



(11) **RO 127755 B1**

(51) **Int.Cl.**

C12Q 1/42 (2006.01);
C12Q 1/48 (2006.01);
C12Q 1/54 (2006.01);
C12Q 1/58 (2006.01);
C12Q 1/62 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01005**

(22) Data de depozit: **22/10/2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/12/2017** BOPI nr. **12/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2012 BOPI nr. **8/2012**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU APICULTURĂ
S.A., BD. FICUSULUI NR.42, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **ȘAPCALIU AGRIPINA, STR. DREPTĂȚII
NR.5, BL.M22A, SC.3, ET.7, AP.102,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MATEESCU CRISTINA,
STR. DOAMNA OLTEA NR.39, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SAVU VASILICĂ, STR. FLOARE ROȘIE
NR.7, BL.51, SC.3, ET.3, AP.95, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SICEANU ADRIAN,
STR. RECONSTRUCȚIEI NR. 6, BL. 28,
SC. 2, ET. 1, AP. 50, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CAUIA ELIZA, STR. LUGOJ NR. 11,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CRENGUȚA PAVEL,
STR. NADĂ FLORILOR NR.50, BL.B6,
AP.11, ET.2, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **MILITARU IOANA,
STR. ROȘIA MONTANĂ NR.3, BL.M20,
SC.4, AP.133, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **RĂDOI ION, BD.IULIU MANIU
NR. 128-134, BL. 22, AP. 127, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POPA VASILE VIOREL,
STR. VALEA ARGEȘULUI NR.2, BL.D10,
SC.B, ET.1, AP.13, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MITREA IOAN LIVIU,
CALEA APEDUCTULUI NR.11, BL.A4A,
SC.2, AP.12, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **PREDOI ȘTEFANIA, STR. ALEEA ALEȘD
NR.8, BL.N22, AP.14, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MATEI MARIOARA, STR. GÂRLEI
NR. 152, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MILEA FLORENTIN, STR. DREPTĂȚII
NR. 5, BL. M22A, AP. 101, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TUDOR NICULAE,
ALEEA POIANA MUNTELUI NR.2, BL.OD3,
SC.6, ET.1, AP.206, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **LEAU TRAIAN, STR. DEZROBIRII NR.44,
BL.09, AP.166, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **PĂUNESCU ILEANA, BD. BANU MANTA
NR.1.2, SC.A, ET.2, AP.10, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NEGOIȚĂ CARMEN,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR. 231, BL. V1,
SC. 2, AP. 63, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **BADIC ELENA LUIZA,
BD. CONSTRUCTORILOR NR.12, BL.G10,
SC.A, ET.4, AP.20, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BUTU ALINA, STR. DREPTĂȚII NR. 10,
BL. Ő3, SC. 3, AP. 128, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BUTU MARIAN, STR. DREPTĂȚII NR.10,
BL.Ő3, SC.3, AP.128, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DIACONESCU MIRCEA DRAGOȘ,
STR. CĂPĂLNA NR.3, BL.14D, SC.2, AP.25,
ET.1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ROMAN MIHAELA, STR. CĂMIL RESSU
NR.703, BL.PM26, SC.E, AP.179, ET.8,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MAGDICI MARIA, ȘOS. NICULINA NR.57,
BL.978, SC.A, ET.1, AP.6, IAȘI, IS, RO;**
• **POLIANA TUDOR,
STR. ALEEA POIANA MUNTELUI NR.2,
BL.OD3, SC.6, ET.1, AP.206, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IONIȚĂ MARIANA,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.105,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**ȘAPCALIU AGRIPINA, RĂDOI I.,
CONDUR D., SICEANU A., CAUIA ELIZA,
PAVEL CRENGUȚA, "VALORILE DE
REFERINȚĂ ALE PRINCIPALILOR
PARAMETRI BIOCHIMICI DIN HEMOLIMFA
ALBINELOR (A. M. CARPATICA)
DIN ZONA DE SUD EST A ROMÂNIEI",
LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE ZOOTEHNIE ȘI
BIOTEHNOLOGII, VOL 40(2), 2007;**
**ȘAPCALIU AGRIPINA, RĂDOI I.,
CONDUR D., SICEANU A., CAUIA ELIZA,
PAVEL CRENGUȚA, "EVOLUȚIA UNOR
PARAMETRI BIOCHIMICI DIN HEMOLIMFA
ALBINEI MELIFERE (A. M. CARPATICA)
ÎN SEZONUL INACTIV",
LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE ZOOTEHNICE ȘI
BIOTEHNOLOGII, VOL. 41(2), 2008**

(54) **METODĂ DE EVALUARE A STĂRII DE SĂNĂTATE
A COLONIILOR DE ALBINE**

Examinator: biochimist EREMIA LAURA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat,
la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în
termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de
acordare a acesteia

RO 127755 B1

RO 127755 B1

1 Prezentul brevet se referă la definirea unor markeri biochimici și celulari aflați în com-
3 poziția hemolimfei la albine, ca indicatori specifici ai stării de sănătate a acestora, și ca
5 markeri de monitorizare a diferitelor stări patologice și de stres apărute la nivelul coloniilor
7 de albine.

9 Hemolimfa la albine este componenta sistemului circulator analogă sângelui la
11 animalele vertebrate. Ea scaldă organele interne și joacă un rol important în nutriție și în
13 funcțiile de apărare ale albinei (imunitate). Componentele de bază din compoziția hemolimfei
15 sunt plasma și hemocitele (elementele figurate). Constituenții biochimici ai plasmei sunt de
17 natură anorganică (apă, potasiu, magneziu, clor) și organică (carbohidrați - trehaloza, zaha-
19 roza, fructoza, maltoza; compuși azotați - aminoacizi, enzime, proteine de tipul vitelogenului;
21 lipide - fosfolipide, acizi grași liberi, steroli; hormoni - hormonul juvenil HJ-III).

