



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01005

(22) Data de depozit: 22.10.2010

(41) Data publicării cererii:
30.08.2012 BOPI nr. 8/2012

(71) Solicitant:
• 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. 16, BL. 28,
SC. 2, ET. 1, AP. 50, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CĂUȚIA 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;
• TUDORNICULAE, 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. 03, SC. 3, AP. 128, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BUTU MARIAN, STR. DREPTĂȚII NR. 10,
BL. 03, SC. 3, AP. 128, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DIACONĂSCU 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;
• IONITĂ MARIANA,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 105,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(54) MARKERI BIOLOGICI, SPECIFICI, DIN COMPOZIȚIA
HEMOLIMFEI, APLICAȚI ÎN MONITORIZAREA STĂRII DE
SĂNĂTATE A COLONIILOR DE ALBINE

(57) Rezumat:

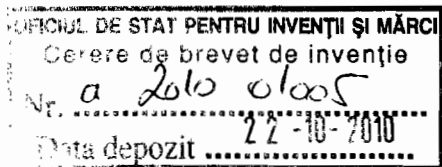
Prezenta invenție se referă la un procedeu de evaluare a stării de sănătate a familiilor de albine în sezonul activ și cel inactiv. Procedeu constă în utilizarea unor markeri biochimici, care sunt evidențiați din hemolimfă prin metode clasice de examinare biochimice, după ce hemolimfa este recoltată în condiții de igienă, cu

ajutorul unui tub capilar, valorile markerilor definind starea de sănătate a familiei de albine, la momentul respectiv.

Revendicări: 1

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).





CAPITOLUL I - DESCRIERE

1.1. Scurtă descriere a metodologiei

Prezentul brevet se referă la definirea unor markeri biochimici și celulari aflați în compoziția hemolimfei la albine, ca indicatori specifici ai stării de sănătate a acestora și ca markeri de monitorizare a diferitelor stări patologice și de stress apărute la nivelul coloniilor de albine.

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

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

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

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

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

Vitelogenul este proteina specifică organismelor femele și reprezintă 80% din întreaga încărcătură proteică la măci și 35% la albinele doici.

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

Hormonii din compoziția hemolimfei sunt reprezentați de hormonul juvenil HJ-III și de Makysteron A. HJ-III are nivel ridicat la stadiile larvare incipiente, scade apoi către 0 la larve,

ȘAPCALIU AGRIPINA - icda	RĂDOI ION - usamv	BĂDIC ELENA LUIZA - ush
MATEESCU CRISTINA - icda	POPA VASILE VIOREL - usamv	BUTU ALINA - incsbd
SAVU VASILICĂ - icda	MITREA IOAN LIVIU - usamv	BUTU MARIAN - incsbd
SICEANU ADRIAN - icda	PREDOI ȘTEFANIA - usamv	TUDOR NICULAE - usamv
CĂUȚIA ELIZA - icda	MATEI MARIOARA - usamv	LEAU TRAIAN - usamv
PAVEL CRENGUȚA - icda	MILEA FLORENTIN - usamv	PĂUNESCU ILEANA - usamv
MILITARU IOANA - icda	NEGOIȚĂ CARMEN - usamv	TUDOR POLIANA - usamv
MAGDICI MARIA - icda	ROMAN MIHAELA - icda	IONITA MARIANA - usamv
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS - icda		

crește la prepupe și scade din nou către 0 la pupe. El variază, deasemeni, în diferite faze de activitate și influențează comportamentul albinelor lucrătoare.

Elementele figurate - hemocitele prezintă morfologie și funcții diferite, fiind descrise mai multe tipuri cu denumiri ce variază după diferiți autori (Chauvin R.1968, Van Steenkistés 1988, I. Sorescu 1998, Zakaria M.E., 2007)

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. Aceasta abordare face obiectul prezentului brevet.

