

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI, ROMÂNIA
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE

TEZĂ DE DOCTORAT

Doctorand,
MIHAELA-ANCA DASCĂLU

Conducător de doctorat,
Prof.univ.dr. ELENA VELESCU

2017

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI, ROMÂNIA
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE

TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI PRIVIND METODOLOGIA DE DIAGNOSTIC, SUPRAVEGHERE, PREVENIRE ȘI CONTROL ÎN RABIE

Doctorand,
MIHAELA-ANCA DASCĂLU

Conducător de doctorat,
Prof.univ.dr. ELENA VELESCU

2017

„ION IONESCU DE LA BRAD” UNIVERSITY OF AGRICULTURE
SCIENCES AND VETERINARY MEDICINE OF IAȘI, ROMANIA
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL FIELD VETERINARY MEDICINE
SPECIALTY INFECTIOUS DISEASES

PhD THESIS

RESEARCH REGARDING DIAGNOSTIC METHODOLOGY, SURVEILLANCE, PREVENTION AND CONTROL IN RABIES

PhD student,
MIHAELA-ANCA DASCĂLU

PhD coordinator,
Prof.univ.dr. ELENA VELESCU

2017

CUPRINS

LISTA DE ABREVIERI		9
INTRODUCERE		10
REZUMAT		14
PARTEA I STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII		
CAPITOLUL I	PARTICULARITĂȚI PRIVIND ETIOLOGIA ȘI CARACTERELE EPIDEMIOLOGICE ALE INFECȚIEI RABICE LA ANIMALE	29
	1.1 Etiologie	29
	1.1.1 Structura și morfologia virusului rabic	29
	1.1.2 Proteinele virusului rabic	29
	1.1.3 Ciclul de infecție și replicare al virusului rabic	30
	1.1.4 Încadrarea genetică	31
	1.1.5 Rezistența virusului rabic la factorii fizici și chimici	33
	1.2 Caractere epidemiologice	34
	1.2.1 Receptivitate	34
	1.2.2 Surse de infecție și căi de transmitere	35
	1.2.3 Dinamica bolii	35
CAPITOLUL II	ACTUALIZĂRI PRIVIND METODOLOGIA DE DIAGNOSTIC, SUPRAVEGHERE, CONTROL ȘI ERADICARE A RABIEI LA ANIMALE	39
	2.1 Metodologia de diagnostic	39
	2.2 Metodologia de supraveghere, control și eradicare a rabiei la animale	44
PARTEA A-II-A CONTRIBUȚII PERSONALE		
CAPITOLUL III	SCOPUL, OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT ȘI CADRUL ORGANIZATORIC AL CERCETĂRIILOR	48
CAPITOLUL IV	INVESTIGAȚII EPIDEMIOLOGICE PRIVIND PREZENȚA ȘI PREVALENȚA INFECȚIEI RABICE LA ANIMALE ÎN NORD-ESTUL ROMÂNIEI ȘI ÎN REPUBLICA MOLDOVA	52
	4.1 Investigații epidemiologice privind prezența și prevalența infecției rabice la animale în nord-estul României	52
	4.2 Investigații epidemiologice privind prezența și prevalența infecției rabice la animale în Republica Moldova	69
CAPITOLUL V	CONFIRMAREA DIAGNOSTICULUI DE RABIE PRIN METODA DE IMUNOFLUORESCENȚĂ DIRECTĂ	74
	5.1 Materiale și metode	75
	5.2 Rezultate	80
	5.3 Discuții	83
	5.4 Concluzii parțiale	84
CAPITOLUL VI	CONFIRMAREA DIAGNOSTICULUI DE RABIE PRIN TEHNICA DE IZOLARE A VIRUSULUI RABIC PE CULTURI CELULARE (RTCIT)	85
	6.1. Izolarea virusului rabic pe culturi celulare (RTCIT) ca metodă alternativă pentru proba biologică pe șoareci	86

	6.1.1 Materiale și metode	86
	6.1.2 Rezultate și discuții	89
	6.1.3 Concluzii parțiale	90
	6.2 Studiu comparativ privind sensibilitatea a două linii celulare distincte N2a și BHK-21 utilizate pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare	91
	6.2.1 Materiale și metode	91
	6.2.2 Rezultate și discuții	92
	6.2.3 Concluzii parțiale	95
	6.3. Utilizarea a două sisteme diferite pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare	95
	6.3.1 Materiale și metode	95
	6.3.2 Rezultate	97
	6.3.3 Discuții	99
	6.3.4 Concluzii parțiale	100
CAPITOLUL VII	CONFIRMAREA DIAGNOSTICULUI DE RABIE PRIN TEHNICILE DE BIOLOGIE MOLECULARĂ REAL TIME PCR ȘI RT-PCR CONVENȚIONAL	101
	7.1 Materiale și metode	102
	7.1.1 Extracția ARN	103
	7.1.2 SYBRGreen Real time qRT-PCR	104
	7.1.3 TaqMan Real time RT-PCR	106
	7.1.4 Heminested RT-PCR convențional	107
	7.1.4.1 Amplificarea genei parțiale N a virusului rabic	108
	7.1.4.2 Amplificarea genei complete N a virusului rabic	109
	7.1.5 Electroforeza: migrarea produșilor PCR în gel de agaroză 2%	110
	7.2 Rezultate și discuții	111
	7.2.1 SYBRGreen Real time qRT-PCR	111
	7.2.2 TaqMan Real time qRT-PCR	116
	7.2.3 Heminested RT-PCR convențional	117
	7.2.4 Dozarea concentrației de ARN/ADNc viral	121
	7.3 Concluzii parțiale	122
CAPITOLUL VIII	CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A TULPINILOR DE VIRUS RABIC IZOLATE DIN NORD-ESTUL ROMÂNIEI ȘI DIN REPUBLICA MOLDOVA	123
	8.1 Secvențierea și analiza filogenetică a nucleoproteinei virusului rabic	123
	8.1 Materiale și metode	124
	8.2 Rezultate și discuții	125
	8.3 Concluzii parțiale	138
CAPITOLUL IX	SECVENȚIEREA COMPLETĂ A GENOMULUI VIRUSULUI RABIC	139
	9.1 Materiale și metode	139

	9.2 Rezultate și discuții	142
	9.3 Concluzii parțiale	154
CAPITOLUL X	CERCETĂRI PRIVIND STRATEGIA DE SUPRAVEGHERE ȘI CONTROL A INFECȚIEI RABICE LA ANIMALE ÎN NORD-ESTUL ROMÂNIEI	155
	10.1. Detecția anticorpilor antirabici postvaccinali și determinarea markerului vaccinal - tetraciclina - la vulpi	156
	10.1.1 Materiale și metode	158
	10.1.2 Rezultate	158
	10.1.2.2 Detecția anticorpilor antirabici la vulpi prin intermediul metodei serologice ELISA	163
	10.1.2.3 Determinarea markerului vaccinal – tetraciclina - la vulpi	166
	10.1.3 Discuții	167
	10.1.4 Concluzii parțiale	167
	10.2 Detecția anticorpilor antirabici la mistreți	168
	10.2.1 Materiale și metode	169
	10.2.2 Rezultate	169
	10.2.2.1 Detecția anticorpilor antirabici la mistreți prin intermediul testului ELISA	172
	10.2.2.2 Detecția anticorpilor antirabici la mistreți prin intermediul metodei de referință FAVN	155
	10.2.3 Discuții	156
	10.2.4 Concluzii parțiale	158
CAPITOLUL XI	CONCLUZII FINALE	176
BIBLIOGRAFIE		181
LISTA DE FIGURI		192
LISTA DE TABELE		196
LISTA DE LUCRĂRI		198

CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS		9
INTRODUCTION		10
ABSTRACT		14
FIRST PART CURRENT STATE OF KNOWLEDGE		
CHAPTER I	PARTICULARITIES ON THE ETIOLOGY AND EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE RABIES INFECTION IN ANIMALS	29
	1.1 Etiology	29
	1.1.1 Structure and morphology of rabies virus	29
	1.1.2 Rabies virus proteins	29
	1.1.3 Cycle of infection and replication of rabies virus	30
	1.1.4 Genetic framing	31
	1.1.5 Resistance of rabies virus to physical and chemical factors	33
	1.2 Epidemiology	34
	1.2.1 Receptivity	34
	1.2.2 Sources of infection and transmission pathways	35
	1.2.3 Disease dynamics	35
CHAPTER II	UPDATES REGARDING RABIES DIAGNOSTIC METHODOLOGY, SURVEILLANCE, CONTROL AND ERADICATION IN ANIMALS	39
	2.1 Diagnostic methodology	39
	2.2 Surveillance, control and eradication methodology of rabies in animals	44
SECOND PART PERSONAL CONTRIBUTION		
CHAPTER III	PhD THESIS AIM AND OBJECTIVES AND THE ORGANIZATIONAL FRAMEWORK OF THE RESEARCHES	48
CHAPTER IV	EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS REGARDING THE PRESENCE AND PREVALENCE OF RABIES INFECTION IN ANIMALS IN NORTH-EAST OF ROMANIA AND REPUBLIC OF MOLDOVA	52
	4.1 Epidemiological investigations regarding the presence and prevalence of rabies infection in animals in north-east of Romania	52
	4.2 Epidemiological investigations regarding the presence and prevalence of rabies infection in animals in Republic of Moldova	69
CHAPTER V	RABIES DIAGNOSTIC CONFIRMATION BY DIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST	74
	5.1 Materials and methods	75
	5.2 Results	80
	5.3 Discussions	83
	5.4 Partial conclusions	84
CHAPTER VI	RABIES DIAGNOSTIC CONFIRMATION BY RABIES TISSUE CULTURE INFECTION TEST	85

	6.1. Isolation of rabies virus on cell cultures (RTCIT) as alternative to the Mouse Inoculation Test	86
	6.1.1 Materials and methods	86
	6.1.2 Results and discussions	89
	6.1.3 Partial conclusions	90
	6.2 Comparative study regarding the sensitivity of two different cell lines used for isolation of rabies virus on cell cultures	91
	6.2.1 Materials and methods	91
	6.2.2 Results and discussions	92
	6.2.3 Partial conclusions	95
	6.3. The use of two different systems for the isolation of rabies virus on cell cultures	95
	6.3.1 Materials and methods	95
	6.3.2 Results	97
	6.3.3 Discussions	99
	6.3.4 Partial conclusions	100
CHAPTER VII	RABIES DIAGNOSTIC CONFIRMATION BY REAL TIME PCR AND CONVENTIONAL RT-PCR TECHNIQUES	101
	7.1 Materials and methods	102
	7.1.1 RNA extraction	103
	7.1.2 SYBRGreen Real time qRT-PCR	104
	7.1.3 TaqMan Real time RT-PCR	106
	7.1.4 Heminested conventional RT-PCR	107
	7.1.4.1 Partial N gene amplification of rabies virus	108
	7.1.4.2 Full N gene amplification of rabies virus	109
	7.1.5 Electrophoresis: migration of PCR products into 2% agarose gel	110
	7.2 Results and discussions	111
	7.2.1 SYBRGreen Real time qRT-PCR	111
	7.2.2 TaqMan Real time qRT-PCR	116
	7.2.3 Heminested conventional RT-PCR	117
	7.2.4 cDNA/RNA dosage concentrations	121
	7.3 Partial conclusions	122
CHAPTER VIII	MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RABIES VIRUS STRAINS FROM NORTH-EAST OF ROMANIA AND REPUBLIC OF MOLDOVA	123
	8.1 Sequencing and phylogenetic analysis of rabies virus nucleoproteine	123
	8.1 Materials and methods	124
	8.2 Results and discussions	125
	8.3 Partial conclusions	138
CHAPTER IX	THE COMPLETE SEQUENCING OF RABIES VIRUS FULL GENOME	139

		9.1 Materials and methods	139
		9.2 Results and discussions	142
		9.3 Partial conclusions	154
CHAPTER X	RESEARCHES REGARDING THE SURVEILANCE AND CONTROL STRATEGY OF ANIMALS RABIES INFECTION IN THE NORTH-EAST OF ROMANIA		155
		10.1. Detection of antirabies antibodies and determinations of tetracycline in foxes	155
		10.1.1 Materials and methods	156
		10.1.2 Results	158
		10.1.2.2 Detection of antirabies antibodies in foxes by ELISA	158
		10.1.2.3 Detections of tetracycline in foxes mandibles	163
		10.1.3 Discussions	166
		10.1.4 Partial conclusions	167
		10.2 Detections of antirabies antibodies in wild boars	167
		10.2.1 Materials and methods	168
		10.2.2 Results	169
		10.2.2.1 Detections of antirabies antibodies in wild boar by ELISA	169
		10.2.2.2 Detections of antirabies antibodies in wild boar by FAVN	172
		10.2.3 Discussions	174
		10.2.4 Partial conclusions	175
CHAPTER XI	FINALS CONCLUSIONS		176
BIBLIOGRAPHY			181
LIST OF FIGURES			192
LIST OF TABLES			196
LIST OF PAPERS			198

LISTA DE ABREVIERI

ADNc: acid dezoxiribonucleic complementar
ARN: acid ribonucleic
Atg-atc: complex antigen-anticorp
BHK-21: baby hamster kidney -21
CVS-27: Challenge Virus Standard-27
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DO: densitate optică
DR: diagnostic recherche (Diagnostic cercetare)
DSVSA: Direcția Sanitar-Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor
DUVV: Duvenhage rabies virus
EBLV-1: European bat *Lyssavirus* type 1
EBLV-2: European bat *Lyssavirus* type 2
FAVN: Fluorescent Antibody Virus Neutralization Test
G: glicoproteina G a virusului rabic
h: oră
IFD: Imunofluorescență directă
IgG: imunoglobulina G
kDa: kilodaltoni
LCR: lichid cefalo-rahidian
M: gena M a virusului rabic
min: minut
ml: mililitru
N: nucleoproteina N a virusului rabic
NEE: North-Eastern Europe
NGS: Next Generation Sequencing
nm: nanometri
NJ: Neighbour joining (metodă filogenetică)
Nmol: nanomol
N2a: neuroblastome murine
OIE: Oficiul Internațional de Epizootii
OMS: Organizația Mondială a Sănătății
PB: procentaj de blocare
PBȘ: proba biologică pe șoareci
RT-PCR: Revers transcripție - Reacția de polimerizare în lanț
P: fosfoproteina P a virusului rabic
pb: perechi de baze
RABV: virusul rabic clasic
RNP: complex ribonucleoproteic
RTCIT: Rabies Tissues Cultures Infections Test
CRDV MD: Centrul Republican de Diagnostic Veterinar din Republica Moldova
rpm: rotații pe minut
SNC: sistem nervos central
TFS: tampon fosfat salin
UI: unități internaționale
UV: ultraviolete
μM: micromol
μL: microlitru
μg: microgram

INTRODUCERE

Timp de secole, rabia sau turbarea a stârnit groaza publicului și totodată interesul cercetătorilor, fiind o problemă complexă și greu de rezolvat. Deși veche de secole, ea este nouă și astăzi, reprezentând o amenințare gravă atât pentru animale, cât și pentru oameni deopotrivă.

De-a lungul timpului, au fost încercate tot felul de metode de vindecare ale acestei boli, unele mai ineficiente decât altele. Astfel, extirparea, cauterizarea cu fierul roșu sau cu sodă caustică a zonei mușcate, scufundarea bolnavului într-un rezervor cu apă rece, respectiv în ulei cald, înghițirea de către bolnavi a creierului sau al capului întreg al câinelui turbat sau a salivei acestuia, „tăierea sub limbă” sau aplicarea „puterii divine” sunt doar câteva dintre cele mai fanteziste propuneri și recomandări aplicate până în zilele noastre.

Mai bine de jumătate din populația globului trăiește într-o zonă endemică, iar mai mult de 80% dintre decese apar în zonele rurale, unde accesul la campaniile de educație pentru sănătate și profilaxia post-expunere este limitat sau inexistent.

Din păcate, nu a fost găsit un tratament eficient care să vindece această boală cruntă și cu toate că, poate fi prevenită 100% prin intermediul vaccinării, rabia cauzează anual în jur de 60.000 de decese în rândul oamenilor.

Cu toate că, această zoonoză se întâlnește foarte rar în rândul oamenilor din țările dezvoltate, este o problemă de sănătate publică fără precedent în Asia și Africa cu peste 95% din cazurile fatale ale lumii.

Deși rabia este cunoscută drept cea mai mortală zoonoză, fără posibilitate de vindecare, în literatură au fost recunoscute 6 cazuri de rabie în rândul oamenilor care au supraviețuit.

Astfel, unul dintre cele mai cunoscute și mediatizate cazuri este cel al unei fete din USA care, după ce a fost zgâriată de un liliac la degetul arătător al mâinii stângi a supraviețuit rabiei fără instituirea unui profilaxii postexpunere. După o lună de la acest eveniment, fata s-a prezentat la spital acuzând o stare de oboseală avansată, parestezia mâinii stângi, instabilitate, greață, vărsături și ataxie. Pe măsură ce zilele treceau, semnele se agravau, apărând vedere încețoșată, slăbiciunea piciorului stâng, febră, vorbire încâlcită, nistagmus și tremurături la nivelul mâinii stângi, hipersalivație și deglutiție necontrolată. În urma unei anamneze mai amănunțite, a fost suspionată rabia, în acest sens recoltându-se ser, LCR, salivă, fiind realizată și o biopsie cutanată, confirmându-se prezența anticorpilor antirabici în LCR și ser. Întrucât era mult prea târziu administrarea unui vaccin sau al imunoglobulinelor, a fost instituită coma, utilizându-se un protocol foarte complex de terapie. Printre multitudinea de substanțe, au fost utilizate ketamina și amantidina, cunoscute ca având activitate in vitro împotriva virusului rabic, 76 de zile mai târziu, fata fiind externată. Recuperarea nu a fost una

completă, aceasta prezentând coreoatetoză bucolinguală constantă și coreoatetoză generalizată, distonie intermitentă și balism.

Pacienta a supraviețuit doar prin imunitatea dobândită în mod natural însă, nu pot fi excluse și gravitatea zgârieturii (5 mm), dar și posibilitatea unei variante de virus mai slab patogene sau al unui polimorfism de gazdă rar. Tratamentul a fost instituit ulterior și altor persoane diagnosticate cu rabie, însă fără nici un rezultat.

Din păcate, rabia rămâne în continuare o amenințare globală gravă, fiind inclusă în lista bolilor tropicale neglijate a Organizației Mondiale a Sănătății și dată fiind importanța sanitară și economică a zoonozei, aceasta necesită o coordonare trans-sectorială strânsă la nivel regional, național și global.

Numeroase organizații luptă pentru eliminarea rabiei, în acest sens Organizația Mondială a Sănătății alături de Oficiul Internațional de Epizootii, Organizația pentru Alimentație și Agricultură a Națiunilor Unite și Alianța Globală pentru Controlul Rabiei stabilind un obiectiv global „mortalitate zero a rabiei umane până în anul 2030.

Instituirea unor programe intensive prin distribuția de momeli vaccinale ce a vizat rezervorul silvatic vulpea, a dus în ultimele decenii la eradicarea rabiei în vestul Europei, singurele metode eficiente în a întrerupe ciclul infecțios între animale și oameni fiind reprezentate de către vaccinarea în masă al animalelor de companie și vaccinarea orală a vulpilor.

INTRODUCTION

For centuries, rabies has terrified the people and has risen the interest of scientist, being a complex and hard to resolve problem. Although centuries old it is still new and represents a dangerous threat for both animals and people.

During time, different methods for curing this disease have been tried, some more inefficient than others. This way, extirpation, red iron burning or putting caustic soda on the bite wound, submerging the ill in cold water or hot oil, swallowing the brain or the entire head of the mad dog, cutting under the tongue or `divine power` are just some of the most outrageous proposals until nowadays.

More than half of the entire world's populations lives in an endemic area and more than 80% of death occur in rural areas where access to education campaigns regarding health and post exposure prevention are limited or non existent.