23 Hemolimfa albinelor nu conține pigment respirator. Cantitatea de hemolimfă, precum
25 și gradul de încărcare cu diferitele componente anorganice și organice diferă mult în funcție
27 de vârstă, de starea de nutriție și sănătate a albinelor, de activitatea pe care o desfășoară
29 ciclul biologic, precum și de mediul ambiant în care albinele viețuiesc. Pe lângă aceste com-
31 ponente, valorile fizico-chimice, respectiv, pH-ul, presiunea osmotică, conținutul în O₂, CO₂
33 și sistemele tampon au valori diferite atât în faza de activitate larvară și de metamorfoză, cât
35 și în cursul diferitelor activități ale albinelor adulte.

37 Astfel, glucidele de tipul trehalozei variază foarte mult în funcție de stadiul de dezvoltare,
39 starea de nutriție și de proprietățile cinetice ale glucidelor, dar în același timp există un
41 control endogen al glicemiei, similar cu cel de la mamifere.

43 Conținutul în aminoacizi, ca și al proteinelor totale, este mai ridicat în stadiul larvar
45 decât la albinele adulte. În hemolimfă au fost identificați toți cei 22 de aminoacizi esențiali,
47 și în plus alți 10 aminoacizi non-proteici.

49 Enzimele sunt proteine cu structură complexă, activate de vitamine, oligo sau macro-
51 elemente, cu rol bine definit în metabolism, și cu importanță deosebită ca markeri biologici.

53 Vitelogenul este proteina specifică organismelor femele, și reprezintă 80% din
55 întreaga încărcătură proteică la mătcă și 35% la albinele doici.

57 Lipidele reprezentate de fosfolipide, acizi grași liberi, steroli, diferă cantitativ la adult
59 față de larvă. Astfel, la larvele aflate în ultima parte a dezvoltării sunt de aproximativ 100 g/l
61 datorită dezintegrării corpului gras în mici fragmente eliberate în hemolimfă.

63 Hormonii din compoziția hemolimfei sunt reprezentați de hormonul juvenil HJ-III și de
65 Makysteron A. HJ-III are nivel ridicat la stadiile larvare incipiente, scade apoi către 0 la larve,
67 crește la prepupe și scade din nou către 0 la pupe. El variază, de asemenea, în diferite faze
69 de activitate, și influențează comportamentul albinelor lucrătoare.

71 Elementele figurate - hemocitele - prezintă morfologie și funcții diferite, fiind descrise
73 mai multe tipuri, cu denumiri ce variază după diferiți autori [Chauvin R., 1968, Van
75 Steenkistes, 1988, I. Sorescu, 1998, Zakaria M.E., 2007].

77 **Șapcaliu Agripina, Cauia Eliza, Guresoia Ion, Condur Dan, Rădoi Ion, "Valorile**
79 **de referință ale principalilor parametri biochimici din hemolimfa albinelor (A. M.**
81 **Carpatica) din zona de sud-est a României", publicat în buletinul de Lucrări Științifice**
83 **Zootehnie și Biotehnologii, vol 40(2), 2007**, se referă la analizele biochimice din hemolimfa
85 de albine (examen paraclinic), pentru investigarea și stabilirea valorilor de referință din
87 hemolimfă la albinele sănătoase din sp. *Apis mellifera*. Familiile de albine (Lotul experi-
89 mental) au provenit din Biobaza I.C.D.A. - București, de la care s-au recoltat probe de albine
91 în vederea stabilirii stării de sănătate a familiei respective. În acest mod au fost înlăturate
93 probele ce proveneau din familiile de albine bolnave, și au fost folosite numai familiile puter-
95 nice, de la care s-au recoltat probe de albine sănătoase, în vederea recoltării hemolimfei. Au

fost recoltate, prin metode speciale, probe de hemolimfă (300 µl/probă) de la un număr de aproximativ 50 albine/probă, în sezonul activ (primăvară-vară) și în sezonul inactiv (toamnă-iarnă). Numărul total de probe de hemolimfă nediluată au fost de 50, iar cele de albine au fost de aproximativ 2500. Au fost determinați următorii 22 de parametri biochimici: GLU (mg/dl), HDL-c (mg/dl), ALP (UI/l), Hb (g/dl), T-cho (mg/dl), Tprot (mg/dl), Alb. (g/dl), BUN (mg/dl), LDH (UI/l), CPK (UI/l), Mg (mg/dl), FRA (µm/l), IP (mg/dl), GGT (UI/l), GOT (UI/l), GPT (UI/l), Ca (mg/dl), Cre (mg/dl), Amy (UI/l), T-BIL (mg/dl), TG (mg/dl), acid uric (mg/dl). Analizele au fost efectuate după recoltarea și prelucrarea probelor cu ajutorul aparatului SPOTCHEM EZ SP4430, folosind kituri uscate, respectiv, tehnica slide-urilor.