Prezentul brevet definește ca markeri specifici 13 constante biochimice ale hemolimfei: fosfataza alcalină ALP (UI/l), alanin amino transferaza GPT/ALT (UI/l), aspartat amino transferaza GOT/AST (UI/l), calciul total Ca (mg/dl), creatininfosfokinaza CPK (UI/l), creatinina Cre (mg/dl), gamma glutamil transpeptidaza GGT (UI/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).

Pentru evaluarea markerilor biochimici, s-a recoltat hemolimfă 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 μl/probă analizată/determinare și respectiv 800-1200 μl/probă analizată/determinare, prin biochimie umedă.

Graficul recoltarilor 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 sanatoase	activ- albine sanatoase	Apiclimator	activ- albine bolnave	activ- albine sanatoase	inactiv- albine sanatoase
Nr. probe recoltate	110	60	20	10	30	30
Cantitate hemolimfă recoltată/probă	800-1200 μl	200-600 μl	200-600 μl	200-600 μl	15-60 μl/probă	15-60 μl/probă
Nr. familii de albine	5	5	5	5	5	5
Nr. albine/ probă	5-80	5-80	5-80	5-80	5	5

ȘAPCALIU AGRIPINA - icda	RĂDOI ION - usamv	BĂDIC ELENA LUIZA - ush
MATEESCU CRISTINA - icda	POPA VASILE V IOREL - usamv	BUTU ALINA - incsbd
SAVU VASILICA - icda	MITREA IOAN LIVIU - usamv	BUTU MARIAN - incsbd
SICEANU ADRIAN - icda	PREDOI ȘTEFANIA - usamv	TUDOR NICULAE - usamv
CĂUJA ELIZA - icda	MATEI MARIOARA - usamv	LEAU TRAIAN - usamv
PAVEL CRENGUȚA - icda	MILEA FLORENTIN - usamv	PĂUNESCU ILEANA - usamv
MILITARU IOANA - icda	NEGOIȚĂ CARMEN - usamv	TUDOR POLIANA - usamv
MAGDICI MARIA - icda	ROMAN MIHAELA - icda	IONITA MARIANA - usamv
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS - icda		

	(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 μl de hemolimfă/probă/sezon activ sau 45-80 μl/probă/sezon inactiv, prelevată de la 5-80 albine/lot, prelucrată în paralel prin 3 metode:

Fracții de 15-60 μl 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 μl 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 μl ce s-au etalat pe lamă, fiind realizate frotiuri colorate după tehnica Giemsa modificată (preparate fixe).

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 :

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:

1. *granulocite bazofile* (cu granulații numeroase colorate în albastru pal);
2. *granulocite acidofile* (granulații mai puține, roșu intens, de talie mică);
3. *granulocite neutrofile* (granulații mai rare, roz-bej)
4. *granulocite cu granule optic-vide*;

II. Hialinocite – celule de talie variată cu citoplasma bozofilă, divizate în 5 subtipuri:

1. *hialinocite de talie mare*, cu citoplasmă hialină;
2. *hialinocite de talie mică*, cu citoplasmă hialină, nucleu voluminos, roșu-violet, situat central, cu o lizieră de citoplasmă bleu;
3. *hialinocite de talie mare cu 1 sau 2 nucleu*, ce dezvoltă pseudopode lungi, fine;
4. *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);
5. *hialinocite de formă neregulată*, cu citoplasmă heterogenă determinată de prezența lizozomilor de talie mare, cu valuri citoplasmatică periferice, pseudopode fine;

ȘAPCALIU AGRIPINA – icda	RĂDOI ION – usamv	BĂDIC ELENA LUIZA – ush
MATEESCU CRISTINA – icda	POPA VASILE V IOREL – usamv	BUTU ALINA – incsbd
SAVU VASILICĂ – icda	MITREA IOAN LIVIU – usamv	BUTU MARIAN – incsbd
SICEANU ADRIAN – icda	PREDOI ȘTEFANIA – usamv	TUDOR NICULAE – usamv
CĂUȚA ELIZA – icda	MATEI MARIOARA – usamv	LEAU TRAIAN – usamv
PAVEL CRENGUȚA – icda	MILEA FLORENTIN – usamv	PAUNESCU ILEANA – usamv
MILITARU IOANA – icda	NEGOIȚĂ CARMEN – usamv	TUDOR POLIANA – usamv
MAGDICI MARIA – icda	ROMAN MIHAELA – icda	IONITA MARIANA – usamv
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS – icda		

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).

