



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00627**

(22) Data de depozit: **13/10/2022**

(41) Data publicării cererii:  
**30/04/2024** BOPI nr. **4/2024**

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚELE VIETII  
"REGELE MIHAI I" DIN TIMIȘOARA (USV),  
CALEA ARADULUI, NR.119, TIMIȘOARA,  
TM, RO

(72) Inventatori:  
• STANCU CONSTANTIN-ADRIAN,  
STR.ORȘOVA, NR.19, SC.B, ET.III, AP.14,  
TIMIȘOARA, TM, RO;  
• CĂTANĂ NICOLAE, BD.SUDULUI,  
NR.31-33, BL.26, SC.B, ET.I, AP.7,  
TIMIȘOARA, TM, RO;  
• LUCA IASMINA, STR.CAREI, NR.17,  
BL.27, SC.A, ET.IV, AP.17, TIMIȘOARA, TM,  
RO;

• TULCAN CAMELIA,  
STR.SAMUIL ȘAGOVICI, NR.82,  
TIMIȘOARA, TM, RO;  
• MIRCU CĂLIN, STR.PRAGA, NR.37,  
DUMBRĂVIȚA, TM, RO;  
• LUNGU BIANCA- CORNELIA, BD.PETRE  
ȚUȚEA, NR.103, AP.4, DUMBRĂVIȚA, TM,  
RO;  
• PASCA AURELIAN- SORIN, STR.  
POPĂIUȚI, NR.3, BL.C, ET.V, AP.21, IAȘI,  
IS, RO;  
• HUȚU IOAN, STR.GH.LAZĂR, NR.34,  
ET.VIII, AP.69, TIMIȘOARA, TM, RO

(74) Mandatar:  
CABINET DE PROPRIETATE  
INDUSTRIALĂ TUDOR ICLĂNZAN,  
PIAȚA VICTORIEI NR.5, SC.D, AP.2,  
TIMIȘOARA, TM

(54) **TRUSĂ ȘI METODĂ PENTRU DIAGNOSTICAREA RAPIDĂ  
A SINDROMULUI RESPIRATOR REPRODUCTIV PORCIN**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o trusă și o metodă pentru diagnosticarea rapidă a Sindromului Respirator Reproductiv Porcin (PRRS). Trusa, conform invenției, este formată dintr-un ansamblu de compartimente conținând un sistem de recoltare și transport în mediu lichid, lamă microscop, anticorpi monoclonali anti-PRRS și microscop cu lumină ultravioletă. Metoda, conform invenției, constă în etapele: prelevare de la animale vii a probelor de jetaj nazal, fluid oro-nazal pentru efectuarea unui frotiu, respectiv, recoltare de limfonoduli ingvinali de la cadavre pentru efectuarea unor frotiuri din amprente de limfonoduri, depunerea conjugatului cu fluoresceină pe lamelele uscate, cu incubare timp de 1 h la temperatura de 37°C pentru efectuarea imunofluorescenței directe

(IFD), examinarea lamelelor cu microscopul cu lumină ultravioletă, astfel că, în cazul probelor pozitive, celulele infectate cu virusul PRRS au citoplasmă intens fluorescentă, ceea ce permite diagnosticul în faza timpurie a sindromului PRRS.

Revendicări: 3  
Figuri: 2

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).



60

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. .... a 2022 s 627
Data depozit ..... 13-10-2022

1

(1)

## TRUSĂ ȘI METODĂ PENTRU DIAGNOSTICAREA RAPIDĂ A SINDROMULUI RESPIRATOR REPRODUCTIV PORCIN

(2)

Invenția se referă la o trusă și o metodă, destinate diagnosticului precoce, rapid și ieftin al Sindromului Respirator Reproductiv Porcin (PRRS, acronim de la engl. Porcine Reproductive Respiratory Syndrome).

Sindromul reproductiv respirator porcin (PRRS) este o boală cu transmitere virală la porci, care afectează capacitatea de reproducere la scroafe și provoacă pneumonie și mortalitate crescută la animalele tinere. Este o problemă globală care afectează industria suină, iar pierderile economice survenite sunt semnificative. Pentru a combate această boală se recurge la implementarea unor proceduri de biosecuritate și dezvoltarea unor metode de diagnostic fiabile, precise și utilizabile la nivelul fermei. Practic, în diagnosticul PRRS sunt utilizate două categorii de metode: metode care identifică virusul (examene virusologice) și metode care surprind anticorpii în organismul animalelor (examene imunologice).

