

Invenția se referă la medicina veterinară, și anume la o metodă de diagnostic al leucozei bovine.

Sunt cunoscute diverse metode de diagnostic care permit veridic de a aprecia starea de infectare a animalelor cu virusul leucozei bovine (VLB) și starea de evaluare a bolii (leucoza), și de a aplica diverse tactici de luptă.

Astfel, se cunoaște un procedeu de depistare a animalelor bolnave de leucoza bovină, care prevede efectuarea testului de imunodifuzie în gel de agar, depistarea probelor seropozitive și testarea serologică suplimentară a probelor seropozitive diluate și în cazul depistării anticorpilor specifici la antigenul virusului leucozei bovine cu titrul 1:8 și mai mare, animalele sunt apreciate ca fiind bolnave de leucoză [1]. Însă, acest procedeu nu este suficient de obiectiv, deoarece nu există date privind modificările hematologice caracteristice dezvoltării leucozei la animalele infectate cu VLB, totodată titrul anticorpilor anti-VLB nu este asociat cu dezvoltarea modificărilor leucemice caracteristice (celulare) în corpul animalelor infectate, iar în marea majoritate a cazurilor este la nivelul de +, 1: 2, 1: 4 și mai rar mai mare. Mai mult, utilizarea acestei metode pentru diagnosticul leucozei este semnificativ mai costisitoare (de 2-3 ori), sporind în mod nejustificat costurile titrării fiecărui ser seropozitiv.

Este cunoscută metoda de diagnostic al leucozei efectuată în 2 etape de timp. La început se apreciază situația epizootică la leucoză într-o anumită populație de animale (localitate rurală, gospodărie, raion), în baza rezultatelor testărilor serologice a serului sangvin cu antigen la leucoză, în scopul depistării animalelor infectate cu virusul leucozei bovine (VLB). Apoi, repetat sunt colectate mostre de sânge, doar de la animalele infectate cu VLB pentru testarea hematologică și confirmarea dezvoltării și a severității evaluării la ele a leucozei. Rezultatele cercetărilor hematologice permit obiectiv de determinat modul de întreținere (separat de vacile sănătoase) și durata timpului folosirii în producere (mulsului) a vacilor, apoi rebutarea pentru sacrificare a animalelor bolnave [2].

Dezavantajele tacticii existente de diagnosticare și de dirijare a procesului de eradicare a leucozei sunt:

- pierderea de timp dublu și a surselor financiare pentru căutarea animalelor infectate cu VLB pentru colectarea sângelui de la acestea și cercetarea repetată serologică;
- pierderea informației (întâmplător sau intenționat) despre animalele infectate și încălcarea cerințelor testării lor sau prezentarea mostrelor de sânge de la animalele sănătoase;
- rebutarea pentru sacrificare, intenționată, a unui număr esențial (mii) de animale, infectate cu VLB, fără testarea lor anticipată hematologică pentru confirmarea la ele a dezvoltării bolii (leucoză) care cauzează anual în Republica Moldova un prejudiciu economic în sumă de 80-100 mln lei.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unei metode de diagnosticare a leucozei bovine mai rapide, mai precise și mai economice.

Problema se rezolvă prin metoda care include prelevarea probelor de sânge cu anticoagulant, precipitarea celulelor sangvine și separarea plasmelor prin păstrarea în frigider la temperatura de 7°C timp de 4 ore sau centrifugarea timp de 2 min la 1200 rot/min, examinarea serologică a plasmelor în testul de imunodifuzie în gel de agar (AGID), înregistrarea rezultatelor peste 24-36 de ore, efectuarea examinării hematologice a probelor seropozitive, și în cazul rezultatelor care confirmă prezența bolii, se stabilește diagnosticul de leucoză bovină.

Rezultatul constă în efectuarea examinării serologice și hematologice dintr-o probă comună de sânge cu anticoagulant și reducerea timpului de stabilire a diagnosticului.

Metoda propusă permite, timp de 24-48 ore, stabilirea diagnosticului final și a statutului epizootic al tuturor animalelor infectate cu VLB din populația studiată.