Am încercat să identificăm și alte tipuri de leucocite, conform clasificărilor existente în literatură. Astfel, în grupa granulocitelor am descris 3 tipuri morfofuncționale: GH1, GH2 și GH3, iar în grupa celor negranulare sau hialinocite am descris: prohemocite, plasmocite și oenocite.

Hemocite granulare (GH1) - prezintă un aspect polimorf: cu digitații și vezicule picnotice; incluziuni omogene; incluziuni heterogene, dense; incluziuni cu vezicule (fagozomi).

Hemocite granulare (GH2) - 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.

Hemocite granulare (GH3) - sunt polimorfe, cu digitații și vezicule picnotice, citoplasmă cu corpi hialini (granule limpezi); numeroase expansiuni foarte active în hemocel.

GH₁ - sunt similare cu „coagulocitele” deoarece suferă un proces rapid și puternic de transformare pe parcursul regenerării hemolimfei; sunt caracterizate prin trei tipuri de granulații.

GH₂ . Participă la încapsulare prin fagocitoză (plasmocite granulare). Este posibilă legătura între GH2 și GH1 cu transformarea dintr-o formă pură în alta.

Hemocitele negranulare - prohemocite (PRO) sunt mici, cu raport nucleocitoplasmatic crescut, stratul redus de citoplasmă ce înconjoară nucleul este bazofil și slab reactiv la testele citochimice.

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.

Plasmocite (PL) sunt mai mari ca PRO și cu raport nucleocitoplasmatic crescut. Sunt de obicei cu formă perfectă, foarte rar cu mici expansiuni. Uneori au fost alungite. Citoplasma are incluziuni mari (largi) - lamelocite. Ele formează capsulele în jurul corpurilor de incluzie (corpi străini) judecând rolul celulelor GH2. Ele apar în număr crescut când lipsesc GH2.

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

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

Celulele PL1 (plasmocit rotund - prohemocit) sunt celule mici (4-11 μ diametru), rotunde sau ovale, cu nucleul dens, omogen, rotund, colorat în roșu închis, poziționat central, mare (3,5-6 μ diametru) în raport cu dimensiunile celulei. Citoplasma este transparentă, 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 μ distanță între marginea nucleului și membrana

ȘAPCALIU AGRIPINA - icda	RĂDOI ION - usamv	BĂDIC ELENA LUIZA - ush
MATEESCU CRISTINA - icda	POPA VASILE VIOREL - usamv	BUTU ALINA - incsbd
SAVU VASILICĂ - icda	MITREA IOAN LIVIU - usamv	BUTU MARIAN - incsbd
SICEANU ADRIAN - icda	PREDOI ȘTEFANIA - usamv	TUDOR NICULAE - usamv
CĂUȚA ELIZA - icda	MATEI MARIOARA - usamv	LEAU TRAIAN - usamv
PAVEL CRENGUȚA - icda	MILEA FLORENTIN - usamv	PĂUNESCU ILEANA - usamv
MILITARU IOANA - icda	NEGOIȚĂ CARMEN - usamv	TUDOR POLIANA - usamv
MAGDICI MARIA - icda	ROMAN MIHAELA - icda	IONITA MARIANA - usamv
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS - icda		

citoplasmatică) în jurul nucleului. Membrana citoplasmatică poate fi mai mult sau mai puțin evidentă.

Celulele PL2 (plasmocitul intermediar) au de regulă formă intermediară între PL1 și PL3, dimensiuni mai mari decât PL1 (6-16/5-13 μ), nucleul dens, rotund sau oval, poziționat 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 caractere ca la PL1, dar se găsește în cantitate mult mai mare. La fel, membrana citoplasmatică poate fi mai mult sau mai puțin evidentă.