Indiferent de tipul examinării – virusologice sau imunologice - există multe inconveniente și dezavantaje. Spre exemplu, în cazul **examenelor virusologice** dezavantajul constă în faptul că durează între 10-14 zile și poate fi efectuat numai în laboratoarele de virusologie care funcționează în condiții de biosecuritate de nivel 3, iar în cazul utilizării **tehnicilor de biologie moleculară** sunt necesare dotarea cu echipamente speciale și personal înalt calificat, iar materialele de lucru și kiturile de diagnostic sunt foarte scumpe, motiv pentru care în țara noastră diagnosticarea PRRS nu poate fi realizată decât în Laboratorul Institutului Național de Diagnostic (Fluerașu 2016).

În general, în funcție de scopul diagnosticului și momentul estimat al infecției sunt cunoscute și utilizate mai multe strategii de diagnostic a sindromului respirator reproductiv porcine (PRRS), prin folosirea următoarelor metode care pot fi clasificate astfel:

**I. Metode care permit detectarea virusului.** Aceste metode sunt utilizate pentru: i) detectarea infecției la cel puțin un animal dintr-o fermă (stabilirea prezenței infecției în fermă), ii) determinarea prevalenței unui virus în fermă (calcularea proporției animalelor afectate), iii) confirmarea expunerii la virus sau vaccin (în cazul anchetelor epidemiologice longitudinal - retrospective) sau iv) evaluarea momentului unei infecții (anchete epidemiologice transversale).

Metodele utilizate pentru detectarea virusului sunt:

**1. Reacția în lanț a polimerazei cu transcriptază inversă** sau metoda RT-PCR (acronim de la reverse transcriptase polymerase chain reaction) se efectuează asupra fetușilor atunci când se suspectează transmiterea verticală. Este o metodă rapidă, foarte sensibilă și specifică, utilizată pentru a detecta PRRS-ul din țesuturi (inclusiv ser, spermă, lichide din cavitatea orală, plămâni, ganglioni limfatici, splină și amigdale) și, de asemenea, din probe prelevate din mediu. Procesul presupune extragerea ARN viral din proba biologică, conversia în ADN prin revers transcriptază, amplificarea prin PCR și detectarea ADN-ului amplificat. Dezavantajul metodei RT-PCR este că intervalul de detectare a virusului după infecție diferă atât între țesuturile prelevate, cât și între animale. În plus, sensibilitatea ridicată a RT-PCR poate avea ca efecte obținerea unor rezultate fals pozitive, din cauza contaminării, în timp ce specificitatea primer-ilor poate duce la rezultate fals negative pentru variantele virale cu mutații genetice. Referitor la această metodă, se cunoaște invenția CN103725793A, o metodă de RT-PCR

cantitativ cu fluorescență multiplă pentru detectarea virusului PRRS și aplicarea acesteia.

**2. Metoda imuno-histo-chimică (IHC)** este utilizată împreună cu microscopia pentru a detecta virusul PRRS în țesuturi precum: pulmonii, ganglioni limfatici, timusul, amigdalele, splină și rinichi. De obicei, țesuturile sunt mai întâi fixate cu formol (deși pot fi utilizate și țesuturi proaspete) și apoi marcate cu anticorpi monoclonali care vizează nucleocapsida virală. Acestea sunt vizualizate folosind un anticorp secundar marcat. Metoda IHC are specificitate ridicată (100%), dar o sensibilitate moderată (67%). Acest lucru poate fi, totuși, îmbunătățit prin procesarea țesuturilor în decurs de 48 de ore de la fixare. Sensibilitatea este mai mare în stadiile incipiente ale infecției, dar scade progresiv în fazele ulterioare, cum ar fi la mai mult de 28 de zile post-infecție și, ca urmare, după 90 de zile de la infecție, metoda nu mai este recomandată. Metoda IHC este eficientă pentru identificarea unor virusuri transmise purceilor (transmitere verticală), dar nu este la fel de eficientă pentru variantele virale cu mutații genetice. Costurile ridicate ale kiturilor folosite face ca utilizarea acestei metode să nu fie foarte accesibilă (*Halbur 1995, Manzano 2017, Thanawongnuwech 2003*). În acest sens, se cunosc abordări imuno-histo-chimice cum sunt, de exemplu, cele descrise în invenția US9872898B2 cu titlul compoziții și metode pentru tratarea și prevenirea sindromului reproductiv și respirator porcin.

**3. Metoda colorației directe a anticorpilor fluorescenți** (Fluorescent antibody staining, acronim FA) este o metodă utilizată în mod obișnuit pentru a evalua lavajul bronhoalveolar sau țesutul pulmonar proaspăt/înghețat. Prin această metodă probele de lichid bronho-aleveolar sau țesut sunt marcate cu anticorpi fluorescenți pentru a se vizualiza nucleocapsidele. Acest proces permite identificarea virusului PRRS într-un timp mai redus și mai ieftin decât IHC, dar ca și în cazul IHC, este posibil să nu detecteze variantele virale care au suferit mutații

și să nu fie recomandat în etapele târzii ale infecției. În plus, diagnosticul fals pozitiv este o problemă, din cauza specificității slabe a anticorpului primar sau a colorării de fond ridicate. În acest sens, se cunoaște invenția CN102297969A , o metodă de preparare a reactivului imunofluorescent pentru diagnosticul diferențial al Sindromului Reproductiv Respirator Porc.