În Șapcaliu Agripina, Rădoi I., Condur D., Siceanu A., Cauia Eliza, Pavel Crenguța **“Evoluția unor parametri biochimici din hemolimfa albinei melifere (a. M. carpatica) în sezonul inactiv”**, publicat în **buletinul de Lucrări Științifice Zootehnie și Biotehnologii, vol 41(2), 2008**, se prezintă analizele biochimice ale hemolimfei albinelor, care ar putea fi utilizate în monitorizarea stării de sănătate a coloniilor de albine. Cercetările au fost efectuate pe probe colectate de la 5 colonii de albine, de la stupina de reproducere a Institutului de Cercetare și Dezvoltare în Apicultură din București. S-au efectuat analizele biochimice, constând din 50 de albine pe probă (10 albine/colonie), care au fost colectate la întâmplare și la diferite intervale de timp, în sezonul inactiv (toamnă-iarnă). În total, s-au colectat 250 de probe de hemolimfă într-un interval de 2 ani, și au fost analizați următorii 21 de parametri biochimici: GLU, HDL-c, ALP, T-cho, Tprot, Alb, BUN, LDH, CPK, Mg, IP, GGT, GOT, GPT, Ca, Cre, Amy, T-BIL, TG, UA. Testul a fost efectuat după colectarea și prelucrarea probelor, utilizând SPOTCHEM EZ_{SP4430}, folosind kituri uscate. Pe parcursul celui de-al 2-lea sezon inactiv, valorile majorității parametrilor biochimici cresc în diferite proporții, nivelurile lor fiind menținute, de asemenea, în prima parte a sezonului activ (aprilie, mai, iunie).

Rolul funcțional diferit face ca, pe parcursul activităților specifice, elementele figurate să se modifice și să conducă la apariția unor varietăți morfologice în cadrul fiecărui grup funcțional.

Asocierea unor markeri biochimici ai hemolimfei (plasmei), alții decât cei enumerați (cationi, carbohidrați, compuși proteici, hormoni), cu un profil citologic complex (elementele figurate în dinamică), oferă o mai mare acuratețe în stabilirea stării de sănătate și în diagnosticul unor stări patologice apărute în interiorul coloniilor de albine. Această abordare face obiectul prezentului brevet.

Plecând de la metodele paraclinice și clinice redate anterior, se conturează următoarele dezavantaje ale acestora:

- nu permit monitorizarea în dinamică a familiilor de albine;
- surprind numai stările patologice ireversibile;
- nu sunt metode și de prevenție.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unei metode de evaluare a stării de sănătate a coloniilor de albine, precum și semnalizarea prezenței sau absenței mecanismelor de apărare imunologică a albinelor.

Metoda de evaluare a stării de sănătate a coloniilor de albine, conform invenției, constă în recoltarea hemolimfei cu ajutorul unui tub capilar în condiții de igienă, și se determină valorile a 13 markeri biochimici care au valorile de referință încadrate între următoarele limite: GLU = 47,2...572,9 mg/dl; ALP = 0,7...178 UI/l; GPT = 3...404 UI/l; GOT = 12...496 UI/l; Ca = 0,1...16,28 mg/dl; CPK = 6,9...544 UI/l; Cre = 0,1...76 mg/dl; GGT = 0,9...135 UI/l; Mg = 0,1...4,1 mg/dl; Tpro = 4,0...5,51 mg/dl; TG = 10...317 mg/dl; UA = 1,1...26 mg/dl; BUN = 2...49,2 mg/dl, parametri care definesc starea de sănătate a coloniilor de albine la momentul respectiv, precum și semnalizarea prezenței sau absenței mecanismelor de apărare imunologică a albinelor.

RO 127755 B1

1 Prin aplicarea metodei se obțin avantaje ale optimizării examenului clinic prin utiliza-
rea unor markeri biologici din hemolimfă, prezentate în continuare.

3 Plecând de la aceste considerente, actualul brevet definește o nouă viziune asupra
abordării patologiei familiilor de albine, respectiv, optimizarea algoritmului de diagnostic prin
5 integrarea unor noi parametri biochimici ai hemolimfei, și analiza citomorfologică a popula-
țiilor de hemocite.

7 Utilizarea markerilor citologici permite, prin caracterizarea etapelor de transformare
a hemocitelor pe parcursul unor stări patologice, semnalarea prezenței sau absenței
9 mecanismelor de apărare, fiind un element de prognostic în evoluția bolii.

11 Utilizarea markerilor biochimici și citologici, în asociere cu metodele standardizate de
diagnostic pentru diferitele boli ce afectează coloniile de albine, permite, de asemenea,
stabilirea mai corectă a etiologiei stadiului bolii.

13 Prezentul brevet definește o nouă viziune, respectiv, noi markeri biochimici de
diagnostic, ce vizează analiza biochimică de finețe și citomorfologică a hemolimfei.

15 S-a definit o nouă linie de dezvoltare din două motive: un prim motiv este legat de
faptul că albinele constituie o comunitate de insecte cu totul particulară, la care existența
17 este condiționată dublu, de legile vieții sociale și de homeostazia indivizilor componenți,
homeostazie care se leagă strâns de compoziția și funcțiile hemolimfei, astfel încât studiul
19 biochimiei și citomorfologiei hemolimfei poate oferi un instrument eficient în completarea
diagnosticului.

21 Astfel, s-a putut permite stabilirea unor limite de referință pentru parametrii biochimici
din hemolimfa albinelor sănătoase, care ar putea fi utile în examenele de diagnostic în stări
23 patologice, intoxicații și în stabilirea unor tulburări de metabolism, și reprezintă un obiectiv
important al analizelor de laborator din hemolimfă.

25 Cel de-al doilea motiv este legat de lipsa până la acest moment a unor observații în
dinamică ale variațiilor din compoziția hemolimfei la albine, atât în condiții patologice, cât și
27 în condiții normale (variații sezoniere, variații în condiții de stres, variații în condiții induse-
controlate), și a datelor privind implicarea acestora în mecanismele imune de apărare. La
29 albine, ca la majoritatea nevertebratelor, sistemul imunitar implicat în apărare este sistemul
înnăscut - un sistem de apărare rapidă și eficace, care intervine prin două tipuri de răspun-
31 suri: un răspuns umoral și un răspuns celular. La albine, hemocitele (elementele figurate ale
hemolimfei) îndeplinesc rolul primordial în cele două tipuri de răspunsuri.