Unfortunately, an efficient cure has not yet been discovered and although the disease can be 100% prevented by vaccination, each year there are around 60.000 human deaths.

Although this zoonosis is rarely found in people from developed countries, it is a health problem without precedent in Asia and Africa where more than 95% of world's fatal cases are found.

Although rabies is known to be the deadliest zoonosis, in literature, 6 cases of people who have survived are found.

One of the most known and publicized cases is the one of a girl from USA who, after she was scratched on the index finger of the left hand by a bat, survived without post exposure prevention. After one month from the time of the scratch the girl presented herself at the hospital with advanced fatigue, lack of stability, numbing in the left hand, sickness, vomiting and ataxia. Days were passing by and the symptoms were getting worse, with fever, hypersalivation, nystagmus and weakness in her left leg. After a thorough exam, rabies has been considered and samples were taken from skin and cerebrospinal liquid confirming the antibodies presence. Because it was already too late to use a vaccine, coma was induced using a very complex therapy protocol. In the multitude of substances, ketamine and amantidine were used, known to have a in vitro activity against rabies virus, 76 days later the girl being discharged from the hospital. The recovery was not a complete one, constant buccolingual choreoathetosis with generalized choreoathetosis and ballismus being reported.

The patient has survived by natural acquired immunity alone but we cannot exclude the gravity of the scratch (5mm) and also the possibility of a less pathogenic virus variety or a rare host polymorphism. After this incident, the treatment was used in other people as well, but without any results.

Unfortunately, rabies remains a serious global threat being included in the tropical neglected diseases by the WHO and considering its sanitary and economic importance, it requires a tight trans-sectorial coordination at regional, national and global level.

Numerous organizations are fighting to eliminate the disease and for this, World Health Organization next to World Organisation for Animal Health, Food and Agriculture Organization of the United Nations and Global Alliance for Rabies Control, have established a global objective of `zero human deaths by 2030`.

By using intensive programs regarding the distribution of vaccine baits targeting wild foxes, during the last decades rabies has been eradicated from the west of Europe, the only effective methods for braking the infectious cycle between animals and people being mass vaccinations of pets and oral vaccinations of foxes.

REZUMAT

Cuvinte-cheie: analiză filogenetică, anticorpi antirabici, NGS, rabie, secvențiere.

Teza de doctorat intitulată **„Cercetări privind metodologia de diagnostic, supraveghere, prevenire și control în rabie”** cuprinde 199 de pagini și conform normelor în vigoare este structurată în două părți principale: prima parte, intitulată **„Stadiul actual al cunoașterii”** care cuprinde 18 pagini și partea a doua **„Contribuții personale”**, extinsă pe 133 pagini, la care se adaugă cuprinsul, introducerea, rezumatul, bibliografia aferentă și anexele.

Prima parte, **„Stadiul actual al cunoașterii”** cuprinde două capitole, ce descriu succint caracterele etiologice și epidemiologice, dar și metodologia de diagnostic, supraveghere, control și eradicare a infecției rabice la animale, cu ultimele actualizări în domeniu din literatura de specialitate atât din străinătate, cât și din țara noastră.

Partea a doua **„Contribuții personale”** este structurată în 9 capitole, fiecare prezentând detaliat rezultatele întreprinse pe durata studiilor doctorale, ultimul dintre acestea sintetizând concluziile finale aferente cercetărilor obținute.

Pentru realizarea tezei de doctorat, 59 de probe de creier (38 din nord-estul României și 21 din Republica Moldova), 72 de mandibule de vulpi din județele Moldovei, 392 de probe reprezentate de lichid toracic provenite de la vulpi și 312 de probe (seruri și lichid toracic) provenite de la mistreți au fost luate în studiu.

CAPITOLUL III ce redă **„Scopul, obiectivele tezei de doctorat și cadrul organizatoric al cercetărilor”** descrie pe scurt instituțiile și cadrele organizatorice în care s-au desfășurat cercetările tezei de doctorat, alături de scopul și obiectivele propuse.

Ținând cont de importanța bolii, dar și de puținele cercetări realizate până în prezent în țara noastră, cât și de lipsa informațiilor privind Republica Moldova (a doua țară luată în studiu), cercetările întreprinse în cadrul tezei, au avut ca scop realizarea unei anchete epidemiologice a cazurilor de rabie din nord-estul României, dar și din Republica Moldova vizând o perioadă de 7 ani, pentru o bună înțelegere a situației actuale, dar și pentru stabilirea unei prevalențe fidele a bolii în rândul animalelor domestice și sălbatice. Un alt obiectiv a fost acela de a realiza un studiu epidemiologic molecular, prin efectuarea unei analize filogenetice a tulpinilor de virus rabic din zona de studiu, cu scopul de a urmări circulația, distribuția, evoluția virusului rabic, alături de mecanismele moleculare ale adaptării virale.

CAPITOLUL IV intitulat **„Investigații epidemiologice privind prezența și prevalența infecției rabice la animale în nord-estul României și în Republica Moldova”**, prezintă rezultatele obținute în urma anchetei epidemiologice efectuate pentru perioada 2010-2016, ce au vizat cele 8 județe ale regiunii Moldova, respectiv Republica Moldova, obținând o privire de ansamblu a situației cazurilor pozitive de rabie.

Astfel, prevalența cazurilor pozitive de rabie la animalele domestice, raportată la cele 781 de probe primite la laborator cu suspiciunea de rabie, în perioada 2010-2016 în nord-estul

țării noastre a fost de 24,07%. Specia domestică cea mai afectată a fost reprezentată de către bovine cu un total de 103 cazuri (13,19%); cele mai multe cazuri pozitive de rabie la animalele domestice au fost confirmate pe raza județului Iași cu un total de 48 de cazuri (6,14%). Prevalența cazurilor pozitive de rabie la animalele sălbatice, raportată la cele 1314 probe pentru aceeași perioadă luată în studiu a fost de 23,05%. Cele mai afectate au fost vulpile cu un total de 284 de cazuri (21,61%); cele mai multe cazuri pozitive de rabie la animalele sălbatice au fost raportate în județul Suceava cu un total de 93 de cazuri (7,07%).

În ceea ce privește situația cazurilor de rabie din Republica Moldova, din totalul celor 1150 de probe provenite de la animalele domestice din perioada 2010-2016, 573 au fost pozitive, iar diferența de 577 negative, înregistrându-se o prevalență totală de 49,82%. Cele mai multe cazuri au fost confirmate la bovine cu un total de 255, reprezentând 22,17%. Din totalul celor 305 probe provenite de la animalele sălbatice din Republica Moldova, 191 au fost confirmate pozitive și 114 negative, înregistrându-se o prevalență totală de 62,62%. Specia sălbatică cea mai afectată a fost vulpea, cu un total de 158 de cazuri pozitive (51,80%).

CAPITOLUL V **„Confirmarea diagnosticului de rabie prin metoda de imunofluorescență directă”** a avut ca scop reconfirmarea diagnosticului de rabie al probelor colectate pentru studiul nostru, înaintea caracterizării moleculare a acestora, în vederea corelării rezultatelor, dar și de a evidenția conjugatul optim în vederea obținerii de rezultate precise și valide, fiind testate în acest sens 3 conjugate prin comparare.

Astfel, din totalul celor 59 de probe retestate, 43 dintre acestea au fost pozitive și 16 negative la tehnica de IFD. Probele DR1016, DR1199, DR1202, DR1344, DR1354 și DR1355, considerate pozitive în cadrul laboratoarelor din cadrul cărora au fost colectate, în urma testărilor noastre, acestea au fost negative, atât la IFD, cât și la tehnicile ulterioare (RTCIT, RT-PCR convențional, Real time qRT-PCR, nefiind detectat ARN viral).

Rezultatele noastre subliniază importanța utilizării unui conjugat calitativ în stabilirea unui diagnostic corect și precis. În majoritatea cazurilor, calitatea probelor de testat alături de cea a conjugatului implementat au o importanță majoră în obținerea unui rezultat valid, nerespectarea acestor recomandări ducând la posibilitatea aparițiilor de rezultate fals pozitive sau fals negative. Chiar dacă, un rezultat fals pozitiv nu are consecințe severe, unul fals negativ în schimb, poate avea consecințe tragice atunci când sunt implicate și victime umane.

În cadrul studiului comparativ privind cele 3 tipuri de conjugate utilizate, cele mai bune rezultate au fost obținute cu ajutorul conjugatului Bio-Rad, rezultate superioare celorlalte două, acesta oferind o intensitate crescută a semnalului fluorescent și un fundal întunecat, fiind capabil să identifice antigenul viral în 100% din câmpurile microscopice examinate într-un număr crescut de probe.

Capitolul VI **„Confirmarea diagnosticului de rabie prin tehnica de izolare a virusului rabic pe culturi celulare (RTCIT)”** este structurat pe 3 subcapitole și a avut ca scop confirmarea diagnosticului de rabie prin intermediul RTCIT, ca metodă alternativă pentru proba biologică pe șoareci, de a evidenția linia celulară optimă, dar și sistemul ideal în vederea izolării, respectiv multiplicării virusului rabic.

Astfel, cercetările întreprinse în cadrul subcapitolului **„Izolarea virusului rabic pe culturi celulare (RTCIT) ca metodă alternativă pentru proba biologică pe șoareci”** au fost

realizate pentru toate cele 59 de probe luate în studiu din ambele țări, utilizând linia celulară de referință N2a (neuroblastome murine), la concentrația de 8×10^5 celule/ml, în cameră Labtek, cu ajutorul conjugatului Bio-Rad, rezultatele fiind în concordanță cu cele obținute în cadrul IFD și cu cele raportate în literatura de specialitate. Ținând cont de faptul că, rabia are un impact medical major în rândul oamenilor, chiar dacă rezultatele fals negative nu sunt comune în cazul tehnicii de imunofluorescență directă, o metodă alternativă care să fie rapidă, specifică și sensibilă trebuie să fie disponibilă ca și back-up, RTCIT îndeplinind toate aceste criterii.

Al doilea subcapitol, „*Studiu comparativ privind sensibilitatea a două linii celulare distincte N2a și BHK-21 utilizate pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare*” a fost realizat cu scopul de a evidenția și confirma linia celulară optimă pentru izolarea și multiplicarea virusului rabic pe culturi celulare. Astfel, un total de 20 de probe au fost luate în studiu, fiind utilizate două linii celulare diferite: N2a (neuroblastome murine) și BHK-21 (celule renale de pui de hamster). În ceea ce privește linia celulară N2a, din cele 20 de probe testate, toate (100%) au fost pozitive pentru perioada de incubație de 48 de ore și 19 (95%) pentru cea de 72 de ore, în timp ce pentru linia celulară BHK-21, 19 probe (95%) au fost pozitive pentru perioada de incubație de 48 de ore (cu excepția probei DR1032) și doar 14 probe (70%) pentru cea de 72 de ore (cu excepția probelor DR1020, DR1022, DR1027, DR1029, DR1030 și DR1036).

Evaluând rezultatele obținute pentru cele 2 linii celulare, N2a este mult mai sensibilă pentru multiplicarea virusului rabic decât BHK-21, fiind preferată perioada de incubație de 48 de ore. Cu toate că, ambele linii celulare sunt de referință pentru virusul rabic, linia N2a rămâne cea mai sensibilă, rezultatele fiind superioare celor obținute pentru linia BHK-21.

Ultimul subcapitol „*Utilizarea a două sisteme diferite pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare*” a avut ca scop realizarea RTCIT utilizând 2 sisteme diferite, și anume: microplăcile de titrare ($n=96$ godeuri de plastic) și camerele de sticlă Labtek ($n=8$ căsuțe) în ideea de a observa și de a stabili dacă virusul rabic se multiplică la fel de bine în ambele tipuri de suport. Aceste cercetări au fost efectuate pe un total de 16 probe, utilizând linia celulară N2a cu concentrații diferite pentru cele 2 sisteme menționate anterior.

Astfel, în cadrul sistemului de sticlă LabTek, a fost utilizată o singură concentrație celulară de 8×10^5 celule/ml, cu o perioadă de incubație de 48h, toate cele 16 probe (100%) testate fiind pozitive, acest sistem fiind de regulă utilizat în tehnica RTCIT pentru confirmarea diagnosticului de rabie.

Cea de-a doua procedură în microplăci ELISA a fost realizată utilizând 2 concentrații celulare diferite, și anume 5×10^5 celule/ml și $2,5 \times 10^5$ celule/ml, cu o perioadă de incubație de 72h, fiecare probă fiind inoculată în duplicat. Astfel, pentru concentrația celulară de 5×10^5 celule/ml, din cele 16 probe testate, 6 (37,5%) au fost negative și 10 (62,5%) pozitive, aceeași situație înregistrându-se și pentru concentrația $2,5 \times 10^5$ celule/ml. Probele DR1025, DR1027, DR1028, DR1030 and DR1032 au fost negative pentru ambele concentrații celulare. Pentru alte 2 probe, rezultatele au fost diferite. Astfel, DR1029 a fost pozitivă pentru prima concentrație celulară, dar negativă pentru cea de-a doua. În mod opus, proba DR1031 a fost negativă pentru 5×10^5 celule/ml, dar pozitivă pentru $2,5 \times 10^5$ celule/ml.

Cele mai bune rezultate au fost obținute în cadrul sistemului LabTek, concentrația celulară de 8×10^5 celule/ml fiind considerată a fi optimă pentru o bună izolare și multiplicare a

virusului rabic. În ceea ce privește microplăcile de plastic, rezultatele au fost inconstante, obținând rezultate satisfăcătoare pentru concentrațiile celulare per ml de 5×10^5 și $2,5 \times 10^5$, dar nu și pentru cele sub 2×10^5 celule/ml, întrucât numărul redus de celule nu a permis izolarea, respectiv multiplicarea virusului, nefiind recomandată utilizarea acestora. Rezultatele obținute pentru microplăci este posibil să fi fost influențate de către congelările și decongelările repetate, alături de condițiile de depozitare ale acestora, ceea ce a dus la o pierdere a infectivității.

CAPITOLUL VII intitulat „*Confirmarea diagnosticului de rabie prin tehnicile de biologie moleculară real time PCR și RT-PCR convențional*” a fost realizat cu scopul de a confirma rezultatele obținute în cadrul tehnicilor de referință și prin intermediul celor de biologie moleculară, în vederea utilizării acestora ca și instrument adițional de detecție a lyssavirusurilor.

Astfel, au fost realizate în acest sens, extracții ARN, al tuturor celor 59 de probe luate în studiu, urmate de cuantificarea acizilor nucleici prin intermediul tehnicii *One step Real time SYBRGreen qRT-PCR* utilizând un ciclor în timp real, obținând un total de 43 de probe pozitive și 16 negative, rezultate aflate în concordanță cu cele obținute la tehnicile de referință. În cazul probelor testate, coeficientul de determinare R^2 a avut o valoare cuprinsă între 0,98-0,99, fiind considerată satisfăcătoare, iar eficacitatea PCR-ului a înregistrat o valoare cuprinsă între 1-1,04, fiind ideală pentru curba standard. Semnalul fluorescent emis de către SYBRGreen alipit de produsul PCR al probelor testate a fost emis între ciclurile 6-14, valorile C_t obținute au variat între 13,71 și 23,64 pentru probele pozitive confirmate, iar numărul de copii/reacție s-a încadrat între $1,37 \times 10^5$ și $1,34 \times 10^8$. Aceste valori ne indică faptul că unele probe sunt mult mai concentrate în virus rabic decât altele, concentrația probelor fiind reflectată și în diferența numărului necesar de cicluri pentru a dobândi semnalul fluorescent.

Următorul pas a constat în amplificarea parțială a genei N a virusului rabic prin intermediul unui *Heminested RT-PCR convențional*, utilizând perechile de primeri JW12/JW6 și JW12/JW10, ce permit amplificarea specifică a nucleoproteinei pentru toate cele 15 specii de virus rabic, fiind obținut un produs de amplificare de 606-pb. În urma testării a 47 de probe din totalul celor 59 incluse în studiul nostru, 43 au fost pozitive și 4 negative, rezultate aflate în concordanță cu IFD și RTCIT.

În vederea realizării secvențierii genei complete N, aceasta a fost amplificată, utilizând de asemenea un *Heminested RT-PCR convențional*, cu ajutorul primerilor JW12 / PVN8bis și M13-20JW12 / M13RevPVN8bis, pe un număr de 43 de probe, obținând un total de 41 de probe pozitive și 2 negative.

Ultimul pas în cadrul acestui capitol a constat în efectuarea tehnicii *TaqMan Real time qRT-PCR*, ce a avut ca și obiectiv încadrarea probelor într-unul din genotipurile 1 (RABV), 5 (EBLV-1) și 6 (EBLV-2), ce se regăsesc pe teritoriul Europei, prin utilizarea de sonde fluorescente LysGt1, LysGt5 și LysGt6, ce permit o amplificare specifică a nucleoproteinei rabice genotipurilor aferente.

Pentru detecția genotipului 1 RABV, tehnica a fost realizată în cazul a 47 de probe (DR1016-DR1036, DR1187-DR1202, DR1331-DR1336, DR1343-DR1358), 43 dintre acestea fiind pozitive și 4 negative, valorile C_t variind între 19,57 și 26,97. Pentru detecția genotipurilor 5 EBLV-1 și 6 EBLV-2, tehnica a fost realizată pentru primele probe luate în studiu în anul

2015, și anume DR1016-DR1036, toate probele fiind negative, cu excepția controalelor pozitive care s-au încadrat în standard.

Rezultatele pozitive obținute pentru primul genotip și cele negative pentru genotipurile 5 și 6, confirmă și încadrează izolatele de virus rabic în cadrul primului genotip RABV.

CAPITOLUL VIII „*Caracterizarea moleculară a tulpinilor de virus rabic izolate din nord-estul României și din Republica Moldova*” a fost realizat cu scopul de a efectua o secvențiere, respectiv o analiză filogenetică a genei parțiale și complete N. În acest sens, au fost luate în considerare probele pentru care s-a reușit amplificarea atât pentru gena parțială N, cât și pentru cea totală. Din totalul probelor trimise pentru secvențiere în cadrul Companiei Genoscreen din Lile, Franța, s-a reușit secvențierea a 39 de probe pentru gena parțială N, respectiv 37 de probe pentru gena totală N.

Pentru realizarea analizei filogenetice, variabilitatea genetică a diferitelor izolate incluse în studiul nostru a fost apreciată utilizând metoda Neighbour Joining (NJ), respectiv PhyML alături de alte programe și soft-uri.

Un arborele filogenetic a fost realizat pentru gena parțială și completă N cu scopul de a determina dacă arborele generat prezintă aceeași topologie. Astfel, acesta a fost efectuat comparând secvențele obținute în cadrul studiului pentru gena parțială (n=39) și completă (n=37) N cu secvențe nucleotidice de referință extrase din baza de date internațională GenBank. A fost evaluată pentru toți arborii generați prin intermediul metodei NJ, confidența arborilor. Cea mai utilizată metodă statistică, bootstrap a fost calculată în programul de analiză filogenetică (MEGA6, opțiunea bootstrap).

În urma analizei filogenetice realizate în studiul nostru pe probe provenite din nord-estul României, dar și din Republica Moldova, s-a arătat apartenența la un singur grup filogenetic, și anume NEE (North-Eastern Europe).

Acest grup are o distribuție geografică amplă, fiind identificat de-a lungul anilor în diferite țări precum Polonia, Estonia, Lituania, Bulgaria, estul Slovaciei, Ucraina și Rusia, așa cum a fost demonstrat de către Bourhy ș.a., 1999, Kuzmin ș.a., 2004, McElhinney ș.a., 2006, Picard ș.a., 2012, Robardet ș.a., 2013. În aceste țări, izolatele au provenit atât de la vulpi, cât și de la ratoni, ceea ce evidențiază faptul că, ambele specii sunt rezervoare pentru această variantă de virus. În studiul nostru, grupul NEE a fost identificat la toate speciile testate și anume: câine, pisică, bovină, vulpe, lup, căprior și dihor, ceea ce demonstrează faptul că, această variantă se poate adapta la diferite specii de animale.