**4. Utilizarea benzilor de testare imuno-cromatică** (strips-uri), deși nu sunt încă folosite pe scară largă, acestea au potențialul de a oferi o detectare rapidă și convenabilă a virusului PRRS, fără a fi nevoie de expertiză sau echipamente specializate. Benzile imunocromatice detectează virusul din ser sau din omogenate tisulare. Probele sunt amestecate cu anticorpi monoclonali marcați cu aur care vizează proteine specific virale PRRS, formând complexe proteină-anticorp care sunt capturate pe benzi. Complecșii astfel capturați sunt apoi detectați cu ajutorul unui anticorp secundar marcat. În acest sens, se cunoaște invenția CN102621319B - strips-uri de diagnostic rapid cu aur coloidal pentru a distinge sindromul reproductiv respirator porc clasic (PRRS) de PRRS înalt patogen (HPRRS).

**II. Metode care permit detectarea anticorpilor specifici PRRS.** Detectarea anticorpilor specifici PRRS din ser (cel mai frecvent), salivă sau transudat este cea mai comună metodă de diagnosticare a PRRS, dar se efectuează doar după apariția anticorpilor în organism. Unele metode, deși foarte specifice, solicită timp îndelungat și resurse majore (de exemplu, testul de imunoperoxidază monostrat), altele produc rezultate greu de interpretat (neutralizarea virusului), iar altele nu pot decela între anticorpii generați de o infecție nouă sau de cei vaccinali. Metodele care permit detectarea anticorpilor sunt:

**1. ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay) - este cel mai utilizat test având o specificitate de până la 99,9% și o sensibilitate de până la 98,8%. Cu toate că testul ELISA este rapid și convenabil la preț, are serioase dezavantaje generate

de faptul că răspunsurile imune sunt variabile de la un animal la altul, iar nivelurile de anticorpi detectate nu reflectă neapărat virulența agentului. În plus, răspunsurile fals pozitive, anticorpii materni și anticorpii din furaje pot genera perturbații ale rezultatelor. În acest sens, se poate exemplifica invenția US20120040335A1, care presupune identificarea virusului sindromului reproductiv și respirator porcin.

**2. Testul imunologic cu microsferă fluorescente** (fluorescent microsphere immunoassay, acronim FMIA) este o versiune a testului ELISA care utilizează microsferă fluorescente diferențiat colorate pentru a capta anticorpi anti-PRRS, care sunt apoi marcați cu anticorpi secundari marcați fluorescent. Tehnica permite detectarea simultană a mai multor anticorpi diferiți într-o singură probă mică. FMIA efectuată pe probe de ser are o sensibilitate de 98% și o specificitate de 95% și, dacă se efectuează pe fluide din cavitatea orală, sensibilitatea este de peste 92% și specificitatea de 95% (mult peste alte metode care utilizează lichidele orale). De asemenea, testul este mai sensibil decât ELISA pentru detectarea anticorpilor în cazul infecțiilor precoce. În acest sens, se cunoaște invenția US20130210654A1 reprezentată de un test multiplex pentru moleculele imune care descrie metode pentru detectarea a cel puțin șapte citokine într-o probă biologică provenită de la suine. Invenția furnizează seturi de analize multiplex care permit detectarea și cuantificarea citokinelor și utilizarea metodelor și truselor pentru diagnostic, prognostic și monitorizarea imunității.

**3. Testul de fluorescență indirectă a anticorpilor** (indirect fluorescent antibody - acronim IFA) utilizează anticorpi secundari marcați fluorescent pentru a detecta anticorpii anti-PRRS. IFA are o specificitate bună, dar sensibilitatea depinde de mulți factori, inclusiv de tipurile de celule utilizate pentru captarea anticorpilor, protocoalele de laborator și profilul antigenic al anticorpilor anti-PRRS. În mod obișnuit, IFA se face după ELISA pentru a confirma rezultatele fals pozitive, dar poate fi utilizată și în programele de supraveghere care folosesc probe

din cavitatea bucală sau transudate musculare. În acest sens, se cunoaște invenția US10088481B2 care descrie metode pentru detectarea directă a virusurilor intracelulare cu ajutorul anticorpilor fluorescenți.