Celulele PL3 (plasmocitul intermediar/plasmocitul oval) au dimensiuni mari (6-18/5-14 μ) și formă ovală sau, mai rar, rotundă. Nucleul este dens sau granulat (cu granule poliedrice de cromatină, de 0,5-1/0,1-0,5 μ , colorate intens în roșu sau violet), rotund, oval sau chiar foarte alungit, cu dimensiuni de 4-9/4-7 μ , dispus central în celulă. Citoplasma 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.

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

Celulele OE (oenocitul) sunt celule în general mari (7-20/6-20 μ , foarte rar cu dimensiuni mai mari, de până la 26 μ), rotunde sau ușor ovoidale, cu nucleul rotund, excentric, dens, intens colorat în roșu, în general relativ mic (5-8 μ diametru) față de diametrul celulei. Citoplasma este foarte intens colorată în violet (mult mai intens colorată 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 μ diametru) sau mai mici (1-2 μ). (Foto nr. 5)

Celulele CO (coagulocitul) sunt celule foarte labile, prezentând, de cele mai multe 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 nici un rest citoplasmatic. Citoplasma este mai slab colorată decât cea a OE.

1.1.1. Diagnosticul de laborator al bolilor la albine

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

ȘAPCALIU AGRIPINA - icda	RĂDOI ION - usamv	BĂDIC ELENA LUIZA - ush
MATEESCU CRISTINA - icda	POPA VASILE VIOREL - usamv	BUTU ALINA - incsbd
SAVU VASILICA - icda	MITREA IOAN LIVIU - usamv	BUTU MARIAN - incsbd
SICEANU ADRIAN - icda	PREDOI ȘTEFANIA - usamv	TUDOR NICULAE - usamv
CĂUȚA ELIZA - icda	MATEI MARIOARA - usamv	LEAU TRAIAN - usamv
PAVEL CRENGUȚA - icda	MILEA FLORENTIN - usamv	PĂUNESCU ILEANA - usamv
MILITARU IOANA - icda	NEGOIȚĂ CARMEN - usamv	TUDOR POLLANA - usamv
MAGDICI MARIA - icda	ROMAN MIHAELA - icda	IONITA MARIANA - usamv
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS - icda		

laborator standardizate (RENAR). Recoltarea probelor în vederea diagnosticării bolilor la albine (agentul etiologic) se efectuează după următoarea schemă:

- **boli bacteriene:** se recoltează probe constituite din fagure cu puiet căpăcit și/sau necăpăcit (10/15 cm); Clasificarea bolilor bacteriene: LOCA AMERICANĂ/ *Paenibacillus larvae larvae*, LOCA EUROPEANĂ/ *Mellisococcus plutonius*, *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus alvei*, *Bacterium eurydice*, SALMONELOZA SAU PARATIFOZA ALBINELOR/ *Salmonella shotmulleri* var. *Alvei* (Handuroy) sau *B. Paratyphi alvei* Bahr, SEPTICEMIA/ *Pseudomonas aeruginosa*, SPIROPLASMOZA/ *Spiroplasma apis*.

- **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/ *Ascosfera apis*, ASPERGILOZA/ *Aspergillus spp.*, MELANOZA/ *Melanosella mors apis*.

- **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/ *Varroa destructor*, ACARAPIOZA/ *Aethina tumida*, BRAULOZA/ *Braula ceccae*, TRIUNGULINOZA/ *Meloe variegatus* și *Meloe proscarabeus*, SENOTAINIOZA/ *Senotainia tricuspis*, TROPILAELOPSOZA/ *Tropilaelaps spp.*

- **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/ *Malpighamoeba mellificae*, NOSEMOZA/ *Nosema sp.*, ACARAPIOZA/ *Acarapis woodi*.

- **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;

- **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

Diagnosticul clasic (bacterioscopic, bacteriologic, micologic) și examenul microscopic direct al albinelor (conform O.I.E) implica 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 triturare 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).