Mostrele de sânge, inițial, trebuie păstrate în frigider la temperatura de 7°C pe parcursul a 4 ore sau supuse centrifugării timp de 2 minute la 1200 rotații/min, pentru sedimentarea celulelor sangvine și separarea plasmelor de culoare galben-pal, care va fi cercetată în AGID cu antigen la leucoză. Rezultatele AGID vor fi înregistrate peste 24 ore.

Mostrele care vor indica reacție pozitivă vor fi considerate infectate cu VLB și imediat vor fi testate hematologic.

Rezultatul obținut, în comparație cu cea mai apropiată soluție, constă în:

- diminuarea timpului pentru identificarea nu numai a animalelor infectate cu VLB, dar și diagnosticarea printre ele a celor bolnave de leucoză și rebutarea justificată și la timp a lor pentru sacrificare;
- reducerea cheltuielilor materiale și pierderilor economice cauzate de boală și optimizarea tacticii și a termenului de eradicare și combatere sigură a leucozei bovine.

Invenția este ilustrată în figurile 1-2, care prezintă:

Fig. 1 - testarea serologică (1) și hematologică (2) din mostra comună de sânge;

Fig. 2 - reacția AGID.

În calitate de materiale pentru inițierea lucrului asupra metodei propuse au servit 4 loturi de sânge colectate de la animale cu diferit statut epizootic privitor la leucoza bovină și de deservire a animalelor, din diferite raioane (tabelul 1).

Tabelul 1
Nivelul de infectare cu VLB în diferite teritorii

Nr. teritoriului	Cercetate în AGID, cap.	Depistate			
		seropozitive		seronegative	
		cap	%	cap	%
1	275	67	24,3	208	75,7
2	107	5	4,7	102	95,3
3	302	53	17,5	249	82,5
4	142	10	7,0	132	97,0
Total	826	35	16,3	691	83,7

Peste 30-45 de zile a fost efectuată testarea serologică repetată (de control) în AGID a mostrelor de sânge, doar de la animale VLB infectate (tab. 2) colectate cu anticoagulant (Trilon B 10%).

Tabelul 2
Rezultatele testării în AGID a mostrelor de sânge cu anticoagulant colectat de la animale seropozitive (4 localități)

Rezultatele AGID	Numărul de mostre de sânge studiate				
	67	5	53	10	135
pozitiv	24	5	45	9	83
negativ	43	0	8	1	52
%, AGID+	35,8	100,0	84,9	90,0	61,5

Analizând datele tabelului 2, a fost constatat că, din 135 mostre de sânge colectate, pentru testarea hematologică la leucoză, din diferite localități ale țării, doar în 83 (61,5%) din ele a fost confirmat repetat statutul de pozitive în AGID (infectate). Această situație confirmă despre reala și serioasa încălcare a cerințelor eticii profesionale la numerotarea (evidența) în timpul colectării și întocmirea actelor de însoțire la mostrele de sânge trimise la laborator.

Rezultatele obținute dau teme pentru efectuarea testărilor comparative (paralele) a mostrelor de sânge de la unele și aceleași animale, colectate în eprubete fără anticoagulant (ser) și cu EDTA 10%- plasma și determinarea coincidenței acestor rezultate (tab. 3).

Reieșind din datele expuse în tabelul 3, mostrele serului și plasmei sangvine, obținute de la aceleași animale, au reacționat la fel în AGID - după 24-72 ore, din 54 de mostre 45 au fost negative (-), doar 9 (16,6%) au fost pozitive (+) - au format o linie clară de precipitare (fig. 2) în gelul de agar cu antigen la leucoză, care confirmă infectarea cu VLB a animalelor de la care a fost obținut acest sânge.

Tabelul 3
Coincidența rezultatelor testării serologice în AGID a serului sangvin și plasmei sângelui, obținute de la aceleași animale

Mostrele studiate		Rezultatele pozitive AGID (peste ore)								
		Numărul de mostre	18		24		48		72	
			cap	%	cap	%	cap	%	cap	%
Serul sangvin		54	8	14,8	9	16,6	9	16,6	9	16,6
Plasma după sedimentare (ore)	2 ^x	54	7	12,9	9	16,6	9	16,6	9	16,6
	18 ^x	54	8	14,8	9	16,6	9	16,6	9	16,6

Notă: 2^x, 18^x- timpul (ore) de menținere a mostrelor de sânge cu anticoagulant la temperatura de 5°C în frigider.