Până în prezent, la noi în țară nu a mai fost realizată secvențierea completă a nucleoproteinei virusului rabic, implicit o analiză filogenetică aferentă, acestea fiind primele date raportate până în prezent. Referitor la rezultatele obținute pentru probele din Republica Moldova, acestea sunt singulare, până în momentul de față nefiind întreprins nici un studiu epidemiologic molecular.

În ceea ce privește analiza filogenetică realizată pentru partea de N-E a țării noastre, a fost identificat grupul filogenetic NEE, fiind semnalată pentru prima dată prezența acestuia în județele Botoșani, Iași, Vaslui, Galați și Vrancea.

CAPITOLUL IX intitulat „*Secvențierea completă a genomului virusului rabic*” a avut ca scop caracterizarea întregului genom a virusului rabic, folosind secvențierea de nouă

generație pe un număr selectiv de probe, în vederea identificării existenței unor posibile modificări de patogenitate la nivel de specie animală, dar și pentru o mai bună înțelegere a diversității lyssavirusurilor. Aplicarea secvențierii de nouă generație în studiul virusurilor va conduce către o nouă eră a descoperirii și caracterizării acestora, revoluționând studiile filogeografice în domeniul virologiei.

Secvențierea de nouă generație a fost realizată pentru prima dată atât în țara noastră, cât și în Republica Moldova pe probe provenite de la animale domestice și sălbatice.

Analiza similarităților secvențelor nucleotidice și aminoacizilor ale celor 5 gene ale virusului rabic au înregistrat următoarele procentaje de similarități: gena N 96-100%, gena P 96-100%, gena M 96-100%, gena G 97-100%, iar gena L 97-99%.

Consecutiv studierii pozițiilor de aminoacizi ale genei G a virusului rabic, cunoscute ca fiind implicate în patogenitate, nu au fost identificate modificări care pot sugera diferențe de patogenitate la nivel de specie animală.

Pentru o mai bună înțelegere a diversității lyssavirusurilor, respectiv a diferențelor de patogenitate sunt necesare studii aprofundate care să implice un areal geografic mai extins, dar și un număr mai ridicat de probe.

CAPITOLUL X „Cercetări privind strategia de supraveghere și control a infecției rabice la animale în nord-estul României” a avut ca scop verificarea eficacității campaniilor de supraveghere din nord-estul țării noastre prin determinarea anticorpilor antirabici postvaccinali, respectiv determinarea markerului vaccinal la vulpi. De asemenea, în ideea de a confirma sau nu ipoteza conform căreia mistreții ar constitui potențiali competitori pentru aceste momeli, o serie de probe au fost colectate și testate în acest sens.

În cadrul primului subcapitol **„Detecția anticorpilor antirabici postvaccinali și determinarea markerului vaccinal - tetraciclină - la vulpi”**, zona de studiu a fost reprezentată de cele 8 județe din regiunea Moldovei a țării noastre, alături de județele Maramureș și Buzău, zone unde s-a desfășurat vaccinarea antirabică orală la vulpi, în acest sens fiind testate 392 de probe de lichid toracic și 72 probe de mandibule.

Detecția și titrarea anticorpilor antirabici pentru cele 392 de probe a fost realizată prin intermediul metodei imunoenzimatică ELISA de blocare, 345 dintre acestea fiind lucrate cu ajutorul kit-ului *BioPro Rabies ELISA Ab Kit*, (BioPro, Prague, Czech Republic), iar restul de 47 cu ajutorul kit-ului *Platelia™ Rabies II Kit ad usum veterinarium* (BioRad. Franța).

Astfel, în cadrul primului kit, din totalul celor 345 de probe de vulpi, 98 au fost pozitive (28,40%) și 247 negative (71,60%). Din totalul celor 345 de probe de vulpi lucrate, 247 (71,60%) au înregistrat un procentaj de blocare (PB) <40%, 47 (13,62%) s-au încadrat în categoria unui PB de 40-70%, iar restul de 51 (14,78%) în ultima categorie cu un PB >70%. O probă este considerată pozitivă dacă PB este egal sau mai mare de 40% și negativă dacă PB este mai mic de 40%, în scopul evaluării eficacității campaniilor de vaccinare, fiind recomandată ca și referință valoarea PB-ului $\geq 40\%$.

În urma testării celor 47 de probe prin intermediul kit-ului *Platelia Rabies*, 14 dintre acestea au fost pozitive și 33 negative la detecția anticorpilor antirabici. Din totalul celor 47 de probe testate prin intermediul acestui kit, nici una dintre probe nu s-a încadrat în prima categorie de >4 EU/ml, iar pentru 24 dintre acestea nu s-a înregistrat nici un semnal de seroconversie,

fiind situate sub valoarea de 0,125 EU/ml. Un nivel insuficient de anticorpi antirabici a fost detectat în cazul a 9 probe, cu valori cuprinse între 0,125-0,5 EU/ml, considerat a fi unul neprotectiv în cazul unei infecții cu virusul rabic. Doar 14 probe s-au încadrat în categoria 0,5-4 EU/ml, cu un titru de anticorpi suficient pentru a contracara o eventuală infecție cu virusul rabic.

În ceea ce privește determinarea markerului vaccinal tetraciclina din dinții, respectiv mandibulele vulpilor, din totalul celor 72 de probe testate, 60 dintre acestea au fost pozitive și 12 negative. În cadrul probelor noastre, au fost detectate linii fluorescente în ciment, doar în cazul a 2 probe din totalul celor 72, în dentină un număr de 33 de probe, iar în os, 60 de probe. În ceea ce privește intensitatea semnalului fluorescent detectat, aceasta a variat de la + pentru 17 probe, ++ pentru 13 probe și +++ pentru 30 de probe.

Cel de-al doilea subcapitol „**Deteția anticorpilor antirabici la mistreți**” a fost realizat în ideea de a stabili dacă mistreții intervin asupra eficacității acestor campanii, prin consumul necontrolat al momelilor vaccinale, în acest sens fiind testate 312 probe (ser și lichid toracic), provenite din campaniile de vânătoare, realizate în perioada 2014-2016.

Astfel, din totalul celor 312 probe de mistreți testate, 132 au fost pozitive (42,30%) și 180 negative (57,70%) prin intermediul metodei serologice ELISA. Pentru a evalua sensibilitatea testului ELISA, 56 dintre probele confirmate pozitive în cadrul acestui test, au fost testate în paralel și prin intermediul tehnicii de referință FAVN, înregistrându-se o sensibilitate de 96,43%. Pentru 2 din cele 56 de probe testate prin intermediul FAVN-ului, titrul de anticorpi a fost de 0,02 UI/ml, respectiv 0,22 UI/ml, rezultate aflate în discordanță cu cele obținute la ELISA.

Deteția anticorpilor antirabici din probele de mistreți prin testul ELISA a evidențiat un număr surprinzător de probe pozitive (132/312), acestea fiind primele date raportate la această specie până în prezent în țara noastră. Rezultatele noastre scot în evidență faptul că, aceste animale sălbatice reprezintă un adevărat pericol pentru buna desfășurare a campaniilor de vaccinare orală a vulpilor, fiind principalii competitori pentru consumul momelilor.

În încheierea acestor cercetări, sunt prezentate succint un număr de 24 concluzii finale.

SUMMARY

Key words: phylogenetic analysis, antirabies antibodies, NGS, rabies, sequencing.

The PhD thesis with the title ***"Research regarding diagnostic methodology, surveillance, prevention and control in rabies"*** comprises 199 pages and according to the rules in force it is structured in two main parts: the first part, entitled *"Current Stage of Knowledge"*, comprising 18 pages and the second part *"Personal Contributions"*, extended on 133 pages, to which is added the content, the introduction, the summary, the annexes and the related bibliography.

The first part, ***„Current state of knowledge"***, consists of two chapters, which briefly describe the etiological and epidemiological characteristics, but also the methodology for diagnosis, surveillance, control and eradication of rabies infection in animals, with the latest updates in the field of literature from abroad, as well as from our country.

The second part ***„Personal Contributions"*** is structured in 9 chapters, each detailing the results obtained during doctoral studies, the latter summarizing the final conclusions of the researches.

In performing the doctoral thesis, 59 brain samples (38 from north-eastern Romania and 21 from Republic of Moldova), 72 fox mandibles from Moldova region counties, 392 samples of fox thoracic liquid and 312 samples (sera and thoracic liquid) from wild boar were studied.

CHAPTER III, ***„PhD thesis aim and objectives and the organizational framework of the researches"*** shortly describes the institutions and the organizational frames in which the PhD researches were conducted next to the purpose and the proposed objectives.

Taking into consideration the importance of the disease, the small amount of researches conducted until the present in our country and also the lack of information regarding Republic of Moldova (the second country taken into study) the researches performed during the PhD thesis had the purpose to realize an epidemiological statistic of the rabies cases from the north-east of Romania and also Republic of Moldova, for a period of 7 years in order to gain a better understanding of the actual situation and also to establish an accurate prevalence of the disease for both domestic and wild animals. Another important objective was to perform an molecular epidemiological study, using a phylogenetic analyses of the rabies virus isolates from the study area, with the purpose to follow the circulation, distribution and evolution of the rabies virus next to the molecular viral adaptation mechanisms.

CHAPTER IV entitled ***„Epidemiological investigations regarding the presence and prevalence of rabies infection in animals in north-est of Romania and Republic of Moldova"***, presents the results obtained after the epidemiological statistic conducted for the period 2010-

2016 for the 8 counties of Moldova region and Republic of Moldova, obtaining a complete view regarding the situation of positive rabies cases.

The prevalence of positive rabies cases in domestic animals from the total of 781 samples received at the laboratory with rabies suspicion, collected between 2010-2016 from the north-est of our country was 24,07%. The most affected domestic species was bovines with a total of 103 cases (13.19%); most of them confirmed in Iasi county area with a total of 48 cases (6,14%). The prevalence of positive rabies cases in wild animals from the total of 1314 samples collected in the same period was 23,05%. The most affected were foxes with a total of 284 cases (21,61%); the highest number of positive cases in wild animals was reported in Suceava county with a total of 93 cases (7,07%).

Regarding the rabies cases situation in the Republic of Moldova, from the total of 1150 samples collected from domestic animals during 2010-2016, 573 were found positive with a prevalence of 49,82%. The highest number of confirmed cases were from bovines with a total of 255, representing 22,17%. From the total of 305 samples collected from wild animals from Republic of Moldova, 191 were confirmed to be positive with a prevalence of 62,62%. The most affected wild species was the fox with a total of 158 positive cases (51,8%).

CHAPTER V **„*Rabies diagnostic confirmation by direct fluorescent antibody test*”** had the purpose to reconfirm the rabies diagnostic of the samples collected for our study, before their molecular characterization, in order correlate the results but also to highlight the optimal conjugate for obtaining precise and valid results, in this way being tested 3 different conjugates.

Thus, out of the total of 59 retested samples, 43 were found positive and 16 negative by the FAT technique. The samples DR1016, DR1199, DR1202, DR1344, DR1354 and DR1355, considered to be positive by the laboratories from where they were collected, after our testing they were found to be negative using FAT and also other techniques (RTCIT, RT-PCR conventional, Real time qRT-PCR, no viral RNA being detected).

Our results underline the importance of using a good quality conjugate in order to obtain a correct and precise diagnostic. In the majority of cases, the quality of the tested samples together with that of the conjugate have a major importance in obtaining a valid result. Not taking this factors into consideration can lead to the possibility of obtaining false positive or false negative results. Even if a false positive result doesn't have too severe consequences a false negative one can have tragic outcomes if human victims are involved.

During the comparative study regarding the 3 types of conjugate used, the best results were obtained using the Bio-Rad conjugate, the results being far superior to the other two, offering a high intensity fluorescent signal next to a dark background, being capable to identify the viral antigen in 100% of the microscopes fields examined.

CHAPTER VI **„*Rabies diagnostic confirmation by rabies tissue culture infection test (RTCIT)*”** is structured in 3 subchapters and had the purpose to confirm the rabies diagnostic using RTCIT as an alternative method to the mouse inoculation test, to highlight the optimal cell line and also the ideal system for the isolation and multiplication of the rabies virus.

The researches performed during the subchapter **„*Isolation of rabies virus on cell cultures (RTCIT) as alternative to the mouse inoculation test*”** were done for all the 59 samples taken into study using the cell line N2a, with a concentration of 8x10⁵ cells/ml, in Labtek

chamber, using the Bio-Rad conjugate, the results being in accordance with those obtained by FAT. Taking into consideration the fact that rabies has a major medical impact for humans, even if false negative results are rare, an quick alternative method has to be available as a back-up, RTCIT meeting all the criteria.

The second subchapter, „**Comparative study regarding the sensitivity of two different cell lines N2a and BHK-21 used for isolation of rabies virus on cell cultures**” was realized with the purpose to evidentiate and confirm the optimal cell line for isolating and multiplication of the rabies virus on cell cultures. For this, a total of 20 samples were taken into study, two different cell lines being used: N2a and BHK-21. Regarding the cell line N2a, out of the 20 tested samples all (100%) were positive for a incubation period of 48h and 19 (95%) for 72h. In comparison for the cell line BHK-21, 19 (95%) samples were positive for a incubation period of 48 h and only 14 (70%) samples for 72 h.

Evaluating the results obtained for the 2 cell lines, we conclude that N2a is more sensitive for the multiplication of the rabies virus that BHK-21, being preferred the incubation period of 48 h. Although both cell lines are used as a reference for the rabies virus, the N2a cell line is more sensitive, the results being superior to those obtained for BHK-21 cell line.

The last subchapter „**The use of two different systems for the isolation of rabies virus on cell cultures**” had the purpose to achieve RTCIT using two different systems, namely: titration microplates (n= 96 wells) and Labtek glass chambers (n = 8 boxes) in the idea of observing and determining whether the rabies virus multiplied as well in both types of support. These investigations were performed on a total of 16 samples using the N2a cell line with different concentrations for the two systems mentioned above.

Thus, in the LabTek glass system, a single cell concentration of 8×10^5 cells/ml was used, with a 48 h incubation period, all 16 samples (100%) tested being positive, this system being typically used in the technique RTCIT to confirm the diagnosis of rabies.

The second ELISA microplate procedure was performed using 2 different cellular concentrations: 5×10^5 cells/ml and $2,5 \times 10^5$ cells/ml, with a 72h incubation period, each sample being inoculated in duplicate. Thus, for the cell concentration of 5×10^5 cells/ml, out of the 16 samples tested, 6 (37.5%) were negative and 10 (62.5%) positive, the same situation being recorded for the concentration of 2.5×10^5 cells/ml. The DR1025, DR1027, DR1028, DR1030 and DR1032 samples were negative for both cellular concentrations. For two more samples, the results were different. Thus, DR1029 was positive for the first cell concentration, but negative for the second. In contrast, DR1031 was negative for 5×10^5 cells/ml, but positive for $2,5 \times 10^5$ cells/ml.

The best results were obtained in the LabTek system, the cell concentration of 8×10^5 cells/ml being considered to be optimal for good isolation and multiplication of the rabies virus. With respect to plastic microplates, the results were inconsistent, yielding satisfactory results for cell concentrations per ml of 5×10^5 and 2.5×10^5 , but not for those below 2×10^5 cells/ml, since the small number of cells did not allow isolation, respectively multiplication of the virus, and their use is not recommended. The results obtained for microplates may have been influenced by repeated freezing and defrosting, along with storage conditions, resulting in a loss of infectivity.

CHAPTER VII entitled „***Rabies diagnosis confirmation by real-time PCR and conventional RT-PCR techniques***” was performed with the purpose to confirm the results obtained using the reference techniques as an additional lyssavirus detection tool.

Thus, RNA extractions of all of the 59 samples taken in the study were realized, followed by quantification of nucleic acids by *One step Real time SYBRGreen qRT-PCR* technique using a real-time cycler, obtaining a total of 43 positive and 16 negative samples, results consistent with those obtained from reference techniques. In the case of the samples tested, the determination coefficient R^2 had a value of 0.98-0.99, considered satisfactory and the PCR efficiency was ranged between 1-1.04 and was ideal for the standard curve. The fluorescence signal emitted by SYBRGreen coupled with the PCR product of the test samples was emitted between cycles 6-14, the C_t values obtained varied between 13.71 and 23.64 for confirmed positive samples, and the number of copies / reaction ranged between $1,37E + 05$ and $1.34E + 08$. These values indicate that some samples are more concentrated in the rabies virus than others, the concentration of samples being also reflected in the difference of number of cycles needed to obtain the fluorescent signal.

The next step consisted in partial amplification of the rabies virus N gene by means of a *conventional Heminested RT-PCR* using primer pairs JW12 / JW6 and JW12 / JW10, which allow specific amplification of the nucleoprotein for all 15 rabies virus species, a 606-bp amplification product was obtained. Following testing of 47 samples from the total of 59 included in our study, 43 were positive and 4 negative, consistent with IFD and RTCIT.

For complete N gene sequencing, it was amplified using also a *conventional Heminested RT-PCR* using JW12 / PVN8bis and M13-20JW12 / M13RevPVN8bis primers on a number of 43 samples, yielding a total of 41 positive and 2 negative samples.

The final step in this chapter consisted in performing the *TaqMan Real time qRT-PCR technique*, which aimed at framing samples in one of the genotypes 1 (RABV), 5 (EBLV-1) and 6 (EBLV-2) found in Europe by the use of LysGt1, LysGt5 and LysGt6 fluorescence probes, which allow specific amplification of rabies nucleoprotein genotypes.

For the detection of the first genotype RABV, the technique was performed on 47 samples (DR1016-DR1036, DR1187-DR1202, DR1331-DR1336, DR1343-DR1358), 43 of which were positive and 4 negative, C_t ranging between 19.57 and 26.97. For the detection of EBLV-1 and EBLV-2 genotypes 5, the technique was performed for the first samples studied in 2015, namely DR1016-DR1036, all samples being negative, except for positive controls that matched the standard.

The positive results obtained for the first genotype and negative for genotypes 5 and 6 confirm and frame the rabies virus isolates within the first RABV genotype.

CHAPTER VIII „***Molecular characterization of rabies virus strains from north-east of Romania and Republic of Moldova***” was performed with the purpose of realize sequencing and phylogenetic analysis of the partial and complete gene N. Of the total samples sent for sequencing at the Genoscreen Company in Lile, France, the sequence of 39 samples for the partial N gene and 37 samples for the total N gene was succeeded.

For the phylogenetic analysis, the genetic variability of the various isolates included in our study was assessed using the Neighbour Joining (NJ) method along with other programmes and softwares.

A phylogenetic tree was made for the partial and complete N gene in order to determine whether the generated tree show the same topology. Thus, it was performed by comparing the sequences obtained of the partial gene (n=39) and full (n=37) N gene with reference nucleotide sequences extracted from the GenBank international database. It was evaluated for all trees generated by the NJ method, tree confidentiality. The most commonly used statistical method, bootstrap, was calculated in the phylogenetic analysis program (MEGA6, the bootstrap option).

Following the phylogenetic analysis carried out in our study on samples from north-eastern Romania, but also from the Republic of Moldova, was showned a single phylogenetic group: NEE (North-Eastern Europe).

This group has a broad geographic distribution and has been identified over the years in various countries such as Poland, Estonia, Lithuania, Bulgaria, Eastern Slovakia, Ukraine and Russia, as demonstrated by Bourhy et al., 1999, Kuzmin et al., 2004, McElhinney et al., 2006, Picard et al., 2012 and Robardet et al., 2013. In these countries, the isolates came from both foxes and ratons, which highlights the fact that both species are reservoirs for this variant of the virus. In our study, the NEE group was identified in all tested species, namely: dog, cat, bovine, fox, wolf, deer and ferret, which demonstrates that this variant can adapt to different animal species.