33 Au fost descrise în hemolimfa albinelor, în decursul anilor, mai multe tipuri de
hemocite, clasificările furnizate de diferiți autori fiind destul de confuze și stufoase. Am căutat
35 să reevaluăm, după criteriile morfologice și funcționale, elementele figurate, și să le integrăm
într-un sistem mult mai simplu, care să ajute medicul practician în caracterizarea stării de
37 sănătate a albinelor. Am avut în atenție grupele funcționale implicate în mecanismele de
apărare, și posibilele variante fenotipice pe parcursul acestor procese, cu modularea morfo-
39 citometrică.

41 Dincolo de gradul de noutate, prezentul brevet, prin abordarea unor markeri de
diagnostic, permite o evaluare în dinamica sezonieră și în condiții modulate (creștere liberă,
creștere stimulată în Apiclimate) a familiilor de albine și a stării de boală.

43 Un alt avantaj pe care îl conferă utilizarea acestor markeri în monitorizarea coloniilor
de albine este legat de posibilitatea depistării stărilor de stres și a celor carentiale ce apar
45 în diferite perioade de viață în coloniile de albine, și corectarea la timp a acestora, pentru a
preveni pierderile economice, vizând astfel rolul profilactic în evaluarea sănătății albinelor.

47 Prezentul brevet definește ca markeri specifici 13 constante biochimice ale hemolim-
fei: fosfatasa alcalină ALP (UI/I), alanin amino transferaza GPT/ALT (UI/I), aspartat amino
49 transferaza GOT/AST (UI/I), calciul total Ca (mg/dl), creatininfosfokinaza CPK (UI/I),

RO 127755 B1

creatinina Cre (mg/dl), gamma glutamil transpeptidaza GGT (U/l), glucoza GLU (mg/dl), magneziu Mg (mg/dl), proteine totale T-Pro (g/dl), trigliceride TG (mg/dl), acid uric UA (mg/dl), uree (nitrogen ureic) BUN (mg/dl) și 2 grupe morfofuncționale de hemocite (granulocite și hialinocite).	1
Valorile de referință pentru GLU din hemolimfă sunt cuprinse în intervalul 300,72...700,97 mg/dl, nivelul ridicat demonstrând faptul că GLU din hemolimfă este principalul parametru al hemolimfei albinelor, și o oglindă a metabolismului glucidic, alături de trehaloză, ce reprezintă glucidul de rezervă.	3
Valorile de referință pentru activitatea enzimei fosfataza alcalină (ALP) se plasează între limitele 1...90 U/l și prezintă o evoluție relativ constantă în sezonul activ, și o creștere la final de sezon activ, ceea ce sugerează că activitatea fosfatazei alcaline (ALP) din hemolimfă reprezintă o exprimare a homeostaziei organismului albinei.	5
Valorile de referință pentru activitatea glutamat alaninaminotransferazei (GPT) se situează în intervalul 5...600 U/l, prezentând scăderi în perioada de maximă activitate, cu minime către sfârșitul sezonului activ, și menținând valori mici în ultima parte a sezonului activ.	7
Valorile de referință pentru activitatea GOT (aspartataminotransferazei) se situează în intervalul 10...593 U/l, valorilor ridicate de la începutul sezonului activ urmându-le o curbă descendentă, cu o scădere importantă în timpul sezonului activ, până la un minimum de 14 U/l în perioada de sfârșit de sezon activ, iar după un vârf de activitate de 300 U/l, valorile scad semnificativ, sub 40 U/l.	9
Există un paralelism între graficele activității enzimactice pentru principalele enzime investigate GOT, GPT, CPK, ceea ce evidențiază o stare normală a funcțiilor metabolice, în principal a celor hepatice, și starea de sănătate a coloniilor de albine.	11
Valorile de referință ale calciului (Ca) din hemolimfă se situează între 7,64 și 16,28 mg/dl, cele mai mici valori înregistrându-se în sezonul inactiv, care se continuă la sfârșitul acestuia cu un maximum. Pe ansamblu, homeostazia calciului se caracterizează prin existența unor oscilații relativ modeste față de medie în perioada de activitate maximă, fără căderi ale calciului din hemolimfă.	13
Valorile de referință pentru CPK (creatinfosfokinazei) sunt cuprinse între 68 U/l și 40 U/l, cu oscilații >400 U/l în plin sezon activ. La sfârșitul sezonului activ se constată o scădere semnificativă <40 ori.	15
Analiza variației concentrației creatininei (Cre) din hemolimfă arată valori între 10,98 mg/dl și 45,95 mg/dl.	17
Analiza variației concentrației GGT (gammaglutamiltranspeptidaza) înfățișează valori cuprinse între 1,56 U/l și 24,65 U/l Activitatea enzimei GGT se stabilizează la valori relativ mici, 5,45...15,58 U/l, oscilând în jurul mediei, fiind prezente și câteva excepții, 2,72 U/l și, respectiv, 23,62 U/l, acestea fiind dependente de cantitatea și calitatea hranei.	19
Valorile de referință pentru magneziu (Mg) se găsesc între limitele 0,30 mg/dl și 16,30 mg/dl. Cu excepția unor oscilații legate de calitatea hranei (4,47...4,79 mg/dl), în sezonul activ valorile magneziului se găsesc aproape de medie, 7...12 mg/dl, ceea ce demonstrează dependența acestuia de modul de hrănire.	21
Parametrul biochimic proteine totale (Tpro) prezintă valori de referință cuprinse între 1,70 mg/dl și 6,51 mg/dl. Aceste valori prezintă o constanță remarcabilă, de 2,50...5,87 mg/dl, ceea ce arată clar caracterul homeostazic al proteinelor totale din hemolimfa albinelor.	23
Evoluția valorilor de referință pentru trigliceride (TG) este între limitele de 61,78 mg/dl și 423,89 mg/dl, arătând o evoluție simetrică în prima și ultima parte a sezonului activ, crescând ușor de la 93,80 mg/dl către 317,70 mg/dl. În perioada de activitate maximă, valorile se abat ușor, în plus sau minus de la media sezonieră, fapt ce demonstrează rolul homeostazic al acestui parametru.	25