4. **Utilizarea benzilor de testare imuno-cromatică** (strips-uri) care, așa cum este cazul detectării virusului, permit detectarea anticorpilor specifici ai virusului PRRS (folosindu-se proteina virală N). Strips-urile sunt ieftine, rapide și ușor de utilizat, fără a fi nevoie de echipamente scumpe și au o sensibilitate de 93% și o specificitate de 98%, dar permit diagnosticul după apariția anticorpilor. În acest sens se cunoaște invenția CN108845149A care descrie benzile de testare de tip duplex cu aur coloidal și metoda de preparare a acestora, detectarea simultană a virusului sindromului reproductiv respirator porcine și a virusului pestei porcine.

Se cunoaște invenția US5698203A care se referă la tulpinile europene ale virusului PRRS, care sunt atenuate și prezintă un model de reacție caracteristic cu doi anticorpi monoclonali împotriva PRRSV de tip sălbatic. Invenția se referă, de asemenea, la vaccinuri pentru protecția porcilor împotriva PRRS, la anticorpi monoclonali reactivi cu virusul PRRS și la anticorpi monoclonali specifici nereactivi cu tulpinile atenuate.

Se cunoaște invenția US2007004006A1 care furnizează metode, dispozitive și truse pentru detectarea unei clase de virus al sindromului reproductiv și respirator porcine (PRRS) sau PRRSV, într-un fluid biologic. Invenția se bazează parțial pe un agent care leagă proteina nucleocapsidă (N) a PRRSV. Agentul poate fi un anticorp care leagă proteina N cu specificitate. Sunt furnizate compoziții și dispozitive care cuprind agentul de legare, precum și metode de utilizare a acestuia. De asemenea, sunt furnizate metode de pregătire a dispozitivelor și truselor pentru practicarea metodelor.

De asemenea, se cunoaște invenția RO130705A0 care se referă la un dispozitiv portabil și la o metodă de crio-includere a unui material tisular pentru

examinare microscopică, utilizată în special în spitale și în laboratoarele de cercetare. Conform invenției, dispozitivul constă dintr-o cuvă care, împreună cu o carcasă cu capac, determină un spațiu interior pentru o cameră de congelare care este izolată termic cu un strat izolator în interiorul cuvei, în cuvă fiind montat un bloc metalic cu căldură specifică și conductivitate termică crescută, de regulă din aluminiu, prevăzut pe o parte cu adâncituri conice având rolul de a modela cavități pentru includerea țesuturilor în masa de gheață.

Metodele și instrumentele mai sus prezentate prezintă dezavantajul că sunt în general costisitoare, unele sunt nespecifice sau puțin sensibile, necesită dotări și un personal înalt calificat, iar rezultatele lor nu sunt rapid disponibile.

(4)

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față constă în realizarea unei truse și a unei metode care să permită diagnosticarea rapidă și ieftină, fără personal înalt calificat, a Sindromului Respirator Reproductiv Porcin (PRRS).

(5)

Trusa și metoda pentru diagnosticarea rapidă a sindromului PRRS, conform invenției, elimină dezavantajele de mai sus prin aceea că este realizată în felul următor:

- **O trusă pentru diagnosticarea rapidă** a sindromului PRRS alcătuită din:
  - a. O valiză (servietă) din material rezistent, cu interiorul compartimentat, cu posibilitate de răcire și încălzire a unor compartimente la priza de la mașină.



- b. Un compartiment rece în care se păstrează un recipient cu anticorpi monoclonali anti-PRRS (*Anti PRRSV monoclonal antibody labelled with fluorescein isothiocyanate*);
- c. Un compartiment pentru sistemele de prelevare și transport în mediu lichid a jetajului oro-nazal, în care un bețișor steril este transportat într-o eprubetă sterilă, prevăzută cu dop și niște recipiente sterile pentru probe de țesut în cazul prelevării probelor de țesut a limfonodurilor de la cadavre, care dacă nu se execută pe loc se pot introduce în compartimentul răcit al trusei;
- d. Un compartiment pentru sticlărie, compartiment destinat depozitării unor lame și a unor lamele de sticlă pentru frotiu/microscop, a unui pahar și a unor pipete;
- e. Un compartiment pentru niște micropipete de 1-100  $\mu$ l și 100-1000  $\mu$ l;
- f. Un compartiment pentru niște recipiente cu lichide de maximum 100 ml pentru: 1. apă bidistilată, 2. soluție PBS, 3. soluție Blue Evans, 4. alcool etilic și 5. acetonă;
- g. Un compartiment pentru microscop cu lumină ultravioletă – obiectiv 20X;
- h. Un compartiment pentru microincubație pe termen scurt – de regulă, o oră la temperatura de 37°C;
- i. Un compartiment tip buzunar pentru hârtie absorbantă/hârtie de filtru;
- j. Un compartiment tip buzunar pentru documente și fișe de observație d.p.d.v. al examenului necropsic.