Until now, the complete sequencing of rabies virus nucleoprotein has not been performed in our country, implicitly a related phylogenetic analysis, these being the first data reported so far. Regarding the results obtained for the studied samples from the Republic of Moldova, these are singular, so far no partial and full N nucleoprotein sequencing, respectively a phylogenetic analysis, has been carried out, with no knowledge of the variants of the rabies virus circulate on the territory of that country.

Regarding the phylogenetic analysis carried out for the N-E part of our country, the NEE phylogenetic group was identified, being first signaled for its presence in Botosani, Iasi, Vaslui, Galati and Vrancea counties. The complete sequencing of the nucleoprotein was performed for the first time on samples collected from our study areas, no complete sequences being reported until now.

CHAPTER IX, entitled „***The complete sequencing of rabies virus full genome***”, aimed to characterize the entire genome of the rabies virus by using a new generation of sequencing on a selective number of samples to identify possible pathogenicity changes at the animal species level and for a better understanding of the diversity of lyssaviruses.

Next generation sequencing was performed for the first time in our country and Republic of Moldova on samples from both domestic and wild animals.

Following the bioinformatic analysis undertaken, our samples showed a similarity percentage of the five rabies genes sequences between 96-100% for N, P and M genes, 97-100% for G gene and 97-99% for L gene.

As a consequence of studying the amino acid positions of the rabies virus gene G, known to be involved in pathogenicity, no changes have been identified that may suggest differences in pathogenicity at the animal species level.

For a better understanding of the diversity of lyssaviruses and pathogenicity differences, in-depth studies involving a larger geographic area and a larger number of samples are required.

CHAPTER X „*Researches regarding the surveillance and control strategy of animals rabies infection in the north-east of Romania*” aimed at verifying the effectiveness of surveillance campaigns in the north-east of our country by determining the post-vaccine antirabies antibodies and determinate the vaccine marker in foxes. Also, in order to confirm or not the hypothesis that wild boar would be potential competitors for these baits, a number of samples have been collected and tested in this respect.

Within the first subchapter „*Detection of antirabies antibodies and determination of tetracycline in foxes*”, the study area was represented by the eight counties in the Moldavian region of our country, together with the Maramureş and Buzău counties, where oral rabies vaccination was performed in foxes, 392 samples of thoracic liquid and 72 mandible samples were tested.

Detection and titration of antirabies antibodies for 392 samples was performed by ELISA method, 345 of which were processed using the BioPro Rabies ELISA Ab kit (BioPro, Prague, Czech Republic) and the remaining 47 using the Platelia™ Rabies II kit for veterinary use (BioRad, France) kit.

Thus, in the first kit, out of the 345 samples of foxes, 98 were positive (28.40%) and 247 negative (71.60%). Of the 345 samples of foxes processed, 247 (71.60%) recorded a PB <40%, 47 (13.62%) were in the category of a PB of 40-70% and the remaining 51 (14.78%) in the latter category with a PB > 70%. A sample is considered positive if PB is equal to or greater than 40% and negative if PB is less than 40%, in order to evaluate the effectiveness of vaccination campaigns, with a PB value of $\geq 40\%$ recommended.

Following testing of the 47 samples via the Platelia Rabies kit, 14 of these were positive and 33 negative for antirabies detection. Out of the total of 47 samples tested using this kit, none of the samples were in the first category of > 4 EU / ml, and for 24 of them there was no evidence of seroconversion, being below 0.125 EU / ml. An insufficient level of antirabies antibodies was detected in 9 samples, ranging from 0.125-0.5 EU / ml, considered to be nonprotective in the case of rabies virus infection. Only 14 samples ranged from 0.5-4 EU / ml, with an antibody titer sufficient to contracting a rabies virus infection.

As for the determination of the tetracycline vaccine marker in the teeth or fox mandibles, out of a total of 72 samples tested, 60 of these were positive and 12 negative. In our samples, fluorescent lines in the cement were detected only in 2 samples out of the total of 72, in dentine 33 samples, and 60 in the bone. Regarding the intensity of the detected fluorescence signal, it ranged from + for 17 samples, ++ for 13 samples and +++ for 30 samples.

The second subchapter „*Detection of antirabies antibodies in wild boars*” was made in order to determine whether wild boar interfere with the effectiveness of these campaigns by the uncontrolled consumption of vaccine baits, in this sense being tested 312 samples (serum

and thoracic liquid) resulting from the hunting campaigns carried out during the period 2014-2016.

Thus, of the 312 samples of wild boars tested, 132 were positive (42,30%) and 180 negative (57,70%) by ELISA serological method. To assess the sensitivity of the ELISA, 56 of the positive confirmed samples in this test were tested in parallel and using the FAVN reference technique, with a sensitivity of 96.43%. For 2 of the 56 samples tested by FAVN, the antibody titre was 0,02 IU / ml and 0,22 IU / ml respectively, with results inconsistent with those obtained in ELISA.

Detection of antirabies antibodies from wild boar samples by ELISA revealed a surprising number of positive samples (132/312), these being the first data reported in this species to date in our country. Our results highlight the fact that these wild animals represent a real danger to the good outbreak of fox oral vaccination campaigns, being the main competitors for bait consumption.

In conclusion of these researches, a number of 24 final conclusions are summarized.

PARTEA I

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I
PARTICULARITĂȚI PRIVIND ETIOLOGIA ȘI CARACTERELE
EPIDEMIOLOGICE ALE INFECȚIEI RABICE LA ANIMALE
CHAPTER I
PARTICULARITIES ON THE ETHIOLOGY AND
EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE RABIES
INFECTION IN ANIMALS

Rabia sau turbarea este una dintre cele mai grave zoonoze, ce afectează toate animalele homeoterme și omul, fiind produsă de un virus neurotrop din ordinul *Mononegavirales*, familia *Rhabdoviridae*, genul *Lyssavirus* (OIE, 2013; OMS, 2017(c)), ce se caracterizează prin grave tulburări nervoase și agresivitate, înregistrând o letalitate de 100% (Ștefan N., 2000).

1.1 Etiologie

1.1.1 Structura și morfologia virusului rabic

Virusul rabic este de tip ARN, monocatenar, de sens negativ, cu profil de glonte sau clopot (ICTV, 2011; Militaru ș.a., 2014), având dimensiuni cuprinse între 100-430 nm lungime și 45-100 nm lățime (ICTV, 2011). Greutatea unui singur virus a fost estimată la aproximativ 221 kilodaltoni (kDa), mai puțin de 2% fiind reprezentat de ARN-ul viral (CDC, 2017; ICTV, 2011). Acesta are două componente structurale și funcționale majore, și anume: o nucleocapsidă, ce conține un complex ribonucleoproteic (RNP) și o anvelopă virală (Medeiros Caporale ș.a., 2009). Cea din urmă este acoperită cu proiecții asemănătoare vârfurilor care corespund trimerilor proteinei G, ce recunosc și leagă receptorii celulelor. RNP are o structură elicoidală și este compus din ARN în asociere intimă cu nucleoproteina N, polimeraza L și proteina cofactorială P, asigurând transcripția și replicarea genomului în citoplasmă (Kouznetzoff, 1998; Liu ș.a., 2004; Rabies-Bulletin-Europe, 2017).

1.1.2 Proteinele virusului rabic

Genomul virusului rabic este compus din 12 kilobaze (12.000-pb), este nesegmentat, cu polaritate negativă ce codifică 5 proteine virale: nucleoproteina N, fosfoproteina P, proteina matrice M, glicoproteina G și polimeraza L (Chantal ș.a., 1985; Conzelmann ș.a., 1990; Gavier-Widen ș.a., 2012; Militaru ș.a., 2014; Deviatkin ș.a., 2017; Troupin ș.a., 2016), acestea reprezentând 65-75% din greutatea virusului, restul fiind completate de către lipide și carbohidrați (ICTV, 2011).

Nucleoproteina N este componenta majoră a nucleocapsidei virale, fiind a doua cea mai studiată proteină după glicoproteina G în ceea ce privește structura, funcția antigenică și imunogenică (Tordo, 1999), fiind și cea mai utilizată în realizarea analizei filogenetice (Deviatkin ș.a., 2017). Astfel a fost demonstrat faptul că, aceasta codifică o proteină internă

implicată în reglarea transcripției și replicării, un factor important în adaptarea la specie (Dietzschold ș .a.,1987; Kissi ș.a., 1995; Bourhy ș.a., 1999). Aceasta conține 450 de aminoacizi fosforilați, având o greutate moleculară cuprinsă între 47-72 kDa (Tordo, 1986).

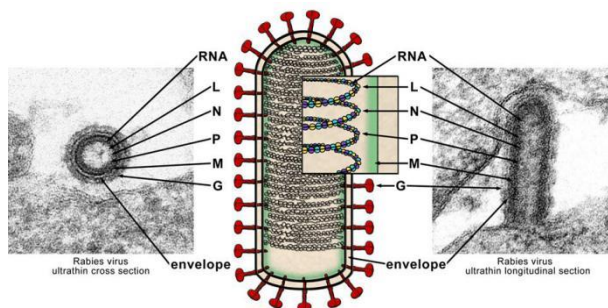


Fig. 1.1 Secțiune transversală și longitudinală a virusului rabic

Fig. 1.1 Cross and longitudinal section of rabies virus

(Sursa: <http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/virus-structure>)

Fosfoproteina P conține 297 de aminoacizi și are o greutate moleculară cuprinsă între 20-30 kDa. Aceasta acționează ca o escortă în timpul sintezei nucleoproteinei, prin formarea de complexe N-P, prevenind polimerizarea acestora și legarea nespecifică de ARN-ul celular (ICTV, 2011).

Glicoproteina G are o greutate moleculară cuprinsă între 65-90 kDa, este localizată în anvelopa virală și a fost demonstrat faptul că, joacă un rol important în patogenitatea virală și în neurotropismul virusului. Aceasta se leagă de receptorii celulei gazdă, participă la inducerea anticorpilor neutralizanți, induce endocitoza virală, după care mediază fuziunea membranelor virale și endozomale (Ito ș.a., 2001). Unele studii raportate de către Dietzschold ș.a., 1983, Seif ș.a., 1985, Tuffereau C ș.a., 1985, au arătat faptul că, aminoacidul de la poziția 333 (arginina sau lizina) al proteinei G este un determinant al virulenței virusului fix pentru șoarecii adulți. Tulpinile mutante, de exemplu, care posedă alt tip de aminoacid la aceeași poziție cauzează o infecție neletală, nefiind astfel recunoscute de către receptori. Din acest motiv, unele tulpini vaccinale atenuate (ex. HEP, Kelev), dețin o mutație la poziția 333 (Tordo, 1999, Ito ș.a., 2001).

Proteina matrice M este cea mai mică dintre proteine, cu un conținut de 202 aminoacizi și o greutate moleculară de 25 kDa. Este cea care dă forma caracteristică de glonte, virusului. Aceasta joacă un rol intermediar între ribonucleocapsidă și membrana virală, participă la inhibiția transcripției și replicării în celula gazdă și are un rol important în morfogeneza virusului (Tordo, 1999). M se leagă de nucleocapside și de domeniul citoplasmatic al lui G, facilitând în final procesul de înmugurire (ICTV, 2011).

Polimeraza L ce conține 2142 aminoacizi și are o greutate moleculară cuprinsă între 220-240 kDa, ocupă mai mult de jumătate (54%) din genomul virusului rabic, fiind și proteina cea mai puțin studiată. Este responsabilă de majoritatea activităților enzimactice în transcripția și replicarea ARN-ului viral (Tordo, 1999; ICTV, 2011).

1.1.3 Ciclul de infecție și replicare al virusului rabic

CDC (2017) a divizat întregul proces de infecție și evoluția acestuia în mai multe etape: absorbție, pătrunderea virusului, decapsidare, transcripție, translație, procesare, replicare, asamblare și încapsidare (Fig. 1.2).

Absorbția este mediată de atașarea glicoproteinei de receptorii celulari de suprafață. Virusul pătrunde în celulele gazdă și intră în citoplasmă prin endocitoză. Ph-ul scăzut din interiorul endozomului provoacă fuziunea dintre membranele endozomale și virale, având ca și rezultat decapsidarea, ca urmare a eliberării RNP-ului viral în citoplasmă (ICTV, 2011; CDC, 2017).

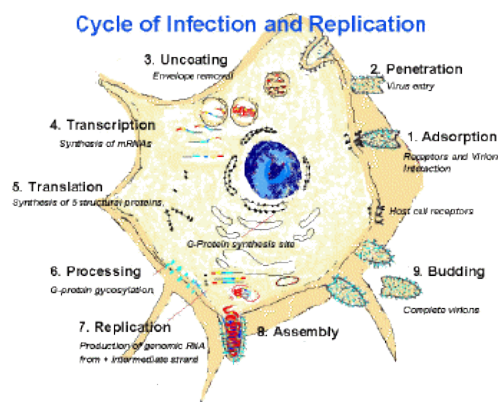


Fig. 1.2 Ciclul de infecție și replicare a virusului rabic

Fig. 1.2 Rabies virus cycle of infection and replication

(sursa: <https://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html>)

Ulterior, are loc transcripția ARN-ului mesager pentru a permite replicarea virusului. O polimerază virală codificată, transcrie componenta genomică a ARN-ului virusului rabic în ARN lider (principal) și în cinci ARN-uri mesagere acoperite și poliadenilate, care sunt traduse în proteinele N, P, M, G și L. Replicarea virală este urmată de procesul de asamblare și încapsidare. Complexul N-P-L încapsulează catena negativă a genomului ARN pentru a forma nucleul RNP, iar proteina M formează o capsulă sau o matrice în jurul RNP. În membrana plasmatică, complexul M-RNP se leagă cu glicoproteina, unde mai departe virusul se desprinde de acest complex (ICTV, 2011; CDC, 2017).

1.1.4 Încadrarea genetică

Conform ICTV (2017), Familia *Rhabdoviridae* cuprinde 18 genuri, printre care și *Lyssavirus*. În cadrul acestui gen, este încadrat virusul rabic, alături de virusuri înrudite cu acesta, denumite și pararabice, ce produc simptome ce nu se pot diferenția de turbare (Woldehiwet, 2005).

Genul a fost mai departe separat în 7 genotipuri, pe baza secvențelor nucleotidice și a similarității aminoacizilor nucleoproteinelor (Bourhy ș.a., 1993; Bourhy ș.a., 2005; Wakeley ș.a., 2005). Până în prezent, au fost descrise 7 genotipuri și 14 specii de virus rabic și a 15-a specie în așteptare (Fig. 1.3). Aceste 7 genotipuri au fost la rândul lor încadrate în două mari filogrupuri, bazate pe distanța genetică (ICTV, 2016).

Astfel, filogrupul I cuprinde: genotipul 1 (virusul rabic clasic RABV), genotipul 4 (virusul Duvenhage), genotipul 5 (European bat lyssavirus, tipul 1), genotipul 6 (European bat lyssavirus, tipul 2) și genotipul 7 (Australian bat lyssavirus), iar filogrupul II: genotipul 2 (Lagos bat virus) și genotipul 3 (Mokola) (Wakeley ș.a., 2005; Dietzgen ș.a., 2012).

Genotipul 1 reprezentat de virusul rabic clasic (RABV), are o distribuție globală, cu excepția unor insule și teritorii care au reușit eradicarea bolii (Murphy ș.a., 1999).

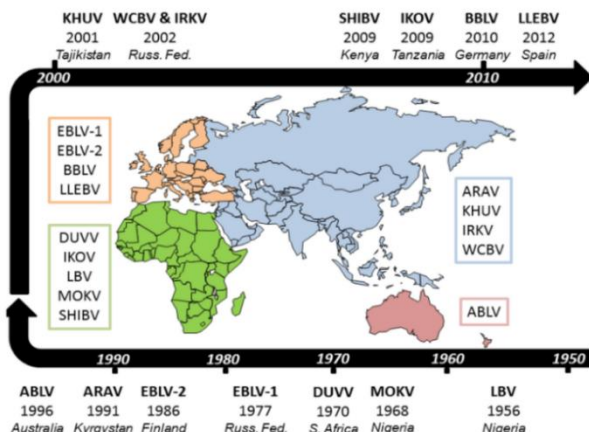


Fig. 1.3 Cele 15 specii de virus rabic și zonele geografice aferente izolării acestora
 Fig. 1.3 The 15 rabies virus species and their geographical origin
 (Sursa: Banyard ș.a., 2014)

Genotipul 2 Lagos a fost izolat pentru prima oară în anul 1956 în Insula Lagos din Nigeria la liliacul frugivor *Eidolon helvum* de către Boulger și Porterfield și ulterior în anul 1974 de către Sureau ș.a. în Africa Centrală la liliacul *Micropterus pusillus* (Sureau ș.a., 1980).

Genotipul 3 Mokola a fost izolat în anul 1968 la un chițcan și un copil în Nigeria (Shope ș.a., 1970; Kemp ș.a., 1972), în anul 1971 la o fată (Familusi ș.a., 1972) și ulterior la pisici în Zimbabwe (Von Teichman ș.a., 1998).

Genotipul 4 Duvenhage a fost izolat de la un om care a murit după ce a fost mușcat de un liliac în Africa de Sud în anul 1970 (Meredith ș.a., 1971), dar și de la liliacul din specia *Miniopterus* în anul 1981 (Van der Merwe, 1982; Williams ș.a., 2001; Acha ș.a., 2005).

Genotipul 5 EBLV-1 a fost izolat la liliecii *Eptesicus serotinus* în anul 1968 în Germania, în anul 1985 în Polonia, în anul 1987 în Danemarca, Olanda și Spania și în anul 1989 în Franța (Banyard ș.a., 2014). De asemenea, alte izolate ce au evidențiat genotipul 5 au fost raportate la lilieci în Ucraina, dar și la un caz la om în urma unei mușcături de liliac în Rusia în anul 1985 (Selimov ș.a., 1989; Selimov ș.a., 1991).

Genotipul 6 EBLV-2 a fost izolat în anul 1985 la un om în Finlanda și la lilieci în Olanda, Elveția și Marea Britanie, acest genotip fiind în principal întâlnit la liliecii din genul *Myotis dasycneme* și *Myotis daubentonii* (Lumio ș.a., 1986).

Genotipul 7 ABLV a fost izolat la 5 specii de megalilieci din genul *Pteropus*, o specie de lilieci insectivori și de la 2 oameni infectați în anul 1996 pe teritoriul Australiei (Fraser ș.a., 1996; Gould ș.a., 1998; Bradley ș.a., 2000; Si ș.a., 2016).

În anul 2003 a fost propus un nou genotip Aravan, în urma izolării virusului la un liliac *Myotis blythi* în Kârgâstan. În urma profilului antigenic a fost demonstrat faptul că, acest izolat este diferit de virusul rabic clasic și de genotipurile 2, 3, 4, 5 și 6 (Arai ș.a., 2003).

Cele 14 specii de virus rabic sunt reprezentate de către: virusul rabic clasic RABV (distribuție globală cu excepția unor insule), virusul Aravan ARAV (Asia Centrală), virusul izolat de la un liliac în Australia ABLV (Australia), virusul Duvenhage DUVV (Africa de Sud),

virusul izolat de la lilieci în Europa tipul 1 EBLV-1 (Europa), virusul izolat de la lilieci în Europa tipul 2 EBLV-2 (Europa), virusul Irkut IRKV (Siberia de Est), virusul Khujand KHUV (Asia Centrală), virusul Lagos LBV (Africa), virusul Mokola MOKV (Africa), virusul Shimoni izolat de la lilieci SHIBV (Africa de Est), virusul caucazian de vest izolat la lilieci WCBV (Regiunea caucaziană), virusul Bokeloh izolat la lilieci BBLV (Europa), virusul Ikoma IKOV (Africa), respectiv virusul Lleida izolat la lilieci LLBV (Europa) în curs de omologare (ICTV, 2016; Marston ș.a., 2012) (Fig. 1.4).