RO 127755 B1

Variația concentrației acidului uric (UA) din hemolimfă se desfășoară între limitele de 1,86 mg/dl și 18,13 mg/dl, acesta fiind un parametru hemolimfatic relativ constant, legat de homeostazia proteinelor, de gradul de uzură al organismului în perioada de cules, și de eficiența aparatului excretor.

Limitele pentru valorile de referință ale ureei (BUN) din hemolimfă sunt cuprinse între 2,41 mg/dl și 49 mg/dl. Eliminând vârfulurile accidentale, constatăm o evoluție a ureei din hemolimfă între 4,21 mg/dl și 16,86 mg/dl, legată de gradul de hidratare și de eficiența aparatului excretor, dar și cu implicații în homeostazia albinelor.

Pentru evaluarea makerilor biochimici, s-a recoltat hemolimfa de la 10 până la 100 indivizi/familie de albine în sezon activ și sezon inactiv, la diferite intervale de timp. Analiza s-a realizat prin 2 metode de laborator cele de biochimie uscată și biochimie umedă. Pentru fiecare determinare prin biochimie uscată din hemolimfă au fost necesari 200...800 μ l/probă analizată/determinare și, respectiv, 800...1200 μ l/probă analizată/determinare, prin biochimie umedă.

Graficul recoltărilor de probe de hemolimfă și metode de analiză

Parametrii biochimici ai hemolimfei					Analiza cito-morfologică a hemocitelor	
Metoda de analiză	Metoda de biochimie uscată	Metoda de biochimie umedă	Metode de biochimie uscată și umedă	Metoda de biochimie umedă	Tehnica frotiului	Tehnica frotiului
Tip sezon	activ-inactiv albine sănătoase	activ-albine sănătoase	Apiclimator	activ-albine bolnave	activ- albine sănătoase	inactiv- albine sănătoase
Nr. probe recoltate	110	60	20	10	30	30
Cantitate hemolimfa recoltată/probă	800-1200 μ l	200-600 μ l	200-600 μ l	200-600 μ l	15-60 μ l/probă	15-60 μ l/probă
Nr. familii de albine	5	5	5	5	5	5
Nr. albine/probă	5-80	5-80	5-80	5-80	5	5
	(activ/inactiv)					
Total probe	200 probe biochimie uscată + umedă, sezon activ + sezon inactiv				180 frotiuri (3 frotiuri/probă)	

Pentru evaluarea elementelor figurate s-a utilizat metoda frotiului și analiza citomorfologică. S-au utilizat 15...20 μ l de hemolimfă/probă/sezon activ sau 45...80 μ l/probă/sezon inactiv, prelevată de la 5...80 albine/lot, prelucrată în paralel prin 3 metode:

- fracții de 15...60 μ l de la 5...80 albine/lot s-au diluat și colorat cu albastru de tripan, din care s-au făcut apoi aprecieri în camera Malassez și la microscopul inversat (stereomicroscop), în scopul evaluării numărului și viabilității elementelor figurate (hemocite);

- fracții de 15...60 μ l de hemolimfă s-au etalat direct pe lame de sticlă degresate, fiind realizate frotiuri (preparate fixe) colorate prin metoda Giemsa modificată;

- hemolimfa recoltată de la 5...80 albine a fost prelevată într-o soluție anticoagulantă, iar hemocitele au fost separate de plasmă prin centrifugare și apoi spălate cu sol MAS și centrifugate din nou, în aceleași condiții. Din sedimentul obținut s-au prelevat fracții de 5...18 μ l, ce s-au etalat pe lamă, fiind realizate frotiuri colorate după tehnica Giemsa modificată (preparate fixe).