**- O metodă pentru diagnosticarea rapidă a sindromului PRRS** care se realizează în următoarele etape:

- degresarea lamelor de sticlă cu alcool etilic;

- etalarea probelor: din jetaj (o picătură) sau amprentă pe lamă din limfonoduri;
- uscarea lamelor cu materialul patologic etalat;
- fixarea lamelor cu materialul patologic în acetonă, timp de 15 minute;
- uscarea lamelor, timp de două ore;
- spălarea lamelor, cu soluție PBS-Blue Evans;
- uscarea finală a lamelor;
- depunerea conjugatului cu fluoresceină pe lamele uscate (0,1  $\mu$ l);
- incubarea lamelor timp de o oră la temperatura de 37°C;
- examinarea lamelor la microscopul cu lumină ultravioletă;
- interpretarea și analiza rezultatelor

(6)

Trusa și metoda pentru diagnosticarea rapidă a sindromului PRRS conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- permit diagnosticul atât de la animale în viață, cât și de la cele supuse examenului morfolopatologic efectuat în cadrul medicinei legale;
- permit diagnosticul în faza timpurie a bolii, ceea ce asigură inițierea rapidă a măsurilor de profilaxie și combatere a tehnopatiei reproductive PRSS; în asociere cu epidemiologia analitică (identificarea, cuantificarea și ierarhizarea factorilor de risc), diagnosticul ultrarapid și nesofisticat permite gestionarea aspectelor tehnopate;
- are o durată de executare foarte scăzută comparativ cu examenele imunohistochimice, metodele virusologice care necesită 7, respectiv 10-14 zile;

- nu necesită condiții speciale de lucru – spre exemplu metoda examenului virusologic solicită condiții de biosecuritate extrem de stricte – nivel de biosecuritate 3.
- nu necesită echipamente speciale cum sunt cele necesare pentru metodele de biologie moleculară reprezentată de RT-PCR, care solicită dotare cu echipamente speciale și personal înalt calificat și utilizează materialele și consumabile extrem de scumpe.
- kitul de diagnostic este ieftin, de câteva ori mai ieftin decât kitul pentru examenul imunohistochimic;
- trusa poate fi utilizată de către tehnicieni veterinari - personal care nu are înaltă specializare și/sau calificare;
- trusa și metoda se pot aplica pe scară largă.

(7)

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu figurile 1 și 2 , care reprezintă:

Fig.1- Schematizarea posibilităților de diagnostic a sindromului PRRS la suine.

Fig.2 - Vedere de ansamblu a alcătuirii și compartimentărilor trusei care permite diagnosticarea rapidă a sindromului PRRS.

(8)

Trusa și metoda pentru diagnosticarea rapidă a sindromului PRRS conform invenției este realizată dintr-un ansamblu (sistem de recoltare și transport în mediu lichid, lamă, microscop, anticorpi monoclonali anti-PRRS și microscop cu lumină

ultravioletă) care, aplicând metoda, permite obținerea unui diagnostic cu un grad mare de specificitate și sensibilitate într-un timp foarte redus.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față constă în diagnosticul PRSS prin combinarea reacției de imunofluorescență directă cu examinarea la microscopul cu lumină ultravioletă; ca urmare are loc **detectarea bolii de la debut până la exitus** prin juxtapunerea imunofluorescenței directe cu microscopia în ultraviolet, care permite atât identificarea virusului, cât și a antigenelor virale.

**Trusa și metoda pentru diagnosticarea rapidă a sindromului respirator reproductiv porcine** permite decelarea timpurie a entității morbide PRSS, aspect deosebit de util în gestionarea tehnopatiilor reproductive din industria porcului, prin combinarea reacției de **imunofluorescență directă** cu **examinarea la microscopul cu lumină ultravioletă**; juxtapunerea imunofluorescenței directe cu microscopia în ultraviolet permite identificarea virusului - respectiv a antigenelor virale cantonate în celulele limfonodurilor.

Trusa conține toate instrumentele, echipamentele, materialele și reactivii necesari stabilirii diagnosticului la nivelul fermei/halei în care sunt suspiciuni ale bolii, oferind posibilitatea prelevării probelor atât de la animalele vii cât și de la cadavre. Practic, utilizarea **trusei și metodei pentru diagnosticarea rapidă a sindromului respirator reproductiv porcine** are la bază **reacția de imunofluorescență directă**, cu **examinarea la microscopul cu lumină ultravioletă** pentru evidențierea antigenelor. În acest sens, se pot recolta/utiliza două tipuri de probe:

- i) de la animalele vii se recoltează **jetaj nazal** sau **fluid oro-nazal**, din care se efectuează un frotiu;
- ii) de la cadavrele supuse examenului necropsic se recoltează noduli limfatici pentru efectuarea unor **frotiuri din amprente de limfonoduri**.