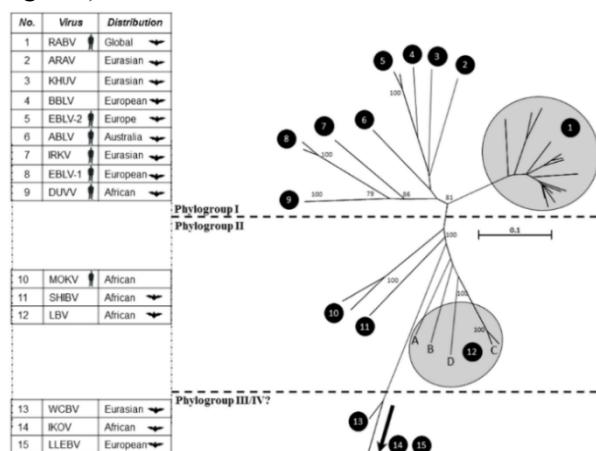


Fig. 1.4 Analiza filogenetică a Lyssavirusurilor / Fig. 1.4 Phylogenetic analysis of the Lyssaviruses
(Sursa: Banyard AC ș.a., 2014)

1.1.5 Rezistența virusului rabic la factorii fizici și chimici

În ceea ce privește temperatura, virusul rabic este distrus relativ rapid de acțiunea luminii solare și a căldurii, conservându-și în schimb foarte bine capacitatea virulentă la temperaturi scăzute și la îngheț, pe perioade îndelungate (Gamet, 1973). Procesele proteolitice, alături de congelările și decongelările repetate duc la pierderea infectivității. În interiorul cadavrelor, virusul poate rezista până la 45 de zile, pe când în saliva eliminată în mediul extern maxim 24 de ore (Nicolau, 1972; Perianu, 2012).

O serie de cercetări au fost întreprinse de-a lungul timpului privind rezistența virusului la diferite variații de temperaturi și condiții. Astfel, într-un studiu efectuat de către Soave în anul 1966, virusul rabic a fost detectat în creierul șoricelului la 8 zile după moartea acestuia menținut la temperatura de 25°C și după 20 de zile la 10°C, 8 ani mai târziu fiind confirmat și de către Lewis și Thacker. Burkel ș.a. în anul 1970, în urma menținerii de carcase provenite de la sconșii diagnosticați cu rabie, la temperaturi exterioare cuprinse între 10-29°C, au reușit să detecteze antigenul virusului rabic prin intermediul imunofluorescenței directe (IFD) la 42 de ore după expunerea la aceste temperaturi.

De asemenea, raportări similare au fost făcute și de către Albas ș.a. în anul 1999, cu pierderea infectivității țesuturilor cerebrale după 48 de ore menținute la temperaturi de peste 25°C. Raportări recente privind rezistența virusului rabic la diferite variații de temperaturi au fost făcute de către McElhinney ș.a. în anul 2014 care au demonstrat faptul că, virusul poate rezista în creier până la 18 zile la 4°C și 3 zile la 35°C.

Virusul este sensibil la o serie de substanțe cu rol distructiv rapid. Printre acestea se numără: eterul, acetona, cloroformul, formolul 1%, acidul acetic și acidul clorhidric 1%, creolina 1%, sublimatul 1%, hipocloritul de sodiu, etanolul 45-75% și fenolul (Perianu, 2012; OIE, 2013).

1.2 Caractere epidemiologice

1.2.1 Receptivitate

Toate speciile de mamifere homeoterme sunt susceptibile la infecția cu virusul rabic, și în cazuri foarte rare păsările (Baby ș.a., 2015), însă doar câteva dintre acestea reprezintă un rezervor important al bolii (Perianu, 2012).

Dintre toate rezervoarele, câinele este responsabil de 95% dintre decesele în rândul oamenilor (OMS, 2017a).

Rezervoarele virusului rabic clasic diferă însă în funcție de regiunea geografică, astfel:

- ❖ în Europa, acestea sunt reprezentate de către vulpea roșie (*Vulpes vulpes*) și de către raton (*Nyctereutes procyonoides*);
- ❖ în Africa, de către câine (*Canis lupus familiaris*), șacal (*Canis adustus*, *Canis mesomelas*) și mangustă (*Herpestes*);
- ❖ în Asia, de către câine, vulpea roșie, nevăstuica (*Melogale moschata*) și șacalul auriu (*Canis aureus*);
- ❖ în America de Nord, de către ratoni (*Procyon lotor*), vulpea argintie (*Urocyon cinereoargenteus*), sconcs (*Mephitis mephitis*), coiot (*Canis latrans*) și lilieci (Kunz ș.a., 2009);
- ❖ în America de Sud, de către câine, vulpea de pădure (*Cerdocyon thous*) și saguin (*Callithrix jacchus*);
- ❖ în Insulele Caraibe, de către câine și mangusta indiană pitică (*Herpestes auropunctatus*);
- ❖ iar în Eurasia și America arctică și regiunile subarctice de către vulpea arctică (*Alopex lagopus*) (Fig. 1.5) (Woldehiwet, 2005; Rabies-Bulletin-Europe, 2017; Singh ș.a., 2017).



Fig. 1.5 Rezervoarele de virus rabic clasic și distribuția acestora la nivel mondial

Fig. 1.5 Rabies virus reservoirs and their worldwide distribution

(Sursa: <http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/epidemiology-rabies>)

1.2.2 Surse de infecție și căi de transmitere

Pentru ca virusul rabic să pătrundă în organism este nevoie de o poartă de intrare (Ionescu, 1952). Astfel, în marea majoritate a cazurilor, atât animalele cât și oamenii se infectează în urma mușcăturilor provenite de la animalele infectate sau în urma zgârieturilor, ce conțin saliva infectantă, cele mai periculoase fiind cele produse de pisici, de cele mai multe ori multiple și profunde, lezionând un număr considerabil de filete nervoase (Perianu, 2012).

A fost demonstrat de-a lungul timpului faptul că, cu cât localizarea mușcăturilor sau a zgârieturilor provocate de către animalele infectate sunt mai aproape de sistemul nervos central, cu atât perioada de incubație este mai scurtă (Ionescu, 1952).

În rare ocazii, transmiterea poate avea loc și prin intermediul aerosolilor, pe cale nazală, orală, oculară, transplant de organe și cornee (Johnson ș.a., 2005; Kusne ș.a., 2005; Woldehiwet, 2005; Bronnert ș.a., 2007; Vora ș.a., 2013; Chacko ș.a., 2017; Saeed ș.a., 2017). Bineînțeles, oamenii se pot infecta cu saliva animalelor infectate și prin existența unor mici abraziuni sau zgârieturi la nivelul pielii, conjunctivei, mucoasei orale și chiar genitale sau prin manipularea și jupuirea pielii, respectiv a blănii animalelor infectate. Foarte important de precizat însă că, virusul rabic nu poate penetra pielea intactă (Rabies-Bulletin-Europe, 2017).

Saliva animalelor infectate este considerată a fi virulentă cu 14 zile înainte de apariția semnelor clinice (Carp-Cărare ș.a., 2001), însă a fost demonstrat faptul că, eliminarea virusului prin salivă are loc în proporție de 60-70% din cazurile de rabie la câini, astfel încât unele mușcăături nu sunt infectante (Perianu, 2012).

Consumul de carne crudă sau de alte țesuturi și organe provenite de la animalele infectate, nu reprezintă o sursă de infecție, dar cu toate acestea nu este recomandat. De asemenea, contactul ocazional, cum ar fi atingerea unei persoane infectate sau contactul cu urina și fecalele animalelor bolnave nu sunt posibile (OIE, 2013).

Au fost raportate excepțional și mușcăături provocate de către oamenii turbați, constituind același pericol ca și o mușcătură de animal și implică respectarea aceluiași protocol (Ionescu, 1952).

1.2.3 Dinamica bolii

Rabia este o zoonoză răspândită pe tot globul și poate căpăta un caracter sporadic, enzootic sau epizootic (Perianu, 2012).

Încercările de decimare ale populațiilor de vulpi întreprinse la nivel mondial au fost în zadar, singura metodă considerată eficientă pentru eliminarea acestei boli fiind reprezentată de către vaccinarea orală a acestor animale, alături de obligativitatea vaccinării animalelor de companie (Cliquet ș.a., 2004). În urma implementării programelor de supraveghere și control a rabiei la vulpi, considerat a fi rezervorul silvatic al acestei boli, multe dintre țări au reușit să obțină statutul de țară liberă de rabie. În ciuda existenței unor astfel de programe, Asia și Africa în special, se confruntă cu o problemă scăpată de sub control în ceea ce privește rabia la animale și la oameni.

Conform unei statistici organizate de către OMS, cel mai ridicat risc de mortalitate umană se înregistrează în Asia și Africa, cu peste 95% din totalul de cazuri, fiind totodată și regiunile unde rabia în rândul câinilor este scăpată de sub control (Fig. 1.6). Luând în

considerare situația acestor continente, vaccinarea în masă a populațiilor de câini este privită ca fiind singura modalitate eficientă de a întrerupe ciclul infecțios al bolii între animale și oameni.

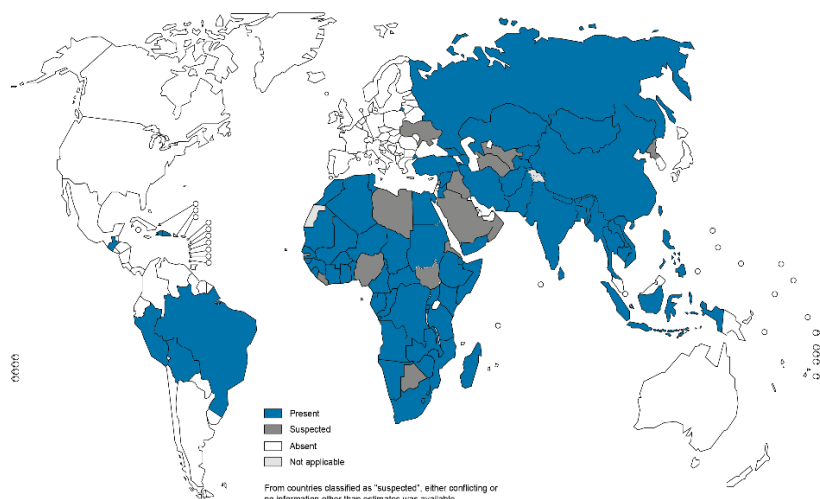
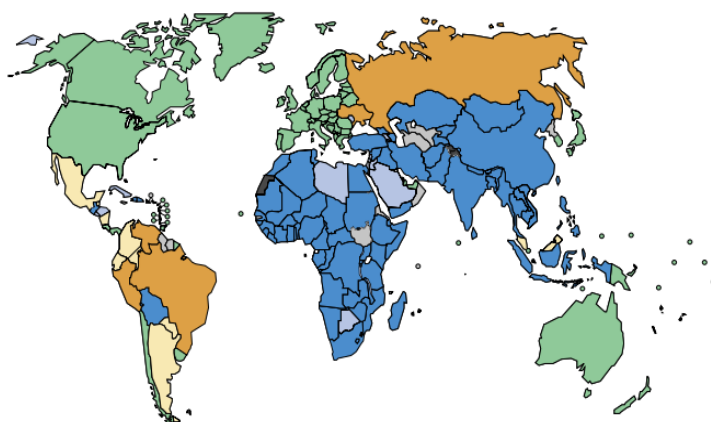


Fig. 1.6 Zonele geografice unde au fost raportate cazurile de rabie la om în urma contactului cu câini infectați în perioada 2010-2014. Albastru: prezența bolii; Gri: Suspiciune; Alb: Absent

Fig. 1.6 Geographical distribution of rabies human cases after dog contact during 2010-2014. Blu: present; Gray: suspected; White: absent.

(Sursa: <http://www.who.int/rabies/epidemiology/en/>)

În urma vaccinării în masă a câinilor în zonele cu risc crescut al infecției rabice, cum ar fi unele regiuni din America latină, dar și din Rusia s-a reușit menținerea sub control a cazurilor de rabie la câini și oameni, pe parcursul anului 2016, cazurile fiind sporadice (Fig. 1.7).



Albastru închis: cazuri pozitive de rabie la oameni în urma contactului cu câinii infectați

Albastru deschis: prezența rabiei la câini, absența rabiei la oameni

Maro: cazuri sporadice

Bej: Cazuri limitate de rabie la câini; absența rabiei la oameni

Verde: Absența cazurilor de rabie la câini și oameni, cu excepția celor importate

Gri: Lipsă informații

Fig. 1.7 Cazurile de rabie raportate la om în urma contactului cu câinii infectați în anul 2016

Fig. 1.7 Rabies cases reported in human after infected dog contact in 2016

(Sursa: WHO, 2017)

Țara noastră dispune începând cu anul 2011 de un „*Program strategic privind supravegherea, controlul și eradicarea turbării la vulpe*” aprobat pentru o perioadă de 10 ani, program ce presupune distribuția bianuală de momeli vaccinale atât pe cale aeriană, cât și direct în vizuini, vulpilor.

Cu toate că, România a fost una dintre cele mai afectate țări de rabie la nivel european pe parcursul ultimilor decenii, odată cu implementarea acestui program, numărul cazurilor pozitive de rabie în rândul animalelor a început să scadă simțitor (Fig. 1.8).

Întrucât țara noastră este înconjurată de țări unde rabia este prezentă în rândul animalelor, obținerea unui statut de țară indemnă este mult mai dificilă de dobândit. Chiar dacă, o parte dintre granițele din sud-estul României sunt de natură fluvială, iar apa este considerată o barieră naturală, trebuie luat în considerare faptul că, aceasta nu este una absolută, permițând circulația animalelor pe timp de iarnă când apa îngheață, ducând astfel la răspândirea bolii dintr-o regiune geografică în alta.

În urma unei analize epidemiologice întreprinse în cadrul acestei teze în nord-estul țării în perioada 2010-2016, cele mai afectate animale de rabie au fost reprezentate de către vulpi, cunoscute ca și rezervor silvatic la bolii, respectiv de către bovine și ulterior de câini.

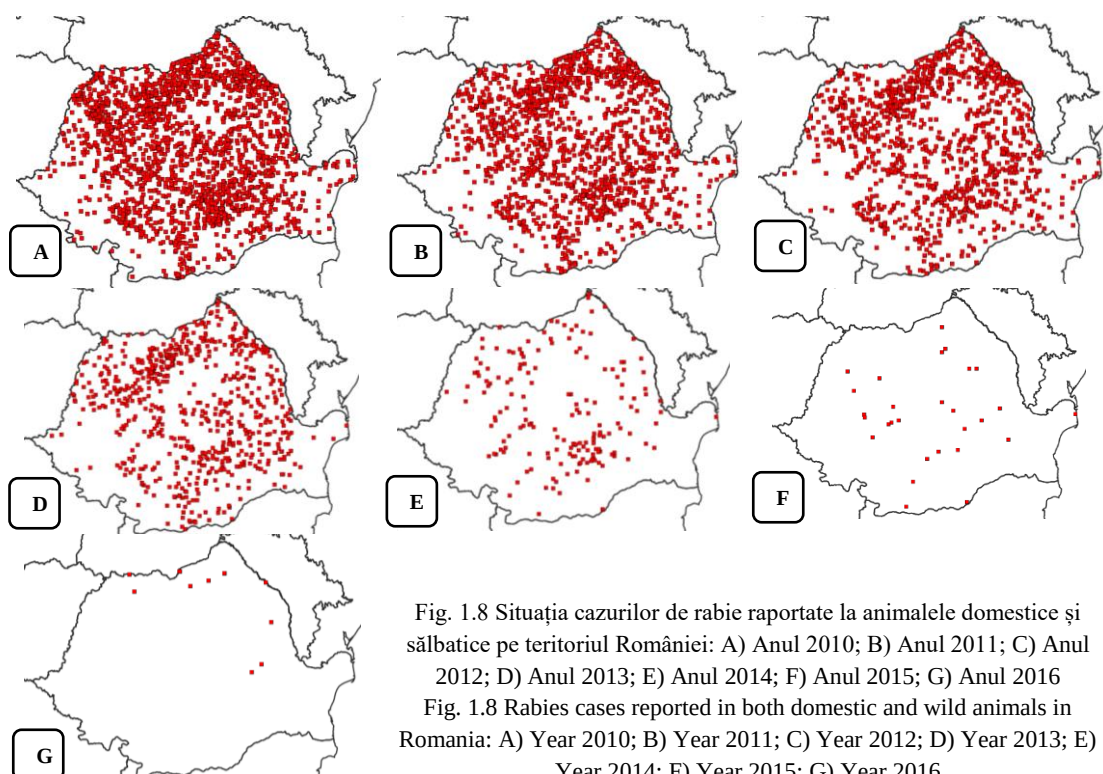


Fig. 1.8 Situația cazurilor de rabie raportate la animalele domestice și sălbatice pe teritoriul României: A) Anul 2010; B) Anul 2011; C) Anul 2012; D) Anul 2013; E) Anul 2014; F) Anul 2015; G) Anul 2016

Fig. 1.8 Rabies cases reported in both domestic and wild animals in Romania: A) Year 2010; B) Year 2011; C) Year 2012; D) Year 2013; E) Year 2014; F) Year 2015; G) Year 2016

(Sursa: <http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/queries>)

În ceea ce privește situația cazurilor de rabie raportate în rândul oamenilor pe teritoriul țării noastre, conform unor rapoarte întocmite de către Institutul Național de Sănătate Publică în perioada 2010-2015, începând cu anul 2008 au fost înregistrate 5 cazuri de rabie, toate soldate cu decesul acestora.

Cazul înregistrat în anul 2008 a fost confirmat la un bărbat în vârstă de 40 de ani, care a fost mușcat de un lup și a decedat la câteva săptămâni în ciuda profilaxiei aplicate, urmând ca în anul 2009 să fie raportată din nou rabia, de data aceasta la o femeie în vârstă de 69 de ani din județul Vâlcea, în urma unei mușcături de vulpe, neprezentându-se la medic pentru efectuarea vaccinului antirabic.

Din nefericire, alte două cazuri au fost raportate în anul 2010, fiind și singurele cazuri de rabie înregistrate în acel an pe teritoriul Europei. Astfel, primul caz a fost raportat la o fetiță în vârstă de 11 ani din județul Giurgiu, care fusese mușcată de o pisică, iar întrucât nu s-a prezentat la centrul de vaccinare antirabice pentru efectuarea vaccinului antirabic, a survenit în cele din urmă decesul. Cel de-al doilea caz a fost confirmat la o fetiță de 10 ani din județul Olt. Aceasta fusese internată cu suspiciunea de botulism și PAF, fiind ulterior infirmate în urma testelor de laborator. Pacienta a decedat în cele din urmă, confirmându-se diagnosticul de rabie, din ancheta epidemiologică nereieșind un eventual contact al acesteia cu animale.

Ultimul caz de rabie raportat în țara noastră a fost confirmat la o fetiță de 6 ani din județul Bacău în urma unei mușcături în zona capului provenite de la un câine turbat în data de 16 decembrie 2011. În ziua imediat următoare i s-a toaletat plaga și i s-a administrat vaccinul antitetanos. În perioada 20-21.02.2012, aceasta s-a prezentat la spital cu febră, vărsături, agitație, insomnie, hidrofobie, sialoree și contracții la nivelul extremităților, iar 4 zile mai târziu au apărut halucinațiile, iar ulterior aerofobia și crize de apnee, urmate de decesul acesteia.