Rezultatele din tabelul 3 confirmă posibilitatea efectuării din aceeași mostră de sânge prelevată cu anticoagulant a testului serologic, iar pentru probele care au reacționat la leucoză pozitiv în AGID - a testului hematologic la leucoză.

Pentru a confirma acestea, anticipat a fost studiată rezistența (stabilitatea) componentelor celulare a sângelui de bovine, la păstrarea mostrelor de sânge cu anticoagulant în frigider la temperatura de 7°C, timp de 24, 48, 72, 96 ore (tabelul 4).

Analiza rezultatelor prezentate în tabelul 4 (mostrele 1-5) permite de a face o concluzie obiectivă privind stabilitatea compoziției celulare a sângelui de bovine pe parcursul a 24-96 de ore de depozitare a mostrelor de sânge în frigider la o temperatură de 7°C.

Nu au fost constatate distrugereri, modificări ale numărului de celule, deformări ale elementelor figurate ale sângelui în această perioadă, ceea ce a asigurat o diagnoză obiectivă.

Tabelul 4
Indicatorii elementelor celulare din sângele bovinelor, după păstrarea mostrelor la frigider

Timpul după colectarea mostrei (ore)	Numărul total de leucocite (mii/ μ l)	Formula leucocitară (%)								Titrul de anticorpi VLB	Diagnoza
		Neutrofile			Limfocite		Monocite	Euzinofile	Bazofile		
		t.	n.	s.	%	Numărul total					
Mostra 1, vacă 6 ani											
24	10,5	-	7	19	65	6,8	3	12	1	1:4	Reacția leuchimoidală De repetat hematologic
48	9,7	-	8	16	61	5,9	4	9	2		
72	10,3	-	2	15	66	6,08	2	15	-		
96	9,5	-	7	16	63	6,0	1	13	-		
Mostra 2, vacă 10 ani											
24	28,7	2	3	8	85	24,4	-	2	-	1:4	Bolnavă- limfocitoză
48	26,4	3	5	12	80	21,1	-	1	-		
72	25,0	3	3	8	82	20,5	1	3	-		
96	26,0	1	2	9	83	21,6	1	4	-		
Mostra 3, vacă 8 ani											
24	48,2	-	1	7	91	43,8	-	1	-	1:2	Bolnavă- limfocitoză
48	46,1	-	-	8	90	41,5	-	2	-		
72	46,7	-	1	7	90	42,0	-	1	-		
96	46,0	-	-	10	88	40,5	1	-	-		
Mostra 4, vacă 6 ani											
24	8,8	-	8	13	60	5,3	2	17	-	1:4	Parazitoză De repetat hematologic
48	8,9	1	7	17	59	5,2	-	16	-		
72	8,5	-	5	14	63	5,3	-	19	-		
96	8,6	2	6	13	60	5,2	1	18	-		
Mostra 5, vacă 6 ani											
24	11,8	-	5	11	67	7,9	-	17	-	+	Suspectă limfocitoză De repetat hematologic
48	10,0	-	5	10	70	7,0	-	15	-		
72	10,5	2	7	13	67	7,0	1	10	-		
96	11,1	1	9	11	63	7,0	-	16	-		

Pentru o confirmare mai convingătoare a stabilității componentelor celulare ale sângelui în perioada de păstrare a mostrelor de sânge în frigider, timp de 24-96 ore, au fost efectuate teste hematologice similare a mostrelor de sânge colectate de la oameni, în laboratorul clinic al Spitalului Republican al Ministerului Sănătății al R.Moldova. Testul hematologic a fost efectuat cu analizorul automat „Tyfmex” 21 NK (Franța). Fiecare dintre cele 5 mostre de sânge au fost examinate în 5 reprize (după 2, 24, 48, 72 și 96 ore) de la colectarea și păstrarea lor în frigider la temperatura de 7°C. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 5 (mostra 1-5).