ȘAPCALIU AGRIPINA - icda	RĂDOI ION - usamv	BĂDIC ELENA LUIZA - ush
MATEESCU CRISTINA - icda	POPA VASILE V IORELA - usamv	BUTU ALINA - incsbd
SAVU VASILICA - icda	MITREA IOAN LIVIU - usamv	BUTU MARIAN - incsbd
SICEANU ADRIAN - icda	PREDOI ȘTEFANIA - usamv	TUDOR NICULAE - usamv
CĂUȚA ELIZA - icda	MATEI MARIOARA - usamv	LEAU TRAIAN - usamv
PAVEL CRENGUȚA - icda	MILEA FLORENTIN - usamv	PĂUNESCU ILEANA - usamv
MILITARU IOANA - icda	NEGOIȚĂ CARMEN - usamv	TUDOR POLIANA - usamv
MAGDICI MARIA - icda	ROMAN MIHAELA - icda	IONITA MARIANA - usamv
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS - icda		

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

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

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

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

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

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

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

1.2. Dezavantajele metodologiei clasice

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

ȘAPCALIU AGRIPINA - icda,	RĂDOI ION - usamv	BĂDIC ELENA LUIZA - ush
MATEESCU CRISTINA - icda	POPA VASILE VIOREL - usamv	BUTU ALINA - incsbd
SAVU VASILICA - icda	MITREA IOAN LIVIU - usamv	BUTU MARIAN - incsbd
SICEANU ADRIAN - icda	PREDOI ȘTEFANIA - usamv	TUDOR NICULAE - usamv
CĂUȚA ELIZA - icda	MATEI MARIOARA - usamv	LEAU TRAIAN - usamv
PAVEL CRENGUȚA - icda	MILEA FLORENTIN - usamv	PĂUNESCU ILEANA - usamv
MILITARU IOANA - icda	NEGOIȚĂ CARMEN - usamv	TUDOR POLIANA - usamv
MAGDICI MARIA - icda	ROMAN MIHAELA - icda	IONITA MARIANA - usamv
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS - icda		

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

1.4. Avantajele optimizării examenului clinic prin utilizarea unor markeri biologici din hemolimfă

Plecând de la aceste considerente actualul brevet definește o nouă viziune asupra abordării patologiei familiilor de albine, respectiv optimizarea algoritmului de diagnostic prin integrarea unor noi *parametrii biochimici* ai hemolimfei și *analiza citomorfologică* a populațiilor de hemocite.

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

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

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

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 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 biochimiei și citomorfologiei hemolimfei poate oferi un instrument eficient în completarea diagnosticului.

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 patologice, intoxicații și în stabilirea unor tulburări de metabolism și reprezintă un obiectiv important al analizelor de laborator din hemolimfă.

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 în condiții normale (variații sezoniere, variații în condiții de stress, variații în condiții induse-controlate) și a datelor privind implicarea acestora în mecanismele imune de apărare. La albine, ca la majoritatea nevertebratelor, sistemul imunitar implicat în apărare este sistemul înăscut – un sistem de apărare rapidă și eficace care intervine prin două tipuri de răspunsuri: un răspuns umoral și un răspuns celular. La albine, hemocitele (elementele figurate ale hemolimfei) îndeplinesc rolul primordial în cele două tipuri de răspunsuri.

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 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 sănătate a

ȘAPCALIU AGRIPINA – icda,	RĂDOI ION – usamv	BĂDIC ELENA LUIZA – ush
MATEESCU CRISTINA – icda	POPA VASILE VIORREL – usamv	BUTU ALINA – incsbd
SAVU VASILICĂ – icda	MITREA IOAN LIVIU – usamv	BUTU MARIAN – incsbd
SICEANU ADRIAN – icda	PREDOI ȘTEFANIA – usamv	TUDOR NICULAE – usamv
CĂUȚIA ELIZA – icda	MATEI MARIOARA – usamv	LEAU TRAIAN – usamv
PAVEL CRENGUȚA – icda	MILEA FLORENTIN – usamv	PĂUNESCU ILEANA – usamv
MILITARU IOANA – icda	NEGOIȚĂ CARMEN – usamv	TUDOR POLIANA – usamv
MAGDICI MARIA – icda	ROMAN MIHAELA – icda	IONITA MARIANA – usamv
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS – icda		

albinelor. Am avut în atenție grupele funcționale implicate în mecanismele de apărare și posibilele variante fenotipice pe parcursul acestor procese, cu modularea morfocitometrică.