Până în prezent, în literatură au fost recunoscute 6 cazuri de rabie în rândul oamenilor care au supraviețuit infecției cu virusul rabic cu sau fără aplicarea profilaxiei postexpunere. În anul 2004, o fată din Statele Unite ale Americii a devenit prima persoană ce a supraviețuit rabiei fără implementarea unei profilaxii postexpunere. Alte 2 cazuri similare au fost raportate în anii 2009 și 2011, fiind instituit un protocol complex Milwaukee, alături de inducerea comei, persoanele în cauză supraviețuind acestei zoonoze letale (Hattwick ș.a., 1972; Porras ș.a., 1976; Alvarez ș.a., 1994; Madhusudana ș.a., 2002; CDC, 2004; Willoughby ș.a., 2005, CDC, 2012; OMS, 2017(b)).

CAPITOLUL II
ACTUALIZĂRI PRIVIND METODOLOGIA DE DIAGNOSTIC,
SUPRAVEGHERE, CONTROL ȘI ERADICARE A RABIEI LA
ANIMALE
CHAPTER II
UPDATES REGARDING RABIES DIAGNOSTIC METHODOLOGY,
SURVEILLANCE, CONTROL AND ERADICATION IN ANIMALS

Realizarea unui diagnostic precis și rapid al rabiei la animale este esențială pentru aplicarea din timp a profilaxiei postexpunere în rândul oamenilor atunci când se impune. Chiar dacă anumite semne clinice caracteristice, precum schimbarea comportamentului cu evoluție spre agresivitate, dificultăți în deglutiție și apariția hipersalivației ne pot îndrepta către suspiciunea de rabie, singurul mod de confirmare se realizează prin efectuarea testelor de laborator recunoscute și recomandate de către OIE și OMS.

2.1 Metodologia de diagnostic

Probe recoltate pentru efectuarea diagnosticului

Probe de creier

În realizarea unui diagnostic post-mortem, proba principală este reprezentată de către creier, organ pentru care virusul are tropism (Bourhy ș.a., 1990; Morse, 1993). Literatura de specialitate abundă în informații privind modul de recoltare a creierului sau zonele de elecție ce trebuie testate pentru o optimă detecție a virusului rabic. În creier, virusul se găsește cu precădere în hipocamp, trunchi cerebral, cortex cerebral, scoarță cerebrală și cerebel (Woldehiwet, 2005).

Ani la rând, cornul lui Ammon sau hipocampus a fost considerat ca fiind zona de elecție pentru virusul rabic, însă numeroase cercetări au scos la iveală faptul că, alte structuri ale SNC sunt mult mai sensibile pentru multiplicarea acestuia.

Astfel, într-un studiu publicat de către Tepsumethanon ș.a. în anul 1997, în care au fost testate un număr de 8987 de probe de creier, au arătat faptul că, porțiunea cea mai sensibilă este reprezentată de către trunchiul cerebral. De asemenea, Bingham ș.a. în anul 2002, au demonstrat că, talamusul și bulbul rahidian sunt mult mai afectate, înregistrând o pozitivitate de 97,8%, comparativ cu cornul lui Ammon de doar 85,7%. Cu toate acestea, în cadrul laboratoarelor, se preferă pentru siguranță, recoltarea de probe din fiecare porțiune a țesutului cerebral, pentru a nu rămâne zone neexamine.

În realizarea unui diagnostic ante-mortem în cazul oamenilor, detecția virusului sau al ARN-ului viral se poate realiza din salivă, biopsie cutanată sau din celulele epiteliale ale corneei (Rabie-Bulletin-Europe, 2017).

Biopsia cutanată

Efectuarea de biopsii cutanate nu este una dintre cele mai indicate metode, ținând cont de faptul că de-a lungul cercetărilor raportate, aceasta a înregistrat o pozitivitate oscilantă cuprinsă între 60-100%, însă poate fi implementată pentru orientarea diagnosticului, atunci când nu există altă alternativă. Zona propice în efectuarea biopsiilor este reprezentată de către zona gâtului, virusul rabic fiind izolat din celule epiteliale și din rețeaua nervoasă din jurul foliculilor, așa cum a fost arătat de către Smith ș.a., 1972, Bryceson ș.a., 1975 și Blenden ș.a., 1983. Majoritatea rezultatelor pozitive au fost obținute însă, în cazul oamenilor aflați într-o stare avansată de boală și mai puțin înaintea apariției semnelor clinice sau în fazele incipiente ale acesteia (Bryceson ș.a., 1975; Blenden ș.a., 1986).

Amprente de cornee

Acestea au fost realizate pentru prima dată de către Schneider în anul 1969 la un șoarece, ulterior fiind efectuate și în rândul oamenilor (Mathuranayagan ș.a., 1984; Blenden ș.a., 1986; Warrell ș.a., 1988) cu rezultate superioare în urma detecției virusului din salivă sau al biopsiilor cutanate (Zaidman G.W., 1998).

Saliva și glandele salivare

Acestea pot fi utilizate în vederea orientării unui diagnostic (Koruk ș.a., 2010; Simani ș.a., 2012), însă trebuie luat în considerare faptul că, prezența virusului în salivă nu este constantă, astfel încât un rezultat negativ nu ne poate fi de un real ajutor, fiind obligatoriu de confirmat utilizând alt tip de material patologic, dacă este disponibil (Goldwasser ș.a., 1959; CDC, 2017).

Lichidul cefalo-rahidian

Recoltarea de LCR atât de la animale, cât și de la oameni poate fi de un real ajutor, întrucât a fost demonstrat faptul că, acesta poate conține antigeni virali și anticorpi circulanți neutralizanți (Crepin ș.a., 1998; Simani ș.a., 2012), prezența celor din urmă fiind demonstrată în stadiile inițiale ale bolii atât la animale cât și la oameni (Schneider ș.a., 1991; Noah ș.a., 1998).

Alte țesuturi

De-a lungul timpului, numeroase cercetări au fost realizate privind punerea în evidență al antigenului virusului rabic din diferite țesuturi și organe. Astfel, într-un studiu interesant întreprins de către Feiden ș.a. în 1991, aceștia au arătat prezența antigenului în inimile a 5 câini infectați pe cale naturală, dar și în alte regiuni precum glandele adrenale (Balachandran ș.a., 1994), tractul gastro-intestinal, pancreas (Jogai ș.a., 2002), tonsile (Fekadu ș.a., 1983) sau în cazul oamenilor, în laringe, limbă, medulosuprarenală (Li ș.a., 1995; Jackson ș.a., 1999), acest lucru confirmând dispersarea centrifugă a virusului, iar prezența antigenului în astfel de regiuni putând servi ca și instrument util în realizarea unui diagnostic ante-mortem prin efectuarea de biopsii.

De asemenea, într-un studiu aprofundat efectuat de către Suja ș.a. în 2009, aceștia au pus în evidență antigenul viral în talamus, sistemul limbic, trigemen, nucleul vagal, porțiuni ce corespund zonelor de inervație colinergică, ceea ce ar explica unele semne clinice ale rabiei.

Confirmarea diagnosticului de rabie

Singurele metode de referință recunoscute și recomandate de către OIE și OMS în confirmarea sau infirmarea diagnosticului de rabie sunt reprezentate de către imunofluorescența directă (IFD), izolarea virusului rabic pe culturi celulare (RTCIT- Rabies Tissue Culture Infection Test) și proba biologică pe șoareci (PBS).

Detecția antigenului virusului rabic – Imunofluorescența directă

Înainte de apariția tehnicilor moderne de diagnostic în rabie, confirmarea bolii se realiza prin intermediul examenului histopatologic, prin detecția incluziilor acidofile intracitoplasmice din sistemul nervos central (Bingham ș.a., 2002; Theodorides, 1986; OMS, 2017). Dezavantajele principale au fost reprezentate în special de sensibilitatea scăzută și de prezența inconstantă a incluziilor în creier, 25% dintre animalele pozitive ne reprezentând acești corpusculi, fapt ce a necesitat implementarea unor noi metode mult mai sensibile (Bingham ș.a., 2002).

Aceste incluzii au fost descoperite de către Babeș în anul 1892, însă importanța și specificitatea acestora în diagnosticul rabiei au fost demonstrate de către Negri 11 ani mai târziu. În cadrul Congresului Internațional de Microbiologie de la Praga din anul 1950, incluziile au primit denumirea de „corpusculii Babeș-Negri” (Perianu, 2005), aceștia găsindu-se cu precădere în celulele Purkinje din cerebel și în celulele piramidale din hipocamp. (Jackson ș.a., 2002).

IFD reprezintă tehnica de aur în diagnosticul rabiei, cu o sensibilitate și specificitate de 99-100%. Aceasta a fost dezvoltată de către Coons și Kaplan în 1950, fiind modificată ulterior pentru diagnosticul rabiei de către Goldwasser și Kissling în anul 1958 (Trimarchi ș.a., 1972; Meslin ș.a., 1999). În situația în care, rezultatul acestui test este pozitiv, diagnosticul de rabie este cert, însă în cazul unui rezultat negativ este necesară efectuarea PBS sau RTICIT pentru confirmare (OIE, 2013).

În vederea efectuării IFD-ului, metoda nu necesită o aparatură sofisticată, materiale scumpe sau greu de procurat, este ușor de realizat, iar rezultatele se obțin într-un interval de timp scurt, între 2-4 ore în funcție de manualitatea și experiența medicului specialist (Goldwasser ș.a., 1959; Tekki ș.a., 2016). Aceasta constă în examinarea la microscopul cu ultraviolete a frotiurilor realizate din creier, după tratarea acestora cu anticorpi monoclonali sau policlonali marcați cu izotiocianat de fluoresceină (OMS, 2017(a)). Principala probă folosită pentru testarea postmortem este reprezentată de țesutul cerebral (Meslin ș.a., 1999).

De remarcat faptul că, virusul rabic este sensibil la variațiile de temperatură, astfel încât expunerea țesutului nervos la temperaturi ridicate poate afecta sensibilitatea testului de diagnostic, cauzând degradarea structurii virale (Beltran ș.a., 2014).

În situațiile în care, rezultatul IFD-ului este dubios sau negativ, o metodă alternativă, la fel de sensibilă și specifică trebuie să fie disponibilă ca și back-up pentru IFD. Ținând cont de importanța sanitară majoră în rândul oamenilor, obținerea unui rezultat rapid și sigur poate cântări foarte mult în orientarea schemei de vaccinare.

Izolarea virusului rabic: Izolarea virusului rabic pe culturi celulare comparativ cu proba biologică pe șoareci

Proba biologică pe șoareci este cunoscută drept cea mai veche metodă implementată cu scopul de a confirma sau infirma diagnosticul de rabie la animale, fiind inițiată pentru prima dată de către Webster și Dawson în anul 1935 (Bourhy ș.a., 1989).

Cu toate că, prin intermediul acestei tehnici pot fi detectate cantități foarte scăzute de virus rabic (Rudd și Trimarchi, 1989; Chhabra ș.a., 2007), din cauza perioadei îndelungate de observație a șoriceilor, a costurilor ridicate, a expunerii directe a personalului în timpul inoculării intracerebrale, dar și a necesității înlocuirii animalelor de laborator din motive etice, începând cu anul 1982, tehnica a fost înlocuită cu succes de către majoritatea țărilor dezvoltate cu izolarea virusului rabic pe culturi celulare (RTCIT), fiind a doua cea mai utilizată tehnică de referință în diagnosticul rabiei (OIE, 2017).

Avantajele celei din urmă sunt reprezentate de: costurile scăzute, reducerea timpului în obținerea rezultatelor de la 15-30 de zile în cazul PBȘ la 48 de ore în cazul RTCIT, ușurința în realizarea metodei, capacitatea de a detecta cantități scăzute de virus dintr-o probă, dar și sensibilitatea egală, chiar superioară PBȘ, acestea fiind principalele motive ce au dus la înlocuirea PBȘ (Charlton ș.a., 1986, OIE, 2017).

De-a lungul timpului, numeroase linii celulare au fost utilizate pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare, prima descriere fiind raportată în anul 1913 de către Noguchi și Levaditi. Întrucât, după multiplicarea virusului rabic în SNC, acesta se distribuie către majoritatea organelor, acest lucru a făcut posibilă izolarea lui pe o gamă variată de celule (King, 1996).

BHK-21 a fost prima linie celulară utilizată pentru izolarea virusului rabic, însă rezultatele au dovedit o sensibilitate inferioară PBȘ (Madhusudana ș.a., 2010). Până în prezent, diferite linii celulare precum N2a, CER, BHK-21, BSR, McCoy sau celule provenite de la bovine, lilieci, ratoni, câini și sconeși au fost experimentate (Meslin ș.a., 1999).

În prezent, linia celulară de referință pentru izolarea și multiplicarea virusului rabic este reprezentată de către N2a (neuroblastome murine), fiind considerată cea mai sensibilă, fapt recunoscut de către OIE și OMS.

Detectia anticorpilor antirabici din serurile animalelor de companie, respectiv a vulpilor

Actualele tehnici recunoscute și recomandate de către OIE și OMS pentru detecția anticorpilor anti-rabici neutralizanți din serurile animalelor, sunt reprezentate de către testul de virus-neutralizare al anticorpilor fluorescenți - FAVN, și de către testul rapid de inhibiție a fluorescenței - RFFIT, dezvoltate către Cliquet ș.a. în anul 1998, respectiv de către Smith ș.a. în anul 1973. Detecția poate fi realizată fie în contextul transportului necomercial al animalelor de companie, fie pentru monitorizarea eficacității vaccinării la vulpi.

Cu toate că, aceste tehnici sunt precise și eficiente, anumite dezavantaje precum timpul îndelungat în obținerea rezultatelor, costurile ridicate, personal experimentat și laboratoare dotate, fac dificilă utilizarea acestora în cadrul laboratoarelor.

Astfel, detecția anticorpilor antirabici postvaccinali la vulpi, poate fi realizată prin intermediul testului ELISA, fiind preferat de majoritatea țărilor în care se aplică programul de

vaccinare orală la vulpi, oferind rezultate valide, la nivel european fiind recunoscute 2 kit-uri în acest sens, Platelia Rabies și BioPro (OIE, 2017), cel din urmă fiind preferat, cu rezultate superioare Plateliei (Wasniewski ș.a., 2012; Wasniewski ș.a., 2013; Wasniewski ș.a., 2016).

Alte metode complementare de diagnostic

Detectia ARN-ului viral: RT-PCR și Real time qRT-PCR

În ultimii ani, tehnicile de biologie moleculară au început să câștige din ce în ce mai mult teren pentru confirmarea diagnosticului de rabie, fiind un instrument adițional de detecție a lyssavirusurilor.

Astfel, acestea pot fi folosite pe probe de creier aflate într-o stare avansată de descompunere, lucru nerecomandat în cazul tehnicilor de referință (IFD, RTCIT) (Lopes ș.a., 2010). De asemenea, un factor foarte interesant este acela că, aceste tehnici pot fi folosite pentru a diferenția virusul rabic clasic de virusurile înrudite cu acesta, cunoscute și sub denumirea de „pararabice”, utilizând primeri specifici unui genotip aparte (Black ș.a., 2000; Echevarria ș.a., 2001).

Diferite probe precum saliva, LCR, pielea, tampoane orofaringiene, lacrimi, urină, dar și alte țesuturi infectate pot fi utilizate în cadrul tehnicilor moleculare (Biswal ș.a., 2007; Macedo ș.a., 2006; Nagaraj ș.a., 2006; Echevarria ș.a., 2001; Wacharapluesadee ș.a., 2001; Mani ș.a., 2013) cu rezultate pozitive.

Studii comparative întreprinse de către Sacramento ș.a., 1991, Kamolvarin ș.a., 1993, au dovedit sensibilitatea, respectiv specificitatea tehnicilor în cauză, comparabile cu cele de referință, implementarea acestora în viitor în confirmarea rabiei alături de tehnicile deja cunoscute reprezentând o necesitate.

Detectia antigenului viral: dRIT - Testul rapid de imunohistochimie directă

Unul dintre cele mai semnificative teste dezvoltate în ultimii ani este „dRIT” realizat de către CDC din Atlanta, USA în anul 2006, cu obținerea de rezultate în mai puțin de o oră (Neizgoda ș.a., 2006). Acesta presupune efectuarea de frotiuri din creier, bazându-se pe detecția nucleoproteinei N a virusului rabic, prin utilizarea unui cocktail de anticorpi monoclonali sau policlonali biotinilați concentrați și purificați (Neizgoda ș.a., 2006; Coetzer ș.a., 2014), alături de adăugarea de streptavidină peroxidază și un reagent de colorare. În cazul în care antigenul este prezent în probă, acesta apare de culoare roșu –cărămiziu (Fig. 2.1).

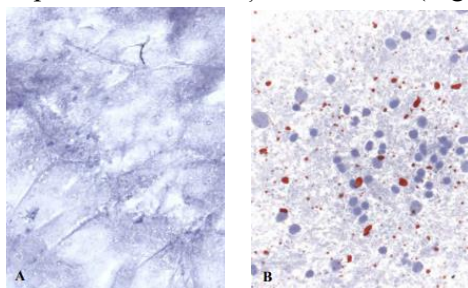


Fig. 2.1 Testul rapid de imunohistochimie directă A) Frotiu negativ B) Frotiu pozitiv

Fig. 2.1 Direct Rapid Immunohistochemical Test A) Negative brain impression B) Positive brain impression
(Sursa: CDC Atlanta, USA)

În urma comparării cu tehnica de referință IFD, acesta a demonstrat o sensibilitate și specificitate de 100% (Madhusudana ș.a., 2012; Dürr ș.a., 2008; Tao ș.a., 2008) fiind o tehnică

simplă, ușoară, rapidă, ieftină, ce poate fi implementată cu succes mai ales în cazul țărilor mai puțin dezvoltate (Neizgoda ș.a., 2006).

Hibridizarea in situ, latex aglutinarea, testul rapid imunohistochimic indirect – IRIT, tehnica NASBA, ce se bazează pe amplificarea acizilor nucleici prin utilizarea a 3 enzime diferite pentru generarea de copii multiple ale ARN-ului, dar și LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification – Amplificarea isothermală ciclică mediată) ca și metodă alternativă de o înaltă specificitate și rapiditate de amplificare a ADN-ului, ce poate fi folosită în protocoalele de supraveghere (Notomi ș.a., 2000; Boldbaatar ș.a., 2009; Muleya ș.a., 2012), au fost implementate și dezvoltate pentru diagnosticarea rabiei, ele rămânând deocamdată la nivel de cercetare.

2.2 Metodologia de supraveghere, control și eradicare a rabiei la animale

Încercările de decimare ale populațiilor de vulpi realizate la nivel global au fost zadarnice în reducerea cazurilor pozitive de rabie, singura metodă considerată eficientă pentru a ține sub control această boală fiind reprezentată de către vaccinarea orală, prin distribuirea de momeli în habitatul acestor animale (Cliquet ș.a., 2004).

Dezvoltarea unor vaccinuri sigure și eficiente prin încorporarea acestora în momeli atractive a dus la realizarea primului program destinat vaccinării orale a vulpilor în anul 1978, Elveția fiind prima țară ce a dispus de aceste măsuri (Rupprecht ș.a., 2004). După eforturi considerabile în acest sens, Elveția a fost declarată în anul 1997 prima țară liberă de rabie (Bugnon ș.a., 2004).

Exemplul Elveției a fost urmat îndeaproape de Germania în anul 1983, ultimul caz de rabie fiind raportat în anul 2006 la o vulpe, iar 2 ani de zile mai târziu, țara a fost declarată indemnă (Müller ș.a., 2012).

În cazul Belgiei, în perioada 1986-1991 au fost realizate campanii riguroase de vaccinare orală, ducând la o reducere considerabilă a cazurilor de rabie, 2 ani mai târziu țara fiind declarată indemnă (Brochier ș.a., 1988; Brochier ș.a., 1994). Acest statut însă, nu avea să dureze foarte mult, în anul 1993 fiind raportate 13 cazuri de rabie la vulpi, situație ce a necesitat reimplementarea campaniilor de vaccinare orală (Brochier ș.a., 1995).