RO 127755 B1

În ceea ce privește clasificarea hemocitelor, există la ora actuală o mare ambiguitate, toate clasificările existente orientându-se îndeosebi după aspectul morfologic, fără a face o corelare cu semnificația funcțională. Ținând cont de aspectul morfologic general al hemocitelor (aspectul citoplasmei, al nucleului, prezența granulațiilor), precum și de implicarea lor funcțională, hemocitele au fost grupate astfel:	1
I. granulocite - caracterizate prin: prezența citoplasmei în cantitate mare, și a unor granulații rotunde, de talie relativ omogenă, nucleul rotund, colorat puternic în roșu, situat cel mai adesea central, rareori excentric. Ținând cont de afinitatea granulațiilor, am subîmpărțit acest grup în mai multe subtipuri:	3
- granulocite bazofile (cu granulații numeroase, colorate în albastru pal);	5
- granulocite acidofile (granulații mai puține, roșu intens, de talie mică);	7
- granulocite neutrofile (granulații mai rare, roz-bej);	9
- granulocite cu granule optic-vide;	11
II. hialinocite - celule de talie variată, cu citoplasmă bozofilă, divizate în 5 subtipuri:	13
- hialinocite de talie mare, cu citoplasmă hialină;	15
- hialinocite de talie mică, cu citoplasmă hialină, nucleu voluminos, roșu-violet, situat central, cu o lizieră de citoplasmă bleu;	17
- hialinocite de talie mare, cu 1 sau 2 nucleu, ce dezvoltă pseudopode lungi, fine;	19
- hialinocite cu aspect de plasmodium, cu mai mulți nucleu (până la 9) picnotici, situați central, cu activitate de fagocitoză bine exprimată (prezența de material fagocitat în vezicule);	21
- hialinocite de formă neregulată, cu citoplasmă heterogenă, determinată de prezența lizozomilor de talie mare, cu valuri citoplasmatică periferice, pseudopode fine.	23
Pe lângă aceste 2 tipuri de hemocite, au putut fi frecvent observate și celule cu aspect îmbătrânit (nucleu lobat), și celule aflate în apoptoză (cu nucleu împins la periferie, cu vacuole sau chiar în kariorexis).	25
Am încercat să identificăm și alte tipuri de leucocite, conform clasificărilor existente în literatură. Astfel, în grupa granulocitelor am descris 3 tipuri morfofuncționale: GH ₁ , GH ₂ și GH ₃ , iar în grupa celor negranulare sau hialinocite am descris: prohemocite, plasmocite și oenocite.	27
Hemocite granulare (GH ₁) - prezintă un aspect polimorf: cu digitații și vezicule picnotice; incluziuni omogene; incluziuni heterogene, dense; incluziuni cu vezicule (fagozomi).	29
Hemocite granulare (GH ₂) - sunt ovoide sau sferoide, cu citoplasmă omogenă și suprafața netedă, rar cu digitații și vezicule picnotice de dimensiuni foarte mici. Prezintă vezicule cu microincluziuni refringente și fenomenul de fagocitoză.	31
Hemocite granulare (GH ₃) - sunt polimorfe, cu digitații și vezicule picnotice, citoplasmă cu corpi hialini (granule limpezi); numeroase expansiuni foarte active în hemocel.	33
GH ₁ - sunt similare cu „coagulocitele”, deoarece suferă un proces rapid și puternic de transformare pe parcursul regenerării hemolimfei; sunt caracterizate prin trei tipuri de granulații.	35
GH ₂ - participă la încapsulare prin fagocitoză (plasmocite granulare). Este posibilă legătura între GH ₂ și GH ₁ , cu transformarea dintr-o formă pură în alta.	37
Hemocitele negranulare - prohemocite (PRO), sunt mici, cu raport nucleu-citoplasmatic crescut, stratul redus de citoplasmă ce înconjoară nucleul este bazofil și slab reactiv la testele citochimice.	39
Deoarece au apărut în număr mic și au un index mitotic ridicat, pot fi considerate celule stem pentru celelalte hemocite. Ele apar mai rar după perturbarea hemocitogramei, ceea ce pare corelat cu lansarea din organele hemocitopoetice.	41
	43
	45
	47

RO 127755 B1

1 Plasmocitele (PL) sunt mai mari ca PRO, și cu raport nucleo-citoplasmatic crescut.
Sunt de obicei cu formă perfectă, foarte rar cu mici expansiuni. Uneori au fost alungite. Cito-
3 plasma are incluziuni mari (largi) - lamelocite. Ele formează capsule în jurul corpiilor de inclu-
zie (corpi străini), judecând rolul celulelor GH₂. Ele apar în număr crescut când lipsesc GH₂.

5 Oenocitele (OE) sunt celule mari, cu formă regulată, rotundă sau ovală, cu citoplasmă
omogenă. Nucleul este de obicei excentric, cu nucleol mare, evident. Prezintă în citoplasmă
7 incluziuni cristal-like, de aceea sunt denumite și „celule cristaloid”.

Caracterele morfologice ale categoriilor și tipurilor de hemocite identificate pe frotiurile
9 prelevate au fost analizate pe baza datelor de morfometrie arhivate. Pentru fiecare probă s-
au evaluat trei frotiuri și s-a efectuat o medie a celularității. Pe baza studiilor de morfometrie
11 s-au descris subtipuri în cadrul tipurilor majore:

- celulele PL1 (plasmocit rotund-prohemocit) sunt celule mici (4...11 μm diametru),
13 rotunde sau ovale, cu nucleul dens, omogen, rotund, colorat în roșu închis, poziționat central,
mare (3,5...6 μm diametru) în raport cu dimensiunile celulei. Citoplasma este transparentă,
15 omogenă, incoloră sau slab colorată în roz, rareori în violet și foarte rar în albastru; de cele
mai multe ori alcătuiește un inel îngust (0,5...2 μm distanță între marginea nucleului și
17 membrana citoplasmatică) în jurul nucleului. Membrana citoplasmatică poate fi mai mult sau
mai puțin evidentă;

19 - celulele PL2 (plasmocitul intermediar) au de regulă formă intermediară între PL1 și
PL3, dimensiuni mai mari decât PL1 (6...16/5...13 μm), nucleul dens, rotund sau oval, pozițio-
21 nat central sau excentric, și mai mic în raport cu dimensiunile celulei decât cel al celulelor
PL1, având, însă, aproximativ aceleași dimensiuni ca și acestea. Citoplasma are aceleași
23 caractere ca la PL1, dar se găsește în cantitate mult mai mare. La fel, membrana citoplas-
matică poate fi mai mult sau mai puțin evidentă;