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

Un alt avantaj pe care îl conferă utilizarea acestor makeri în monitorizarea coloniilor de albine este legat de posibilitatea depistării stărilor de stress și a celor carentiale ce apar 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.

ȘAPCALIU AGRIPINA - icda	RĂDOI ION - usamv	BĂDIC ELENA LUIZA - ush
MATEESCU CRISTINA - icda	POPA VASILE V IOREL - usamv	BUTU ALINA - incsbd
SAVU VASILICA - icda	MITREA IOAN LIVIU - usamv	BUTU MARIAN - incsbd
SICEANU ADRIAN - icda	PREDOI ȘTEFANIA - usamv	TUDOR NICULAE - usamv
CĂUȚIA ELIZA - icda	MATEI MARIOARA - usamv	LEAU TRAIAN - usamv
PAVEL CRENGUȚA - icda	MILEA FLORENTIN - usamv	PAUNESCU ILEANA - usamv
MILITARU IOANA - icda	NEGOIȚĂ CARMEN - usamv	TUDOR POLIANA - usamv
MAGDICI MARIA - icda	ROMAN MIHAELA - icda	IONITA MARIANA - usamv
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS - icda		

CAPITOLUL II – REVENDICARE

Prezentul brevet definește o nouă linie de dezvoltare a metodelor de diagnostic paraclinic a bolilor la albine. El definește noi markeri biochimici și markeri specifici ai stării de sănătate a familiilor de albine pe care îi include algoritmul diagnostic și în monitorizarea familiilor de albine. Markerii biochimici definiți sunt : **(ALP (UI/l) – fosfataza alcalină, GPT/ALT (UI/l) - alanin amino transferaza, GOT/ AST (UI/l) - aspartat amino transferaza, Ca total (mg/dl) – calciu, CPK (UI/l) – creatininfosfokinaza, Cre (mg/dl) – creatinina, GGT (UI/l) - gamma glutamil transpeptidaza, GLU (mg/dl) – glucoza, Mg (mg/dl) – magneziu, T-Pro (g/d) – proteine totale, TG (mg/dl) – trigliceride, UA (mg/dl) – acid uric, BUN – uree (nitrogen ureic).** Markerii celulari includ **2 grupe celulare de baza** (granulocite și hialinocite) din componenta hemocitelor.

- 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.
- Valorile de referință pentru activitatea enzimei fosfataza alcalină (**ALP**) se plasează între limitele **1-90 UI/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.
- Valorile de referință pentru activitatea glutamat alaninaminotransferazei (**GPT**) se situează între **5-600 UI/l**, prezentând scăderi în perioada de maximă activitate, cu minime către sfârșitul sezonului activ și menținând valori mici în ultima parte a sezonului activ.
- Valorile de referință pentru activitatea **GOT** (aspartataminotransferazei) se situează între **10-593 UI/l**, valorilor ridicate de la începutul sezonului activ urmându-le o curbă descendentă, cu o scădere importantă în timpul sezonului activ, până la un minim de **14 UI/l** în perioada de sfârșit de sezon activ, iar după un vârf de activitate de **300 UI/l**, valorile scad foarte semnificativ, sub **40 UI/l**.
- Există un paralelism între graficele activității enzimatică pentru principalele enzime investigate **GOT, GPT, CPK**, ceea ce evaluează o stare normală a funcțiilor metabolice, în principal a celor hepatice și starea de sănătate a coloniilor de albine.
- 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 maxim. Pe ansamblu, homeostazia calciului se caracterizează