De-a lungul ultimilor decenii, aceste programe intensive ce au vizat rezervorul silvatic principal, vulpea, prin distribuția bianulă a vaccinurilor orale, atât aeriană, cât și manuală, au dus la eradicarea rabiei în vestul și centrul Europei (Vos, 2003; Rupprecht ș.a., 2004).

Numeroase îmbunătățiri au fost efectuate în ceea ce privește calitatea și producția vaccinurilor. Astfel, diferite vaccinuri vii atenuate au fost și încă sunt utilizate în cadrul acestor programe de supraveghere: SAD B19 și SAD P5/88 (tulpini atenuate în culturi celulare), SAG1 și SAG2 (mutanți apatogeni al unor tulpini atenuate) sau VRG (vaccin atenuat recombinant ce codifică glicoproteina virusului rabic) (Cliquet ș.a., 2004).

Stabilitatea termică și punctul de topire al învelișului momelii au o importanță primordială pentru garantarea unei vaccinări eficace. VRG este cunoscut ca fiind singurul vaccin care nu interferează cu imunitatea maternală la pui, un factor important în realizarea campaniilor de primăvară (Cliquet ș.a., 2004), iar stabilitatea termică ridicată permite distribuția

momelilor chiar și pe timp de vară, în cazul implementării unor campanii de urgență (Masson ș.a., 1999).

România, dispune din anul 2011 de un *Program strategic privind supravegherea, controlul și eradicarea turbării la vulpe*, în urma aprobării acestuia în cadrul Hotărârii de Guvern nr. 55/2008, pentru o perioadă de 10 ani. Acest program presupune distribuția bianuală atât manuală, cât și aeriană a momelilor vaccinale (ANSVSA, 2016). Acestea sunt realizate dintr-un amestec furajer atractiv pe bază de făină de pește, în interiorul cărora sunt introduse blistere de plastic și aluminiu cu vaccinul lichid (Robardet ș.a., 2011), în țara noastră fiind folosit vaccinul viu atenuat *Lysvulpen* (Bioveta, Republica Cehă), ce conține tulpina SAD Bern, reprezentată de 2 subpopulații dominante de virus, și anume SAD Bern și SAD B19 „like” (ICPMBV, 2017).

În cadrul distribuției aeriene, liniile de zbor se stabilesc, de regulă, la o distanță de 500 m între ele, la o altitudine de 150 m, fiind distribuite 25 de momeli/km². În cazul celei manuale în viziunile vulpilor, distribuția se efectuează prioritar în zonele din jurul localităților unde au fost confirmate cazuri pozitive de rabie. Acestea se amplasează direct în vizuini, dar și pe traseele vulpilor, distribuindu-se câte 25 momeli/km² (ANSVSA, 2017).

Principiul imunizării constă în faptul că după mestecarea și perforarea capsulei care conține virusul viu atenuat din interiorul momelii, acesta pătrunde în mucoasa sau tonsilele cavității orale, imunitatea instalându-se în termen de 21 de zile de la administrare (ANSVSA, 2016; ICPMBV, 2017).

Verificarea eficacității acestor campanii de vaccinare orală a vulpilor se realizează prin două mari metode, și anume: detecția anticorpilor antirabici postvaccinali din lichid toracic sau ser și determinarea markerului vaccinal - tetraciclina - din mandibula sau dinții vulpilor.

Până în prezent au fost dezvoltate numeroase proceduri ce au vizat detecția anticorpilor antirabici neutralizanți, cum ar fi testele *in vivo* (MNT- Testul neutralizării pe șoarece), tehnicile de seroneutralizare (FAVN - Fluorescent Antibody Virus Neutralization Test și RFFIT - Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test), cele imunoenzimatic (ELISA) (Woldehiwet, 2005; Servat ș.a., 2006; Ondrejkoová ș.a., 2015), dar și alte tehnici modificate și adaptate, precum RAPINA (Rapid Neutralizing Antibody detection test) (Nishizono ș.a., 2012) sau VNT-IIP (Virus neutralizing test-indirect immunoperoxidase technique) (Ogawa ș.a., 2008).

Actualele metode de referință recunoscute și recomandate de către OIE și OMS pentru detecția și titrarea anticorpilor antirabici din serul animalelor sunt reprezentate de către RFFIT (Smith ș.a., 1973) și FAVN (Cliquet ș.a., 1998). Cu toate că, ambele metode sunt eficiente și precise, acestea prezintă o serie de dezavantaje. Astfel, timpul îndelungat, costurile ridicate, personal abilitat pentru efectuarea testului, dar și laboratoare adecvat echipate pentru manipularea virusului rabic viu, fac dificilă realizarea acestui test în cadrul oricărui laborator, fapt ce a dus la dezvoltarea de noi teste alternative (Wasniewski ș.a. 2012; Ondrejkoová ș.a., 2015).

Testul ELISA este preferat de către majoritatea țărilor unde se aplică programul de vaccinare orală la vulpi, dar și vaccinarea în masă a câinilor. Acest lucru se datorează numeroaselor avantaje pe care le oferă acest test, și anume: este mai ușor de realizat, rezultatele se obțin mult mai repede, nu implică manipularea virusului rabic viu, în consecință, personal specializat și laborator echipat adecvat în acest sens (Wasniewski ș.a. 2012).

Luând în considerare faptul că, probele de vulpi testate pentru verificarea eficacității din cadrul programelor de vaccinare sunt reprezentate de fapt de lichide toracice, acestea fiind contaminate și chiar hemolizate, nu se recomandă efectuarea testului FAVN, întrucât acesta este foarte sensibil la condițiile de citotoxicitate. În acest sens, testul ELISA poate fi aplicat cu succes pe probe provenite în special de la animalele sălbatice, contracarând problemele de citotoxicitate, oferind rezultate valide (Vengust ș.a., 2011).

În ceea ce privește detecția anticorpilor antirabici postvaccinali din lichid toracic sau ser prin intermediul testului ELISA, sunt recunoscute la nivel european 2 kit-uri, și anume: BioPro (Praga, Republica Cehă) și Bio-Rad (Platelia Rabies II, Marnes-La-Coquette, Franța).

Platelia Rabies II (Bio-Rad, Franța) dezvoltat de către Bio-Rad și Laboratorul European de Referință în Rabie din Nancy, Franța în anul 2006, a fost primul kit recomandat de către OIE pentru detecția anticorpilor antirabici la câini și pisici (în contextul transportului necomercial al acestora) și la vulpi (pentru monitorizarea eficacității vaccinării) (OIE, 2017). Acceptarea acestuia în Registrul kiturilor pentru diagnostic certificat de către OIE a venit în urma rezultatelor unui studiu publicat de către Servat ș.a. în 2007 ce a arătat o sensibilitate de 83% și o specificitate de 98% pe probe provenite atât de la animale, cât și de la oameni, alături de consultarea diferiților experți în domeniu. În prezent însă, acest kit nu se mai regăsește în registrul anterior menționat.

Cel de-al doilea kit, BioPro este preferat în ziua de astăzi, în urma unor studii întreprinse de către Wasniewski ș.a., 2012, Wasniewski ș.a., 2013; Bedekovic ș.a., 2016, Wasniewski ș.a., 2016 obținând rezultate superioare celui franțuzesc.

Determinarea markerului vaccinal tetraciclina din mandibula sau dinții vulpilor reprezintă o altă metodă pentru a verifica eficacitatea acestor programe (OIE, 2013). Un indicator al ingerării acestor momeli este clorhidratul de tetraciclina, prezent în compoziția acestora, în doză de 150 mg (ICPBMV, 2017). Odată administrată oral, poate fi detectată în oase la lumina UV la numai 2 zile de la consumul momelilor (Frost ș.a., 1959).

Utilizarea biomarkerilor ca și indicatori a devenit o practică din ce în ce mai comună atunci când vine vorba de programe aplicate animalelor sălbatice cu scopul de a monitoriza eficiența acestora. Cu toate că, de-a lungul timpului au fost utilizați numeroși biomarkeri, cum ar fi: tetraciclina, sulfadimetoxina sau rodamina B, de preferat pentru studiul rabiei rămâne tetraciclina (Robardet ș.a., 2012(a)).

Pe lângă realizarea acestor campanii de vaccinare orală a vulpilor, un rol foarte important îi revine și obligativității vaccinării animalelor de companie (Jakel ș.a., 2008). Astfel, transportul necomercial al animalelor de companie dintr-o țară unde evoluează boala într-o țară indemnă, conform Regulamentului UE 998/2003 este condiționat de vaccinarea antirabică. Însă, în ultima perioadă, unele țări indemne de rabie au impus pe lângă obligativitatea vaccinării antirabice și teste serologice privind detecția anticorpilor antirabici, acestea fiind o garanție puternică a efectuării vaccinării (Aubert, 1992), fiind acceptată conform OIE și OMS valoarea minimă de 0,5 UI/ml, considerată a fi una de protecție față de o posibilă infecție cu virusul rabic (Jakel ș.a., 2008; Knoop ș.a., 2010).

PARTEA A II-A

CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL III
SCOPUL, OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT ȘI CADRUL
ORGANIZATORIC AL CERCETĂRILOR
CHAPTER III
PhD THESIS AIM AND OBJECTIVES AND THE ORGANIZATIONAL
FRAMEWORK OF THE RESEARCHES

Rabia rămâne în continuare o amenințare globală gravă, fiind inclusă în lista bolilor tropicale neglijate a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), întânită cu precădere în zonele defavorizate ale globului. Dată fiind importanța sanitară și economică a zoonozei, aceasta necesită o coordonare trans-sectorială strânsă la nivel național, regional și global.

Jumătate din populația lumii trăiește într-o zonă endemică, iar mai mult de 80% din decese apar în zonele rurale, unde accesul la campaniile de educație pentru sănătate și profilaxia post-expunere este limitat sau inexistent. Africa și Asia sunt continentele cu cel mai mare risc de mortalitate umană, cu peste 95% din cazurile fatale ale lumii, fiind și regiunile unde rabia în rândul câinilor este scăpată de sub control. Aceste situații au loc în prezent, cu toate că boala poate fi prevenită în proporție de 100% prin intermediul vaccinării, anual înregistrându-se din nefericire 60.000 de decese în rândul oamenilor, 40% fiind copii sub vârsta de 15 ani, conform unei statistici a Oficiului Internațional de Epizootii (OIE).

Luând în considerare faptul că, 95% din cazurile de rabie în rândul oamenilor se datorează mușcăturilor provenite de la câinii infectați, vaccinarea în masă a acestor animale este o metodă de elecție, fiind singura modalitate de a întrerupe ciclul infecțios al bolii între animale și oameni.

În acest sens, OMS alături de OIE, Organizația pentru Alimentație și Agricultură a Națiunilor Unite (FAO) și Alianța Globală pentru Controlul Rabiei (GARC) au stabilit un obiectiv global "mortalitate zero a rabiei umane până în anul 2030".

Comparativ cu Asia și Africa, unde rezervorul principal este câinele, la nivel european acesta este reprezentat de către vulpe. În acest sens, majoritatea țărilor libere de rabie, au reușit obținerea acestui statut prin implementarea cu strictețe a unor programe de vaccinare orală la vulpi, dar și prin obligativitatea vaccinării câinilor și pisicilor, specii cunoscute ca și rezervoare domestice ale virusului rabic.

Cu toate că, țara noastră a fost în ultimile decenii printre cele mai afectate țări de rabie la nivel european, odată cu implementarea programului de supraveghere, control și eradicare a vulpilor începând cu anul 2011, numărul cazurilor a început să scadă simțitor. Efectuarea în continuare cu strictețe al acestui program împreună cu respectarea vaccinării obligatorii ale animalelor de companie, pot duce în timp la eradicarea rabiei în România. În Republica Moldova, a doua țară luată în studiu în cadrul tezei de doctorat, anual se raportează un număr

foarte mare de cazuri de rabie în special în rândul animalelor domestice, situație scăpată de sub control, ținând cont și de faptul că țara încă nu dispune de un program privind vaccinarea orală a vulpilor, măsură primordială în reducerea numărului de cazuri.

Având în vedere faptul că, obținerea unui statut de țară indemnă de rabie este condiționată și de situația actuală a țărilor de graniță, având un rol important în circulația virusului rabic, implementarea unei strategii eficace pentru a acoperi o populație cât mai largă de vulpi, respectarea aceluiași reguli de către toate țările care implementează acest program, dar și continuarea distribuției de momeli încă 2 ani de la ultimul caz de rabie, sunt doar câteva dintre condițiile pentru ca programul să dea rezultate.

Ținând cont de importanța bolii, dar și de puținele cercetări realizate până în prezent în țara noastră, cât și de lipsa informațiilor privind Republica Moldova, cercetările întreprinse în cadrul tezei de doctorat au avut ca scop realizarea unei anchete epidemiologice a cazurilor de rabie din partea de nord-est a țării noastre, dar și a Republicii Moldova vizând o perioadă de 7 ani, pentru o bună înțelegere a situației actuale, dar și pentru stabilirea unei prevalențe fidele a bolii la animalele domestice și sălbatice. Unul dintre cele mai importante obiective ale cercetărilor de față a fost reprezentat de realizarea unui studiu epidemiologic molecular, prin efectuarea unei analize filogenetice a tulpinilor de virus rabic izolate pe teritoriul celor două țări luate în studiu, cu scopul de a urmări circulația și distribuția virusului rabic în natură, evoluția acestuia și nu în cele din urmă mecanismele moleculare ale adapării virale.

Cadrul organizatoric unde s-au desfășurat cercetările tezei de doctorat

Cercetările întreprinse în cadrul tezei de doctorat au cuprins mai multe instituții și cadre organizatorice:

- ✚ Laboratorul de Serologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași;
- ✚ Direcțiile Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor din regiunea Moldovei (Botoșani, Suceava, Iași, Neamț, Vaslui, Bacău, Galați, Vrancea), alături de Buzău și Maramureș;
- ✚ Centrul Republican de Diagnostică Veterinară (CRDV) din Chișinău, Republica Moldova;
- ✚ Laboratorul European de Referință în Rabie din Nancy, Franța.

Pentru realizarea tezei de doctorat, 59 de probe de creier (38 din nord-estul României și 21 din Republica Moldova), 72 de mandibule de vulpi din județele Moldovei, 392 de probe reprezentate de lichid toracic provenite de la vulpi și 312 de probe (seruri și lichid toracic) provenite de la mistreți au fost luate în studiu.

Pregătirea serurilor, dar și a lichidelor toracice, alicotarea și identificarea acestora a fost efectuată în cadrul Laboratorului de Serologie a FMV Iași, fiind depozitate la temperatura de -20°C.

Din cadrul DSVSA-urilor luate în studiu, au fost colectate date privind situația cazurilor de rabie din perioada 2010-2016 și probe de creier în vederea efectuării cercetărilor în cadrul laboratorului din Franța, acestea fiind transportate în această țară respectând legislația în vigoare.

CRDV a luat ființă în anul 1991, în urma comasării a două mari laboratoare, și anume:

„Laboratorul Veterinar Central Republican” și „Laboratorul veterinar specializat pentru bolile infecțioase deosebit de periculoase ale animalelor”. În cadrul secției de Virusologie, singurele metode realizate pentru confirmarea, respectiv infirmarea rabiei sunt reprezentate de către imunofluorescența directă și proba biologică pe șoareci. Pe parcursul desfășurării cercetărilor tezei de doctorat, au fost colectate date privind situația cazurilor de rabie din perioada 2010-2016, necesare efectuării unei statistici epidemiologice, dar și un număr de 21 de probe provenite atât de la animale domestice, cât și sălbatice de pe întreg teritoriul țării. Acestea au fost furnizate pentru cercetările ulterioare Laboratorului European de Referință în Rabie din Nancy, Franța.

În perioada 2015-2017 am efectuat 3 stagii de cercetare în cadrul Laboratorului European de Referință în Rabie din Nancy, Franța, însumând un total de 9 luni.

Începând cu anul 2008, Comisia Europeană a desemnat acest laborator punctul de referință pentru toate țările Uniunii Europene, acesta fiind recunoscut în prezent pentru numeroasele sale colaborări și cercetări în domeniul rabiei la animale. Pe lângă titlul de Laborator de referință în rabie al Uniunii Europene, acesta este și Centru de colaborare în cadrul Organizației Mondiale a Sănătății pentru cercetarea și managementul în controlul zoonozelor, Laborator de referință în rabie al Oficiului Internațional de Epizootii, dar și Laborator de referință în serologia rabiei al Uniunii Europene.

Printre responsabilitățile și activitățile laboratorului se numără:

- pregătirea profesională privind tehnicile de referință în diagnosticul rabiei (FAT, RTCIT, MIT, RT-PCR, Real Time PCR, secvențiere, titrarea momelilor vaccinale (SAG2, SADB19), determinarea tetraciclinei);
- monitorizarea infecției cu lyssavirusuri la lilieci;
- detecția și titrarea anticorpilor antirabici la câini, pisici și vulpi;
- controlul vaccinurilor;
- conservarea și furnizarea de tulpini ale virusului rabic;
- caracterizarea tulpinilor de virus rabic utilizând cele mai noi metode disponibile la ora actuală pentru o mai bună înțelegere a epidemiologiei acestei boli;
- pregătirea, controlul și furnizarea controalelor necesare determinărilor serologice și al altor reagenți de referință Laboratoarelor Naționale la nivel internațional;
- validarea reagenților de referință;
- realizarea și menținerea unei bănci de seruri, a unei colecții de tulpini de virus rabic, dar și menținerea unei baze de date a tulpinilor izolate de-a lungul teritoriului Uniunii Europene, inclusiv a secvențierii;
- organizarea periodică de teste comparative ce vizează procedurile de diagnostic la nivel european;
- actualizarea procedurilor de supraveghere, epidemiologice și prevenție la nivel mondial;
- evaluarea de noi tehnici de diagnostic, dezvoltarea și evaluarea celor mai noi tehnici de biologie moleculară.

Obiectivele întreprinse în cadrul tezei de doctorat au fost următoarele:

- ✓ realizarea unei anchete epidemiologice a cazurilor de rabie din regiunea Moldovei a României, dar și din Republica Moldova;
- ✓ identificarea antigenului prin intermediul imunofluorescenței directe, dar și testarea a 3 conjugate diferite utilizate în cadrul acestei tehnici;
- ✓ izolarea virusului rabic pe culturi celulare ca și metodă alternativă pentru proba biologică pe șoareci; evidențierea liniei celulare optime, respectiv a sistemului ideal pentru izolarea și multiplicarea virusului rabic;
- ✓ confirmarea rezultatelor obținute în cadrul metodelor de diagnostic de referință prin intermediul tehnicilor de biologie moleculară Real Time PCR și RT-PCR convențional, ca instrument adițional pentru detecția lyssavirusurilor;
- ✓ realizarea unei analize filogenetice a nucleoproteinei virusului rabic pentru o mai bună înțelegere a distribuției și evoluției acestuia, atât în zona de N-E a țării noastre, cât și în Republica Moldova;
- ✓ realizarea secvențierii de nouă generație (NGS) pe un număr selectiv de probe în vederea identificării existenței unor posibile modificări de patogenitate la nivel de specie animală;
- ✓ detecția anticorpilor antirabici postvaccinali, respectiv determinarea markerului vaccinal - tetraciclina - la vulpi, consecutiv distribuției de momeli vaccinale din cadrul programului de supraveghere, control și eradicare a bolii la vulpi;
- ✓ detecția și titrarea anticorpilor antirabici la mistreți, pentru a stabili dacă aceste animale reprezintă potențiali competitori pentru consumul momelilor, influențând astfel negativ eficacitatea campaniilor de vaccinare orală destinate vulpilor.