25 - celulele PL3 (plasmocitul intermediar/plasmocitul oval) au dimensiuni mari
(6...18/5...14 μm) și formă ovală sau, mai rar, rotundă. Nucleul este dens sau granulat cu gra-
27 nule poliedrice de cromatină, de 0,5...1/0,1...0,5 μm, colorate intens în roșu sau violet, rotund,
oval sau chiar foarte alungit, cu dimensiuni de 4...9/4...7 μm, dispus central în celulă. Cito-
29 plasma este în cantitate mai mare sau mai mică, transparentă, omogenă, foarte colorată în
roz, violet sau rareori în albastru. De regulă, membrana citoplasmatică este bine evidențiată;

31 - celulele PL4 (plasmocitul fusiform) au formă alungită, de fus, frecvent ascuțită la
capete, cu dimensiuni cuprinse între 11...19/3,5...7 μm. Nucleul este întotdeauna granulat
33 și oval, iar citoplasma prezintă întotdeauna granule rotunde sau poliedrice
(0,2...0,7/0,1...5 μm), colorate în roșu intens, violet sau rar în albastru. Restul citoplasmei
35 este transparent și slab colorat în roz sau violet. De regulă, membrana citoplasmatică este
bine evidențiată;

37 - celulele OE (oenocitul) sunt celule în general mari (7...20/6...20 μm, foarte rar cu
dimensiuni mai mari, de până la 26 μm), rotunde sau ușor ovoidale, cu nucleul rotund,
39 excentric, dens, intens colorat în roșu, în general relativ mic (5...8 μm diametru) față de
diametrul celulei. Citoplasma este foarte intens colorată în violet (mult mai intens colorată
41 decât citoplasma plasmocitelor), opacă, densă, fără vacuole sau cu mai multe vacuole
(având tendința de a "umple" citoplasma) ori mai puține, mai mari (2...5 μm diametru) sau
43 mai mici (1...2 μm) (foto nr. 5);

- celulele CO (coagulocitul) sunt celule foarte labile, prezentând, de cele mai multe
45 ori, citoplasma în diferite faze de dezagregare (plină, cu mari și numeroase vacuole) sau de
dispersie, până la a se observa doar nucleul (mic, rotund) fără niciun rest citoplasmatic.
47 Citoplasma este mai slab colorată decât cea a OE.

În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției.	1
Exemplu	
1.1. <i>Diagnosticul de laborator al bolilor la albine</i>	3
Diagnosticul clinic al unor maladii la albine, de tipul celor înscrise în lista B a O.I.E., este completat de diagnosticul paraclinic și diferențial. În ciuda rezultatelor înregistrate de metodele paraclinice în medicina veterinară, domeniul Apiculturii în România se bazează încă pe metode tradiționale. Diagnosticul clinic reprezintă, cel mai adesea, un diagnostic de suspiciune. Diagnosticul de certitudine, inclusiv cel diferențial, se definitivează în laborator pe baza metodelor de microscopie elementară, a testelor serologice și a culturilor pe medii selective. Stabilirea diagnosticului de laborator se pune pe baza semnelor clinice și a examenelor de laborator standardizate (RENAR). Recoltarea probelor în vederea diagnosticării bolilor la albine (agentul etiologic) se efectuează după următoarea schemă:	5
- boli bacteriene: se recoltează probe constituite din fagure cu puiet, căpăcit și/sau necăpăcit (10/15 cm); Clasificarea bolilor bacteriene: LOCA AMERICANĂ/ <i>Paenibacillus larvae larvae</i> , LOCA EUROPEANĂ/ <i>Mellisococcus plutonius</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Paenibacillus alvei</i> , <i>Bacterium eurydice</i> , SALMONELOZA SAU PARATIFOZA ALBINELOR/ <i>Salmonella shotmulleri var. Alvei</i> (Handuroy) sau <i>B. Paratyphi alvei Bahr</i> , SEPTICEMIA/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , SPIROPLASMOZA/ <i>Spiroplasma apis</i> ;	7
- boli micotice: se recoltează probe constituite din faguri cu puiet (10/15 cm) și larve moarte și eliminate de albine pe fundul stupilor sau în afara acestora (reziduuri); Clasificarea bolilor micotice: ASCOSFEROZA/ <i>Ascosfera apis</i> , ASPERGILOZA/ <i>Aspergillus spp.</i> , MELANOZA/ <i>Melanosella mors apis</i> .	9
- boli parazitare externe: se recoltează probe constituite din albine vii, albine ce se târăsc prin fața stupului (50...100) și faguri cu puiet căpăcit, mai ales cu puiet de trântor (10/15 cm); Clasificarea bolilor parazitare externe: VARROOZA/ <i>Varroa destructor</i> , Gândacul mic de stup/ <i>Aethina tumida</i> , BRAULOZA/ <i>Braula ceccae</i> , TRIUNGULINOZA/ <i>Meloe variegatus</i> și <i>Meloe proscarabeus</i> , SENOTAINIOZA/ <i>Senotainia tricuspis</i> , TROPILAEAPSOZA/ <i>Tropilaelaps spp.</i> ;	11
- boli parazitare interne: se recoltează probe constituite din albine vii sau muribunde (50...100), iar la sfârșitul iernării se recoltează și albine de pe fundul stupului; Clasificarea bolilor parazitare interne: AMOEBIOZA/ <i>Malpighamoeba mellificae</i> , NOSEMOZA/ <i>Nosema sp</i> , ACARAPIOZA/ <i>Acarapis woodi</i> ;	13
- suspiciuni de intoxicații (cu substanțe chimice, medicamente sau alimente): se recoltează albine vii, moarte sau muribunde (200...300), fagure cu puiet, precum și bucăți de faguri ce vor conține polen și miere; pentru intoxicația cronică se recoltează albine, faguri ce conțin polen și miere recent introdusă în faguri; Clasificarea intoxicațiilor: medicamentoase, alimentare (de cules) și chimice;	15
- suspiciuni de boli virotice: se recoltează albine vii și bucăți de fagure cu puiet afectat și neafectat. Diagnosticul se stabilește din probă reprezentată de fagure cu puiet căpăcit cu semne clinice de boală.	17
Diagnosticul clasic (bacterioscopic, bacteriologic, micologic) și examenul microscopic direct al albinelor (conform O.I.E) implică pregătirea probelor pe etape prin tehnici de lucru variate, și anume: Tehnica de disecție a mătcilor, Tehnica de disecție a albinelor. Tehnica de macerare a albinelor, Tehnica de trituare și centrifugare a albinelor, Tehnica de colorare a albinelor, Tehnica frotiului intestinului mijlociu al albinelor adulte, Examenul bacterioscopic, Examenul bacteriologic, Examenul histopatologic pentru diagnosticarea paraliziei cronice, Metode imunologice: Metoda flotației, Metoda spălării, Examinarea cu ajutorul foliei lipicioase, Examinarea fundului stupului prin utilizarea capcanelor, Tehnici de analiză citomorfologică a hemolimfei, Tehnica frotiului (Metoda Gram), Tehnica frotiului (Metoda de colorare cu verde de Malachit) și Tehnica frotiului (Metoda Giemsa).	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