Tabelul 5
Indicatorii elementelor celulare ale sângelui obținut de la oameni (în perioada de păstrare a mostrelor în frigider, la temperatura 7°C, timp de 96 ore)

Timpul după colectarea mostrei, ore	Numărul total de leucocite (mii/ μ l)	Formula leucocitară,%							Eritrocite mln/ μ l	Hemoglobina (%)	Trombocite (mmc)
		Neutrofile		Limfocite		Monocite	Euzinofile	Bazofile			
		n/s	s	%	Numărul total						
Mostra 1											
2	4,3	6	45	40	1,7	7	2	-	3,8	115	167
24	4,2	16	36	38	1,6	8	2	-	3,8	115	168
48	4,1	31	25	29	1,1	12	3	-	3,8	116	169
72	4,2	46	12	32	1,3	8	2	-	3,7	116	169
96	4,1	38	12	36	1,5	12	2	-	3,7	116	163

Mostra 2											
2	5,6	5	69	28	1,6	7	1	-	4,6	139	265
24	5,8	19	51	21	1,2	7	2	-	4,6	137	257
48	5,7	19	46	20	1,1	11	4	-	4,5	138	267
72	5,7	45	30	17	1,0	5	3	-	4,5	138	267
96	5,6	46	26	20	1,1	4	4	-	4,5	139	260
Mostra 3											
2	7,1	12	54	26	1,8	7	1	0	2,99	74	111
24	8,0	12	52	16	1,3	12	1	0	3,01	63	110
48	8,3	21	50	11	0,9	17	0	0	3,04	60	112
72	8,0	15	44	30	2,4	11	0	0	2,99	54	111
96	8,1	14	54	22	1,8	8	2	0	3,03	45	111
Mostra 4											
2	5,0	8	48	31	1,55	6	6	1	5,11	270	148
24	4,6	17	40	27	1,2	6	10	0	5,12	275	147
48	4,9	31	26	26	1,3	9	8	0	5,05	270	147
72	4,9	37	15	30	1,5	11	5	2	5,03	280	147
96	4,8	38	9	31	1,5	13	7	2	5,09	286	149
Mostra 5											
2	4,5	8	49	34	1,5	7	2	0	4,42	178	142
24	4,4	19	27	34	1,5	7	10	2	4,44	174	141
48	4,7	33	35	18	0,9	8	6	0	4,92	181	143
72	4,6	46	13	30	1,4	6	5	0	4,91	172	141
96	4,5	37	15	38	1,7	7	3	0	4,90	174	143

Aceste proprietăți naturale ale sângelui au fost folosite pentru elaborarea noii metode de testare concomitentă serologică și hematologică a leucozei bovine, efectuată din proba comună de sânge cu anticoagulant, care dă posibilitatea de a stabili diagnosticul definitiv, în baza căreia poate fi efectuată rebutarea justificată pentru sacrificare a animalelor infectate cu VLB, la etapa inițială de dezvoltare la ele a leucozei.

Exemplu de realizare a invenției

Metoda se efectuează cu respectarea următoarelor cerințe:

- colectarea mostrelor de sânge cu anticoagulantul EDTA (Trilon-B), în eprubete cu vacuum sau în eprubete obișnuite de sticlă cu 1-2 picături de soluție EDTA 10% pentru 1 ml de sânge, din vena jugulară;
- pe fiecare eprubetă, până la colectarea mostrei trebuie să fie indicat numărul de ordine și numărul animalului. Date analogice trebuie să fie indicate în actele de însoțire a mostrelor transmise la laborator. În cazul când datele de pe eprubete nu coincid cu cele din actul de însoțire (sau a întregului lot de mostre), acestea nu se supun înregistrării și testării, recomandându-se colectarea repetată a mostrelor de sânge;
- mostrele de sânge trebuie expediate la laborator în ziua prelevării, păstrate în frigider la temperatura de 7°C, timp de 3-4 ore (până la separarea plasmei de culoare galben-pal) sau supuse centrifugării timp de 2 minute la 1200 rotații/min, apoi se testează în AGID;
- mostrele de sânge nu trebuie expuse înghețului sau încălzirii;
- testarea în AGID în godeurile cu gel agar cu plasma sângelui și antigenul leucozei se efectuează după instrucțiunea anexată setului de diagnostic AGID.