ȘAPCALIU AGRIPINA – icda,	RĂDOI ION – usamv	BĂDIC ELENA LUIZA – ush
MATEESCU CRISTINA – icda	POPA VASILE VIOREL – usamv	BUTU ALINA – incsbd
SAVU VASILICA – icda	MITREA IOAN LIVIU – usamv	BUTU MARIAN – incsbd
SICEANU ADRIAN – icda,	PREDOI ȘTEFANIA – usamv	TUDOR NICULAE – usamv
CĂUIA ELIZA – icda	MATEI MARIOARA – usamv	LEAU TRAIAN – usamv
PAVEL CRENGUȚA – icda	MILEA FLORENTIN – usamv	PAUNESCU ILEANA – usamv
MILITARU IOANA – icda	NEGOIȚĂ CARMEN – usamv	TUDOR POLIANA – usamv
MAGDICI MARIA-icda	ROMAN MIHAELA-icda	IONITA MARIANA – usamv
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS-icda		

prin existența unor oscilații relativ modeste față de medie în perioada de activitate maximă, fără căderi ale calciului din hemolimfă.

- Valorile de referință pentru **CPK** (creatinfosfokinazei) sunt cuprinse între 68 UI/l și 40 UI/l, cu oscilații ≥ 400 UI/l în plin sezon activ. La sfârșitul sezonului activ se constată o scădere semnificativă ≤ 40 ori.
- Analiza variației concentrației creatininei (**Cre**) din hemolimfă arată valori între 10,98 mg/dl și 45,95 mg/dl.
- Analiza variației concentrației **GGT** (gammaglutamiltranspeptidaza) înfățișează valori cuprinse între 1,56 UI/l și 24,65 UI/l. Activitatea enzimei GGT se stabilizează la valori relativ mici 5,45-15,58 UI/l, oscilând în jurul mediei, fiind prezente și câteva excepții 2,72 UI/l și respectiv 23,62 UI/l, acestea fiind dependente de cantitatea și calitatea hranei.
- 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.
- 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 hemolimfă albinelor.
- Evoluția valorilor de referință pentru trigliceride (**TG**) este între limitele de 61,78 mg/dl 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.
- 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 vârfurile 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.

ȘAPCALIU AGRIPINA - icda, <i>Șap</i>	RĂDOI ION - usamv <i>Rădoi</i>	BĂDIC ELENA LUIZA - ush <i>Bădic</i>
MATEESCU CRISTINA - icda <i>Mateescu</i>	POPA VASILE VIOREL - usamv <i>Popa</i>	BUTU ALINA - incsbd <i>Butu</i>
SAVU VASILICA - icda <i>Savu</i>	MITREA IOAN LIVIU - usamv <i>Mitrea</i>	BUTU MARIAN - incsbd <i>Butu</i>
SICEANU ADRIAN - icda, <i>Siceanu</i>	PREDOI ȘTEFANIA - usamv <i>Predoi</i>	TUDOR NICULAE - usamv <i>Tudor</i>
CĂUȚIA ELIZA - icda <i>Căuția</i>	MATEI MARIOARA - usamv <i>Matei</i>	LEAU TRAIAN - usamv <i>Leau</i>
PAVEL CRENGUȚA - icda <i>Pavel</i>	MILEA FLORENTIN - usamv <i>Milea</i>	PAUNESCU ILEANA - usamv <i>Paunescu</i>
MILITARU IOANA - icda <i>Militaru</i>	NEGOIȚĂ CARMEN - usamv <i>Negoita</i>	TUDOR POLIANA - usamv <i>Tudor</i>
MAGDICI MARIA - icda <i>Magdici</i>	ROMAN MIHAELA - icda <i>Roman</i>	IONITA MARIANA - usamv <i>Ionita</i>
DIACONESCU MIRCEA DRAGOS - icda <i>Diaconescu</i>		