1 Am considerat clasificarea lui Van Steenkiste's (1988) mai potrivită decât altele
2 pentru specia *Apis mellifera carpatica* (răspândită în sud-estul Europei). Conform acestui
3 sistem de clasificare, examinarea frotiurilor din hemolimfă, colorate Giemsa, a evidențiat
4 prezența diferitelor tipuri de hemocite (mai ales PL1 și PL3), precum și elemente de corp
5 gras (uneori chiar întrepătrunzându-se). În structura acestor fragmente de corp gras (probabil
6 antrenate în hemolimfă prin manopera de extragere a acestora) am observat structuri sferice
7 mari (30...50 μm diametru), colorate în roșu sau în violet palid, în interiorul cărora s-au
8 evidențiat "insule" mai dense și mai intens colorate. Acestea seamănă cu nucleul celulelor
9 grase din corpul gras, dar, spre deosebire de acestea, sunt libere de citoplasmă și prezintă
10 "insule", aspect descris și de Sorescu (1998), care a emis ipoteza că acestea ar constitui
11 "centre de formare a hemocitelor".

12 De asemenea, am constatat că GR + OE se multiplică (și) prin diviziune mitotică (au
13 fost observate celule cu doi nuclei situați la poli, dar și câte două celule foarte apropiate, cu
14 formă complementară, de semicerc, și cu nuclei aflați la marginile apropiate ale celulelor),
15 în timp ce PL3 pare să se multiplice prin diviziune amitotică (prin "strangulare" mediană).

16 1.2. Alte metode utilizate în evaluarea stării de sănătate a familiei de albine

17 Evaluarea stării de sănătate a familiilor de albine se realizează în mod curent în baza
18 unor metode clinice și paraclinice care vizează descrierea unor modificări în aspectul
19 stupului și structura familiei de albine, precum și decelarea agentului patogen și stabilirea
20 gradului de afectare a coloniilor de albine în cazul situațiilor patologice.

21 Albinele pot fi ținta a numeroase maladii infecțioase, parazitare sau toxice. Unele
22 dintre acestea sunt responsabile de decimări în masă ale familiilor de albine, și figurează la
23 Oficiul Internațional al Epizootiilor (O.I.E) pe lista B. Francezii le-au denumit și maladii
24 contagioase renumite (MRC), și au inițiat un sistem de vigență în programele de profilaxie.

25 Diagnosticul clinic al unor afecțiuni de tipul celor înscrise în lista B a O.I.E. este
26 completat de diagnosticul paraclinic și diferențial. Diagnosticul clinic reprezintă cel mai
27 adesea un diagnostic de suspiciune. Diagnosticul de certitudine, inclusiv cel diferențial, se
28 definitivează în laborator pe baza metodelor de microscopie elementară, a testelor serologice
29 și culturilor bacteriene și fungice pe medii selective (PLA, MYPGP agar, BHIT agar, CSA,
30 Bailey și Collins agar).

31 În Anglia, Laboratorul Central de Cercetări din Cadrul Unității Naționale a Mierii a
32 inițiat un Program de Cercetare în domeniul dezvoltării unor noi tehnici de diagnostic,
33 denumit "Studii preliminare asupra unor noi metode de depistare a agenților patogeni ai
albinelor melifere". Prezentul brevet se înscrie în această linie de dezvoltare.

Metodă de evaluare a stării de sănătate a coloniilor de albine, caracterizată prin aceea că se recoltează hemolimfa cu ajutorul unui tub capilar, în condiții de igienă, și se determină valorile a 13 markeri biochimici, care au valorile de referință încadrate între următoarele limite: GLU = 47,2...572,9 mg/dl; ALP = 0,7...178 UI/l; GPT = 3...404 UI/l; GOT = 12...496 UI/l; Ca = 0,1...16,28 mg/dl; CPK = 6,9...544 UI/l; Cre = 0,1...76 mg/dl; GGT = 0,9...135 UI/l; Mg = 0,1...4,1 mg/dl; Tpro = 4,0...5,51 mg/dl; TG = 10...317 mg/dl; UA = 1,1...26 mg/dl; BUN = 2...49,2 mg/dl, parametri care definesc starea de sănătate a coloniei de albine la momentul respectiv, precum și semnalizarea prezenței sau absenței mecanismelor de apărare imunologică a albinelor.	3 5 7 9 11
---	------------------------