Pentru cercetările în AGID este necesar:

- set pentru diagnosticarea leucozei bovine compus din:
 - antigenul VLB (glicoproteina virală internă-51)-liofilizat;
 - ser pozitiv VLB (ser ce conține anticorpi precipitați de VLB)- liofilizat;
 - diluant - apă deionizată sau dibistilată-sterilă, cu pH 6-8;
 - Agar Noble;
- Plăci Petri din plastic sau sticlă cu diametru 85mm;
- Matrița cu godeul central și cele 6 godeuri periferice, cu diametrul de 6 mm;
- Baie tip Bain-Marie (56°C)
- Micropipete cu vârful (20-100pl)
- Cilindru gradat.

Pregătirea pentru reacția AGID

Pregătirea gelului de agar

Într-o colbă de 2 l se introduc 250 ml de apă distilată + 44,2 ml HCl + 85 g NaCl (tamponul TRIS), se adaugă 9 g de agar Noble și apă distilată până la marcajul de 1000 ml, după care se fierbe amestecul la Bain-Marie până la

dizolvarea completă a agarului. Agarul topit se răcește până la temperatura de 56°C , se toarnă în plăci Petri câte 15 ml, care sunt lăsate la temperatura camerei pentru o oră.

În agarul răcit, cu ajutorul Matriței se decupează godeul, iar cu ajutorul pompei cu vacuum se curăță de restul gelului de agar.

Modul de executare al testului: Antigenul este plasat în godeul central și serul pozitiv, alternativ, în godeurile 1 și 4 periferice. Probele de ser de testat sunt plasate în celelalte 4 godeuri. Volumul reagenților este de 40 pl în godeul central (antigen) și de 40 pl în godeuri periferice. Plăcile sunt menținute la temperatura camerei (20-25°C) în atmosfera umedă. După 24-36 ore reacțiile de precipitare sunt examinate sub fascicul îngust de lumină, contra unui fon negru.

Reacția AGID este apreciată pozitivă, iar animalele infectate cu VLB la constatarea liniei de precipitare clare, în gelul de agar, între godeul cu antigen și godeul cu plasmă sangvină cercetată (fig. 2, godeul 4). În lipsa liniei de precipitare - AGID negativ (fig. 2, godeul 3), iar animalul este liber de VLB. Reacția poate fi slab pozitivă - linia de precipitare este scurtă și nu este clară.

Doar mostrele de sânge unde AGID este pozitiv imediat (timp de 1-2 ore) sunt testate hematologic. Sângele din aceste eprubete este agitat uniform și se determină:

- 1) Numărul total de leucocite în 1 mkl de sânge (în camera Goreaev);
- 2) Se calculează formula leucocitară și se determină numărul absolut de limfocite în 1 μl de sânge și conform „cheii leucozice”, în cazul obținerii unor valori care confirmă prezența bolii, se stabilește diagnosticul de leucoză bovină sau aceste animale sunt transferate în grupul cu risc sporit pentru testarea hematologică suplimentară (tabelul 6).

Tabelul 6

Numărul de leucocite și limfocite (în 1 μl de sânge) la bovine sănătoase, suspecte la îmbolnăvire și bolnave de leucoză („cheia leucozică”)

Vârsta bovinelor, ani	Animale			
	sănătoase		suspecte la îmbolnăvire	bolnave
	Numărul de leucocite	% limfocite	Numărul absolut de limfocite	Numărul absolut de limfocite
	în 1 μl de sânge			
1-2	până la 12000	până la 75	9000 - 11000	mai mult de 11000
2-4	până la 11000	până la 70	8000 - 10000	mai mult de 10000
4-6	până la 10000	până la 65	6500 - 9000	mai mult de 9000
6 și mai mult	până la 9000	până la 60	5500 - 8000	mai mult de 8000

Metoda propusă pentru diagnosticul leucozei bovine permite de a identifica în timp util și obiectiv animalele bolnave în primele etape ale dezvoltării procesului de leucoză, ceea ce ajută la prevenirea răspândirii acesteia. În același timp, reduce, în comparație cu metodologia existentă de diagnostic, costurile de re-căutare și prelevare de probe de sânge și transportul acestora la laboratorul veterinar.

În prezent, testul pe care îl propunem pentru diagnosticul accelerat și fezabil din punct de vedere economic al leucozei bovine, este introdus în mod eficient pe teritoriul R. Moldova pentru a eradica această boală infecțioasă bovină.