Trusa cu următoarele compartimente, buzunare și kit, se compune din următoarele compartimente și piese, cu următoarele caracteristici:

- a. O valiză (geantă) din material rezistent, cu interiorul compartimentat, cu posibilitate de răcire și încălzire a unor compartimente la priza de la mașină.
- b. Un compartiment rece pentru un recipient cu gheață carbonică în care se păstrează recipientul cu anticorpi monoclonali anti-PRRS (Anti PRRSV monoclonal antibody labelled with fluorescein isothiocyanate);
- c. Un compartiment pentru sistemele de prelevare 1. sistem de prelevare a jetajului oro-nazal cu bețișor steril, amplasat într-o eprubetă sterilă, prevăzută cu dop. În situația în care proba trebuie transportată, se pot utiliza dispozitive de prelevare și transport în mediu lichid și 2. recipiente sterile pentru probe de țesut – în cazul prelevării nodulilor limfatici de la cadavre. Dacă examinarea nu se execută pe loc, probele de țesut se pot introduce în compartimentul răcit al trusei;
- d. Un compartiment pentru niște sticlărie: este compartimentul destinat pentru depozitarea/transportul unor lame și lamele de sticlă pentru frotiu/microscop, a unui pahar și a pipetelor;
- e. Un compartiment pentru niște micropipete de 1-100  $\mu$ l și 100-1000  $\mu$ l;
- f. Un compartiment pentru niște recipiente cu lichide (recipiente de maximum 100 ml pentru: 1. apă bidistilată, 2. soluție PBS, 3. soluție Blue Evans, 4. alcool etilic și 5. acetonă);
- g. Un compartiment pentru un microscop cu lumină ultravioletă – obiectiv 20X;
- h. Un compartiment cald pentru microincubație pe termen scurt – de regulă, o oră la temperatura de 37°C;
- i. Un buzunar pentru niște hârtie absorbantă/hârtie de filtru;

- j. Un buzunar pentru niște documente/acte și fișe de observație/examen necropsic.

### **Materiale, mod de lucru**

Pentru detecția antigenelor virale se prelevează jetaj de la animalele vii sau limfonoduli ingvinali, cu leziuni anatomopatologice macroscopice caracteristice sindromului PRRS, de la cadavre. Limfonodurile (care conțin ARN-ul viral) sunt utilizate pentru efectuarea amprentelor pe lame de sticlă în vederea efectuării imunofluorescenței directe (IFD).

Antigenul viral nucleocapsidal este detectat cu ajutorul anticorpilor monoclonali anti PRRSV (de exemplu, PRRSV monoclonal antibody labelled with fluorescein isothiocyanate – BIO 268, furnizat de BIO-X Diagnostics).

Frotiurile obținute sunt citite cu ajutorul microscopului cu lumină ultravioletă.

#### **1. Materialele necesare:**

- proba biologică prelevată pe mediu lichid sau nodul limfatic;
- anticorpi monoclonali Anti PRRSV marcați cu fluoresceină isotiocianat;
- sticlăria necesară (pahare, lame, lamele, pipete);
- micropipete cu volum reglabil (1μl - 1000μl);
- apă bidistilată;
- soluție PBS;
- soluție Blue Evans;
- alcool etilic;
- acetonă;
- hârtie absorbantă.

#### **2. Aparatura necesară:**

- compartiment rece din trusa de diagnostic 4°C (sau frigider);

- compartiment cald/termostat la 37°C;
- microscop cu lumină ultravioletă

### 3. Etapele de lucru și citirea frotiurilor:

- degresarea lamelor de sticlă cu alcool etilic;
- etalarea probelor din jetaj (o picătură) sau din limfonoduri prin amprentă pe lame;
- uscarea lamelor cu materialul patologic etalat;
- fixarea lamelor cu materialul patologic în acetonă, timp de 15 minute;
- uscarea lamelor;
- spălarea lamelor, cu soluție PBS-Blue Evans;
- uscarea finală a lamelor;
- depunerea conjugatului cu fluoresceină pe lamele uscate (0,1 μl);
- incubarea lamelor timp de o oră la temperatura de 37°C;
- examinarea lamelor la microscopul cu lumină ultravioletă.

**În cazul probelor pozitive**, în câmpul microscopic se observă limfocite cu dimensiuni diferite care pot fi interpretate ca limfocite mici, mijlocii, mari și plasmocite, a căror citoplasmă este intens fluorescentă datorită faptului că antigenele virale sunt cuplate cu anticorpii marcați cu fluoresceină. Mărimea limfocitelor cu citoplasmă fluorescentă se apreciază după conturul celular evident, nucleii bine individualizați, iar raportul între nucleu și citoplasmă a fost aproximativ egal (limfocite mici și mijlocii). Limfocitele mari au un aspect asemănător, plasmocitele au o formă alungită cu nucleu oval, cu citoplasma dominantă în raport cu nucleul. Citoplasma celulelor infectate cu virusul PRRS are un aspect galben-verzui strălucitor.

