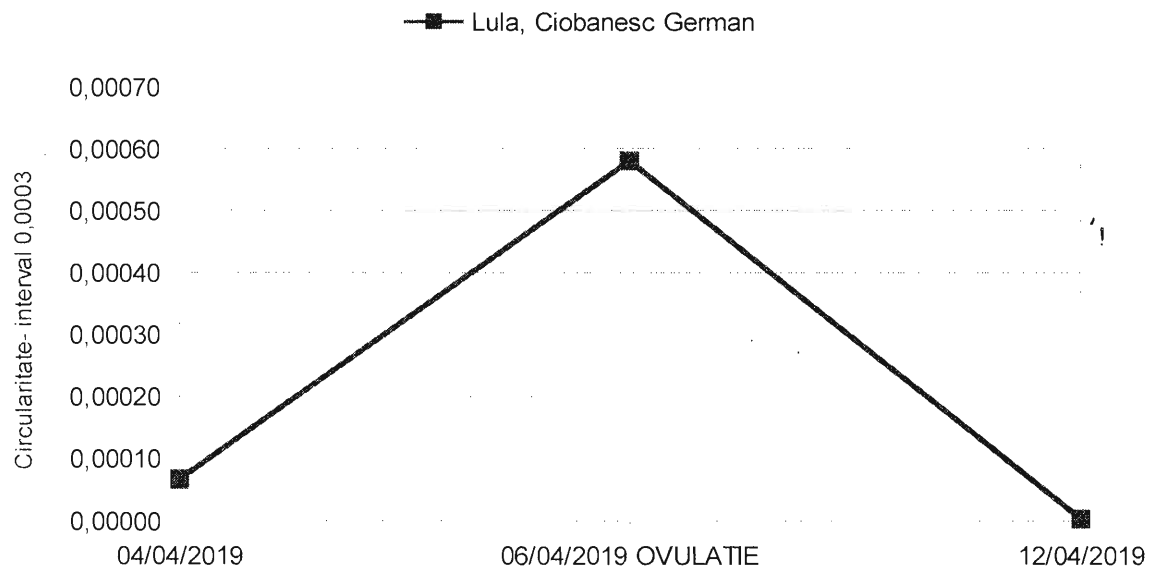


Fig. 7

Tabel 4

Zile	Circularitate (valoarea adimensională)		Nivel progesteron (ng/ml)	Faza ciclului sexual
04/04/2019	0,00006642619	$6,64 \cdot 10^{-5}$		PROESTRU
06/04/2019	0,00057999447	$57,99 \cdot 10^{-5}$	12,51	ESTRU
12/04/2019	0,00000302322	$0,30 \cdot 10^{-5}$		METESTRU



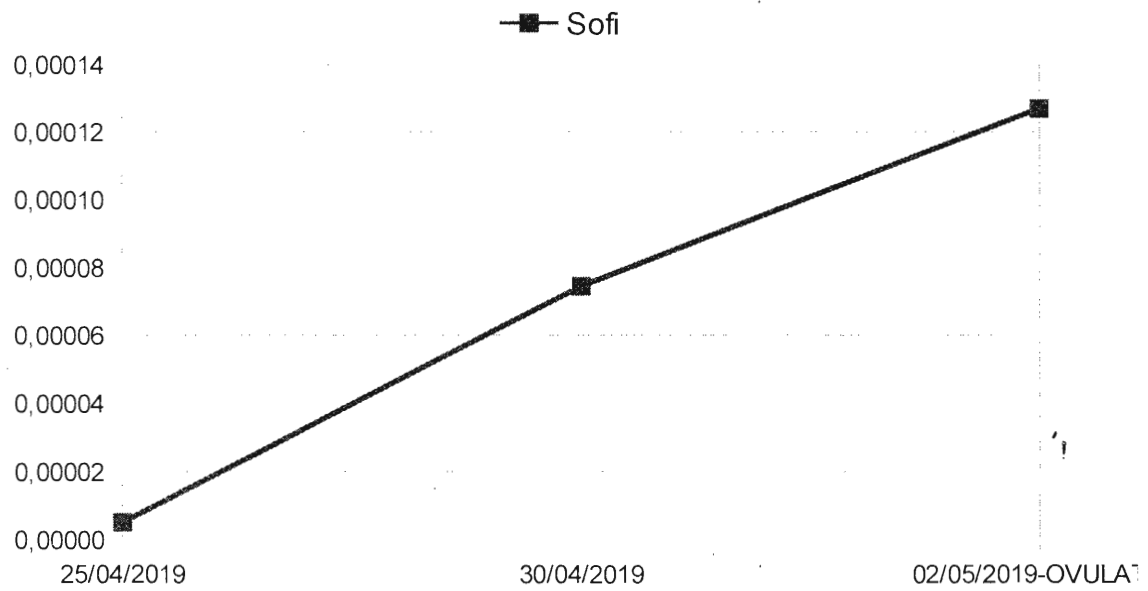


Fig. 8

Tabel 5

Zile	Circularitatea		Nivel progesteron (ng/ml)	Faza ciclului sexual
25/04/2019	0,00000504944	$0,50 \cdot 10^{-5}$		PROESTRU
30/04/2019	0,00007445325	$7,44 \cdot 10^{-5}$	2,16	PROESTRU
02/05/2019	0,00012700861	$12,7 \cdot 10^{-5}$	6,33	ESTRU



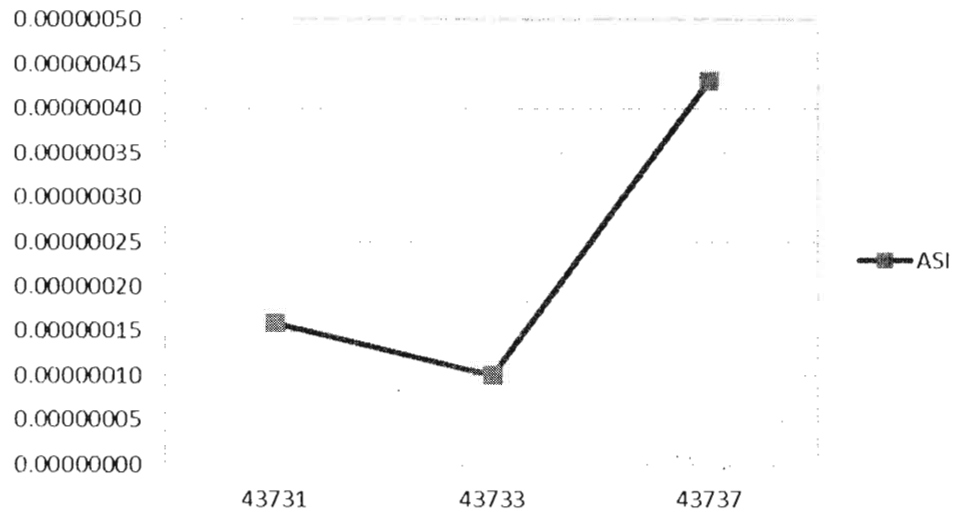


Fig. 9

Tabel 6

Ziua	Circularitatea	Circularitatea	Nivel progesteron (ng/ml)	Faza ciclului estral
23/09/2019	0,00000016	$0,16 \cdot 10^{-6}$		Proestru
25/09/2019	0,00000010	$0,10 \cdot 10^{-6}$	1,25	Proestru
29/09/2019	0,00000043	$0,43 \cdot 10^{-6}$	5,73	Estru