**În cazul probei negative** (în absența virusului), nu se observă limfocite cu citoplasma fluorescentă.

## REVENDICĂRI

1. Trusa pentru diagnosticarea rapidă a sindromului PRRS **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din:

- a. O valiză (geantă) din material rezistent cu interiorul compartimentat, cu posibilitate de răcire și încălzire a unor compartimente la priza de curent de la mașină.
- b. Un compartiment rece în care se păstrează un recipient cu anticorpi monoclonali anti-PRRS;
- c. Un compartiment pentru sistemele de prelevare și transport în mediu lichid a jetajului oro-nazal în care un bețișor steril este transportat într-o eprubetă sterilă și niște recipiente sterile pentru probe de țesut în cazul prelevării, probelor de țesut a nodulilor limfatici de la cadavre, care dacă nu se execută pe loc se pot introduce în compartimentul răcit al trusei;
- d. Un compartiment pentru niște sticlărie, compartiment destinat pentru depozitarea unor lame și a unor lamele de sticlă pentru frotiu/microscop, a unui pahar și a unor pipete;
- e. Un compartiment pentru niște micropipete de 1-100  $\mu$ l și 100-1000  $\mu$ l;
- f. Un compartiment pentru niște recipiente cu lichide de maximum 100 ml pentru: 1. apă bidistilată, 2. soluție PBS, 3. soluție Blue Evans, 4. alcool etilic și 5. acetonă;
- g. Un compartiment pentru un microscop cu lumină ultravioletă – obiectiv 20X;
- h. Un compartiment cald pentru microincubație pe termen scurt – de regulă, o oră la temperatura de 37°C;



- i. Un compartiment tip buzunar pentru niște hârtie absorbantă/hârtie de filtru;
- j. Un compartiment tip buzunar pentru niște documente și fișe de observație / examen necropsic.

2. Metoda pentru diagnosticarea rapidă a sindromului PRRS, **caracterizată prin aceea că** se realizează în următoarele etape:

- degresarea lamelor de sticlă cu alcool etilic;
- etalarea probelor din jetaj (o picătură) sau din limfonoduri prin amprentă pe lame;
- uscarea lamelor cu materialul patologic etalat;
- fixarea lamelor cu materialul patologic în acetonă, timp de 15 minute;
- uscarea lamelor;
- spălarea lamelor cu soluție PBS-Blue Evans;
- uscarea finală a lamelor;
- depunerea conjugatului cu fluoresceină pe lamele uscate (0,1 μl);
- incubarea lamelor timp de o oră la temperatura de 37°C;
- examinarea lamelor la microscopul cu lumină ultravioletă;
- interpretarea și analiza rezultatelor.

3. Metoda pentru diagnosticarea rapidă a sindromului PRRS conform revendicării 2 **caracterizată prin aceea că** interpretarea rezultatelor se face în felul următor:

- **În cazul probelor pozitive**, în câmpul microscopic,
  - o se observă limfocite cu dimensiuni diferite, care pot fi interpretate ca limfocite mici, mijlocii, mari și plasmocite, a căror citoplasmă este intens fluorescentă datorită faptului că antigenele virale sunt cuplate cu anticorpii marcați cu fluoresceină,

- mărimea limfocitelor cu citoplasmă fluorescentă se apreciază după conturul celular evident, nucleii bine individualizați, iar raportul între nucleu și citoplasmă a fost aproximativ egal (limfocite mici și mijlocii), limfocitele mari au un aspect asemănător, plasmocitele au o formă alungită cu nucleu oval, cu citoplasma dominantă în raport cu nucleul, iar citoplasma celulelor infectate cu virusul PRRS are un aspect galben-verzui strălucitor.
- **În cazul probei negative** (în absența virusului) nu se observă limfocite cu citoplasma fluorescentă.

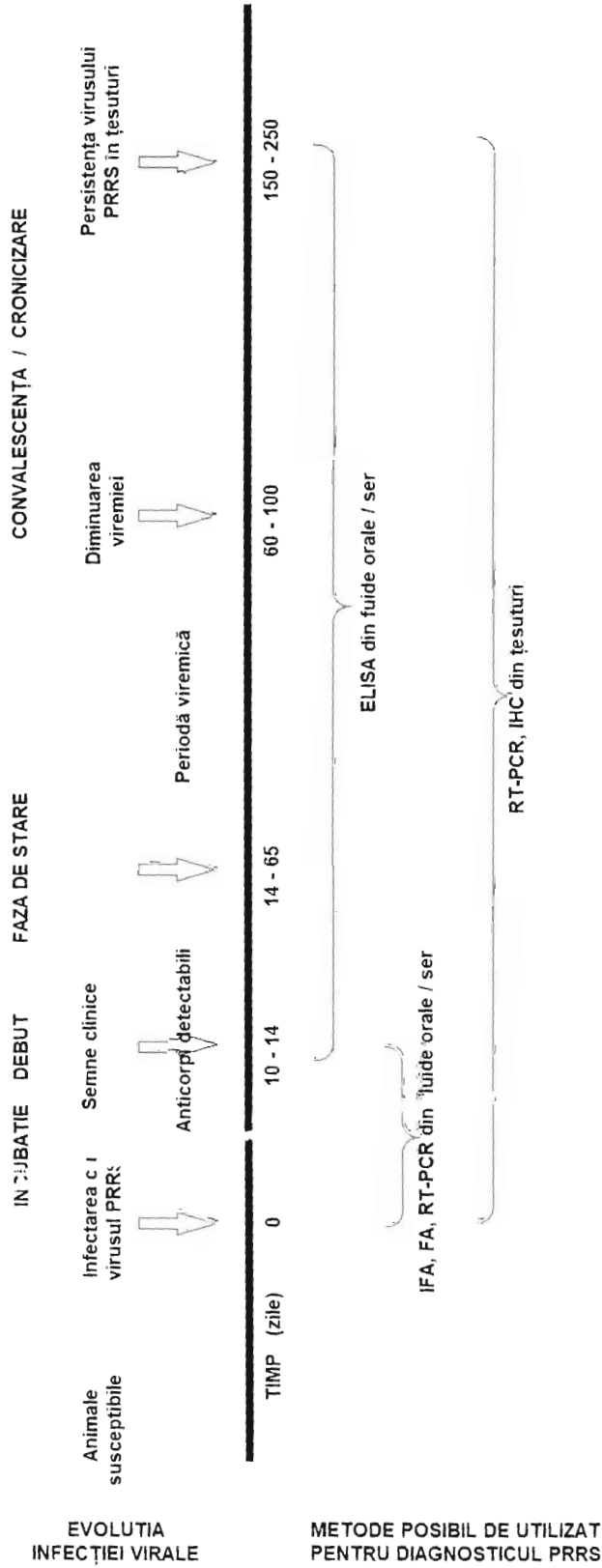
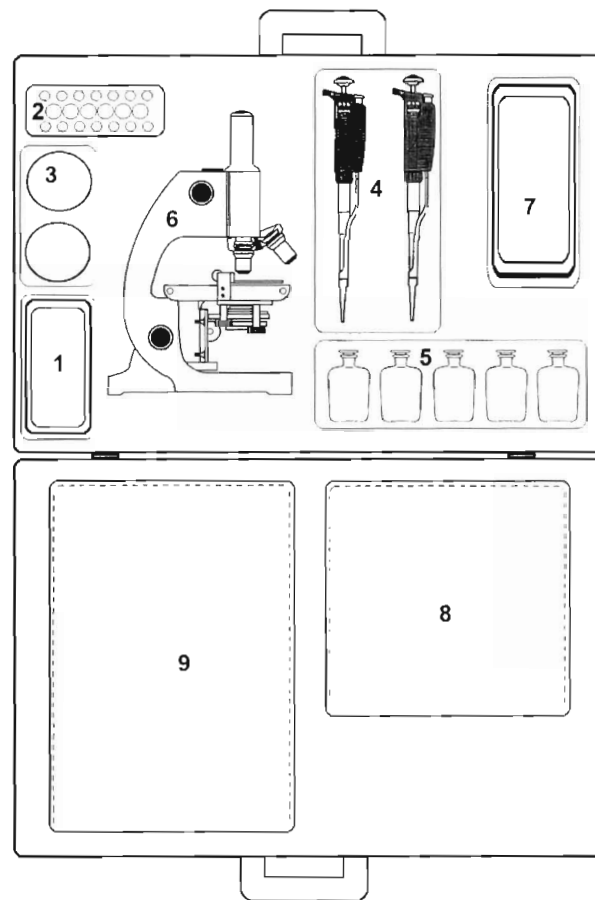


Fig.1. Schematiz: area posibilităților de diagnostic a sindromului PRRS la suine.

43



1. compartiment termoizolat rece, pentru anticorpi și probe
2. compartiment pentru sistemele de prelevare (lichid sau tisular)
3. compartiment pentru sticlărie
4. compartiment pentru micropipete
5. compartiment pentru recipiente cu lichide
6. compartiment pentru microscop cu lumină ultravioletă
7. compartiment termoizolat cald, pentru incubație de scurtă durată
8. buzunar pentru consumabile (hârtie absorbantă)
9. buzunar pentru acte/documente

Fig.2. Vedere de ansamblu a alcătuirii și compartimentărilor trusei care permite diagnosticarea rapidă a sindromului PRRS.