CAPITOLUL IV
INVESTIGAȚII EPIDEMIOLOGICE PRIVIND PREZENȚA ȘI
PREVALENȚA INFECȚIEI RABICE LA ANIMALE ÎN NORD-ESTUL
ROMÂNIEI ȘI ÎN REPUBLICA MOLDOVA
CHAPTER IV
EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS REGARDING THE
PRESENCE AND PREVALENCE OF RABIES INFECTION IN
ANIMALS IN NORTH-EAST OF ROMANIA AND REPUBLIC OF
MOLDOVA

În perioada 2010-2016 a fost întreprinsă o anchetă epidemiologică în partea de nord-est a țării noastre, vizând cele 8 județe ale regiunii Moldova, dar și Republica Moldova, cu scopul de a obține o privire de ansamblu asupra situației cazurilor pozitive de rabie, dar și pentru stabilirea unei prevalențe fidele a bolii în rândul animalelor domestice și sălbatice.

Astfel, cercetările de față sunt structurate în 2 subcapitole:

4.1 Investigații epidemiologice privind prezența și prevalența infecției rabice la animale în nord-estul României

4.2 Investigații epidemiologice privind prezența și prevalența infecției rabice la animale în Republica Moldova

4.1 Investigații epidemiologice privind prezența și prevalența infecției rabice la animale în nord-estul României

Realizarea acestei anchete epidemiologice a fost realizată pe parcursul celor 4 ani de doctorat, iar pentru o mai bună înțelegere a distribuției cazurilor pozitive de rabie au fost adunate date începând cu anul 2010, înaintea implementării programului strategic privind supravegherea și controlul rabiei la vulpi. Astfel, aceste date au fost adunate de la fiecare din cele 8 județe din regiunea Moldovei (Fig. 4.1), fiind corelate cu situațiile oficiale raportate de pe OIE (Dascalu ș.a., 2015).

Situația cazurilor de rabie la animalele domestice. Pe parcursul celor 7 ani luați în studiu, un total de 781 de probe provenite de la animale domestice au fost primite în cadrul celor 8 laboratoare județene pentru confirmarea, respectiv infirmarea diagnosticului de rabie. Dintre acestea, 211 au provenit de pe raza județului Iași, 118 din județul Suceava, 110 din județul Bacău, 90 din județul Vaslui, 74 din județul Neamț, 67 din județul Vrancea, 72 din județul Botoșani și 39 din județul Galați.



Fig. 4.1 Harta României cu reprezentarea geografică a celor 8 județe luate în studiu (original)

Fig. 4.1 Map of Romania with geographical origin of the 8 counties studied (original)

În urma realizării tehnicilor de referință în diagnosticul rabiei în cadrul acestor laboratoare (imunofluorescență directă și proba biologică pe șoareci), 188 de probe (24,07%) au fost confirmate ca fiind pozitive și 593 negative (75,93%). Din totalul celor 188 de probe pozitive, 103 (13,19%) au fost raportate la bovine, 47 (6,02%) la câini, 25 la pisici (3,20%), 6 la ovine (0,77%), câte 3 la cabaline (0,38%) și caprine (0,38%) și o singură probă (0,13%) la porcine (Tabel 4.1), înregistrându-se o prevalență totală al celor 7 ani de 24,07%.

Cele mai multe cazuri de rabie la bovine confirmate pe parcursul acestor ani au fost înregistrate în județul Suceava cu un total de 38 de cazuri, urmat de județele Iași și Botoșani cu câte 19 cazuri fiecare, județele Neamț și Vaslui cu câte 8 cazuri, județul Galați cu 4 cazuri și zero cazuri pentru județul Vrancea.

Tabel 4.1 / Table 4.1

Numărul total de probe testate în perioada 2010-2016 și rezultatele obținute la diagnosticul de confirmare pentru cele 8 județe luate în studiu

The total number of samples tested during 2010-2016 and the results obtained at the confirmation diagnosis for the 8 counties studied

Specia	BT		SV		IS		NT		VS		BC		GL		VN		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bovine	19	17	38	20	19	16	8	21	8	24	7	21	4	0	0	13	103	132
Canine	7	22	4	30	14	80	4	23	5	24	2	44	8	9	3	28	47	260
Felidae	1	1	1	12	11	57	0	5	6	9	3	20	1	15	2	8	25	127
Ovine	0	3	2	5	0	7	0	2	4	4	0	6	0	0	0	1	6	28
Cabaline	0	1	0	2	3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	3	8
Caprine	0	1	2	1	0	1	0	3	0	3	0	6	1	0	0	10	3	25
Porcine	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	5
Leporide	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
Total	27	45	47	71	48	163	12	62	23	67	12	98	14	25	5	62	188	593

Pe locul 2 ca și număr de cazuri pozitive raportate la animalele domestice, au fost înregistrate la câini, însumând un total de 47 de cazuri (Fig. 4.2). Dintre acestea, 14 au fost confirmate pe raza județului Iași, 8 cazuri în Galați, 7 cazuri în Botoșani, 5 cazuri în Vaslui, 4

cazuri în Suceava, respectiv Neamț, la polul opus aflându-se județele Vrancea și Vaslui cu 3 respectiv 2 cazuri.

Pe locul al treilea s-au situat pisicile, înregistrându-se 25 de cazuri, dintre care 11 în județul Iași, 6 în județul Vaslui, 3 în județul Bacău, 2 în județul Vrancea, iar cele mai puține în județele Botoșani, Suceava și Galați cu câte un singur caz.

Speciile cele mai puțin afectate au fost reprezentate de către ovine, fiind raportate doar 6 cazuri pozitive, dintre care 4 în județul Vaslui și 2 în județul Suceava. Cabalinele au înregistrat 3 cazuri pozitive confirmate în județul Iași, caprinele de asemenea 3 cazuri, 2 dintre acestea fiind confirmate în județul Suceava și unul singur în județul Galați și un singur caz la o porcină în județul Iași.

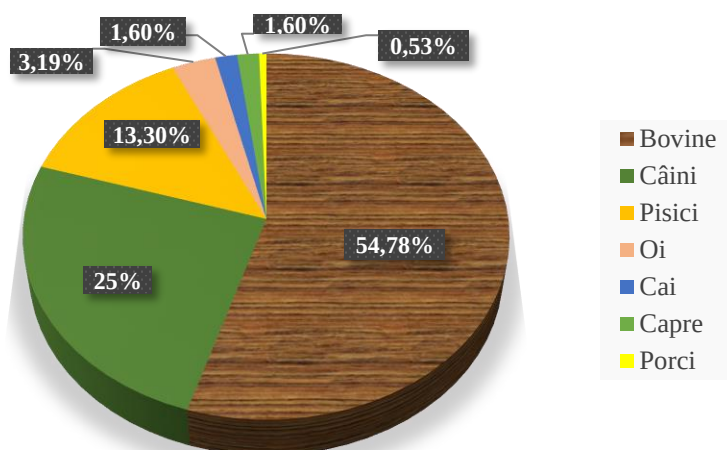


Fig. 4.2 Cazurile pozitive de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județele Moldovei
Fig. 4.2 The positive cases of rabies recorded in domestic animals during 2010-2016 in Moldova counties

Județele cele mai afectate de rabie în rândul animalelor domestice au fost reprezentate de către Iași cu un total de 48 de cazuri, la mică diferență de către Suceava cu 47 de cazuri, Botoșani cu 27 de cazuri, Vaslui cu 23 de cazuri, iar la polul opus s-au situat județele Galați cu 14 cazuri, Bacău și Neamț cu câte 12 cazuri și pe ultimul loc Vrancea cu doar 5 cazuri (Fig. 4.3).

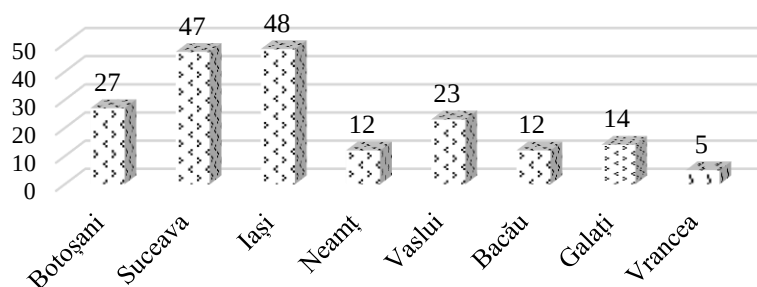


Fig. 4.3 Numărul total al cazurilor pozitive de rabie înregistrate la animalele domestice pentru cele 8 județe luate în studiu
Fig. 4.3 The total number of rabies positive cases recorded in domestic animals for all the 8 counties studied

Situația cazurilor de rabie la animalele sălbatice. În perioada 2010-2016, un total de 1314 probe provenite de la animalele sălbatice de pe teritoriul celor 7 județe luate în studiu au fost supuse testărilor. Dintre acestea, 161 au provenit de pe raza județului Botoșani, 460 din Suceava, 351 din Iași, 40 din Neamț, 96 din Vaslui, 108 din Bacău, 40 din Galați și 58 din Vrancea. Din totalul celor 1314, 303 au fost confirmate ca fiind pozitive, iar 1011 negative. Probele au fost recoltate de la diferite specii de animale sălbatice, însă ponderea cea mai mare de cazuri pozitive a fost întâlnită în rândul vulpilor. Astfel, 284 (21,61%) au fost raportate la vulpi, 5 (0,38%) la jderi, 5 (0,38%) la dihori, 4 (0,30%) la pisici sălbatice, 3 (0,22%) la lupi și câte un caz la bursuci (0,08%), respectiv la căpriori (0,08%) (Tabel 4.2), înregistrându-se o prevalență totală al celor 7 ani de 23,05%.

Tabel 4.2 / Table 4.2

Numărul total de probe testate provenite de la animale sălbatice, în perioada 2010-2016 și rezultatele obținute la diagnosticul de confirmare pentru cele 8 județe luate în studiu

The total number of samples tested coming from wild animals, during 2010-2016 and the results obtained at the confirmation diagnosis for the 8 counties studied

Specia	BT		SV		IS		NT		VS		BC		GL		VN		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Vulpi	15	145	93	358	60	276	18	22	15	75	40	59	18	16	25	16	284	967
Jderi	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	0
Dihori	0	0	0	0	3	1	0	0	0	2	0	0	0	1	2	5	5	9
Pisici sălbatice	1	0	0	1	0	2	0	0	0	1	1	0	1	0	1	2	4	6
Lupi	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	2	2	3	6
Bursuci	0	0	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4
Căpriori	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	6
Nevăstuici	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Veverițe	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cerbi	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	5
Lame	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Hamsteri	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Vidre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Râs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Șobolani	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Mistreți	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Total	16	145	97	363	63	288	18	22	15	81	45	63	19	21	30	28	303	1011

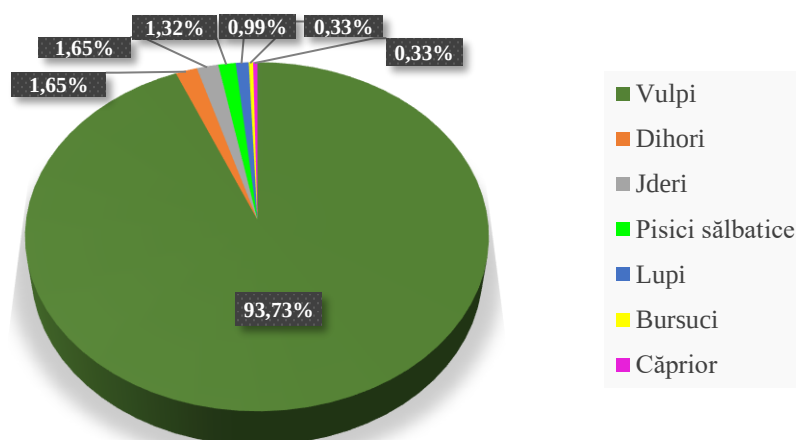


Fig. 4.4 Cazurile pozitive de rabie înregistrate la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județele Moldovei
Fig. 4.4 The positive cases of rabies recorded in wild animals during the period 2010-2016 in Moldova counties

Cele mai multe cazuri în rândul animalelor sălbatice au fost raportate în județul Suceava cu 93 de cazuri, urmat de județul Iași cu 60 de cazuri, Bacău cu 40 de cazuri, Vrancea cu 25 de cazuri, 18 cazuri pentru Neamț, respectiv Galați și câte 15 cazuri pentru Botoșani, respectiv Vaslui.

Ca o privire de ansamblu al tuturor cazurilor pozitive înregistrate atât la animalele domestice, cât și la cele sălbatice, principalul județ afectat este Suceava cu 144 de cazuri, urmat de Iași cu 111 cazuri, Bacău cu 57 de cazuri, Botoșani cu 43 de cazuri, Vaslui cu 38 de cazuri, la polul opus aflându-se județele Vrancea, Galați și Neamț cu 35, 33 și respectiv 30 de cazuri (Fig. 4.5).

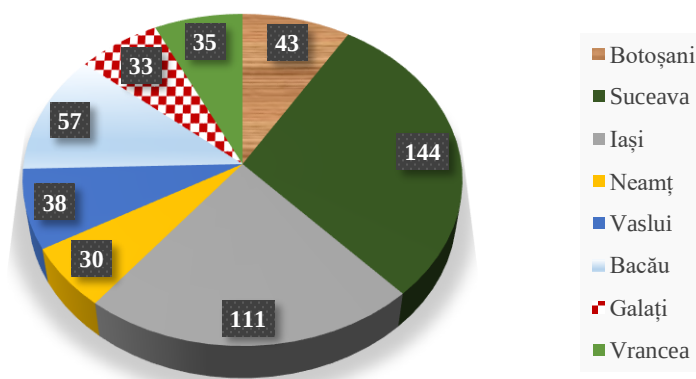


Fig. 4.5 Numărul total de cazuri pozitive de rabie înregistrate în județele Moldovei
Fig. 4.5 Total number of positive cases recorded in Moldova counties

Prezența și prevalența infecției rabice la animale în județul Suceava

Județul Suceava, situat în extremitatea nord-estică a țării, ocupă prima poziție în ceea ce privește numărul cazurilor pozitive de rabie din regiunea Moldovei, în urma corelării datelor obținute de la DSVSA și a celor raportate pe OIE. În perioada luată în studiu 2010-2016, a fost primit către testare un total de 578 probe provenite de la animale suspecte de rabie. Dintre acestea 118 au provenit de la animale domestice, iar restul de 460 de la cele sălbatice.

După județul Iași, Suceava ocupă a doua poziție în ceea ce privește cazurile de rabie în rândul animalelor domestice. Astfel, din totalul celor 118 probe primite pentru testare, 58 au provenit de la bovine, 34 de la câini, 13 de la pisici, 7 de la ovine, 3 de la caprine, 2 de la cabaline și o singură probă de la o porcină. Cele mai multe cazuri pozitive au fost înregistrate la bovine, cu un total de 38 de probe (32,20%), urmate de câini cu 4 cazuri (3,39%), ovine (1,70%) și caprine (1,70%) cu câte 2 cazuri și o pisică cu un singur caz (0,84%) (Tabel 4.3). Prevalența totală a cazurilor pozitive de rabie în rândul animalelor domestice pentru cei 7 ani luați în studiu a fost de 39,83%.

În ceea ce privește repartitia cazurilor pozitive pe ani, cele mai multe dintre acestea au fost raportate în anul 2012 cu 13 cazuri (10 bovine, 2 câini, 1 pisică), urmat îndeaproape de anul 2013 cu 12 cazuri (8 bovine, 2 ovine, 2 caprine), anul 2011 cu 10 cazuri (8 bovine, 2 câini), anul 2014 cu 7 cazuri (7 bovine), la polul opus aflându-se anii 2010 (2 bovine), respectiv 2016 (2 bovine) cu câte 2 cazuri și anul 2015 cu un singur caz (1 bovină).

Tabel 4.3 / Table 4.3

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Suceava
 Situation of positive and negative cases of rabies in domestic animals during 2010-2016 in Suceava County

Animale domestice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bovine	2	6	8	0	10	4	8	5	7	1	1	0	2	4	38	20
Câini	0	7	2	0	2	8	0	3	0	2	0	4	0	6	4	30
Ovine	0	0	0	0	0	2	2	0	0	2	0	0	0	1	2	5
Caprine	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	2	1
Pisici	0	5	0	0	1	4	0	1	0	2	0	0	0	0	1	12
Cabaline	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Porcine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	2	15	10	0	13	18	12	10	7	7	1	5	2	11	47	71

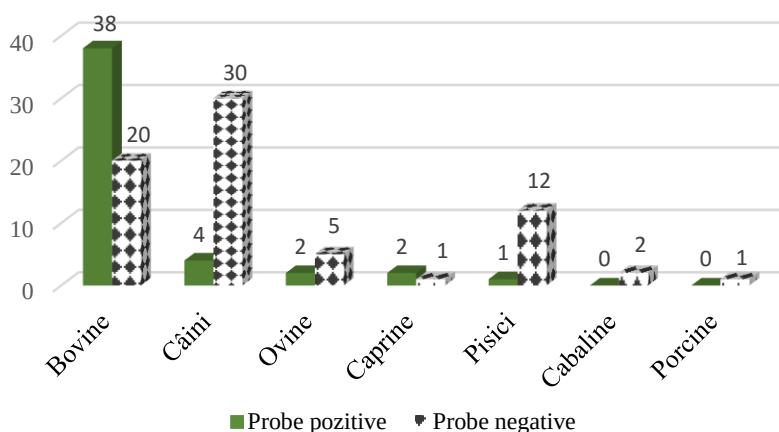


Fig. 4.6 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Suceava

Fig. 4.6 The total number of positive and negative cases of rabies recorded in domestic animals during 2010-2016 in Suceava County

Referitor la situația animalelor sălbatice, numărul cazurilor pozitive raportate a fost dublu comparativ cu cel de la animalele domestice. Din totalul celor 460 de probe testate, 451 dintre acestea au provenit de la vulpi, 3 de la jderi, 2 probe de la lupi și o singură probă de la un bursuc, respectiv o pisică sălbatică, o nevăstuică și un cerb. Cele mai multe cazuri pozitive au fost înregistrate în rândul vulpilei, cu un total de 93 (16,09%), urmate de 3 cazuri (0,52%) la jderi și un singur caz (0,17%) la un bursuc (Tabel 4.4).

În ceea ce privește repartitia cazurilor pozitive pe ani, cele mai multe au fost raportate în anul 2011 cu 31 de cazuri (29 vulpi, 2 jderi), urmat de anul 2012 cu 25 de cazuri (24 vulpi, 1 jder), anul 2013 cu 21 de cazuri (20 vulpi, 1 bursuc), anul 2010 cu 15 cazuri (15 vulpi), la polul opus aflându-se anii 2014 cu 3 cazuri (3 vulpi), 2016 cu 2 cazuri (2 vulpi) și nici un caz pentru anul 2015. Prevalența totală a cazurilor pozitive de rabie în rândul animalelor sălbatice pentru cei 7 ani luați în studiu a fost de 16,78%.

Tabel 4.4 / Table 4.4

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Suceava
Situation of positive and negative cases of rabies in wild animals during 2010-2016 in Suceava County

Animale sălbatice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Vulpi	15	68	29	68	24	47	20	53	3	41	0	42	2	39	93	358
Jderi	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Bursuci	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pisici sălbatice	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nevăstuici	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cerbi	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lupi	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
Total	15	68	31	70	25	49	21	53	3	42	0	42	2	39	97	363

Prezența și prevalența infecției rabice la animale în județul Iași

Județul Iași este situat în partea de est a țării, în Câmpia Moldovei, fiind punct de frontieră cu Republica Moldova. Conform datelor obținute după realizarea situației epidemiologice desfășurate pe parcursul celor 7 ani, Iași se află pe locul al doilea în ceea ce privește numărul total de cazuri pozitive de rabie raportate. În perioada 2010-2016, 563 de probe provenite de la animale suspecte de rabie au fost supuse testărilor, dintre care 211 de la animale domestice, iar 351 de la cele sălbatice.

Din totalul celor 211 probe provenite de la animale domestice, 48 dintre acestea au fost confirmate pozitive, restul de 163 fiind negative. Cele mai multe cazuri au fost raportate în rândul bovinelor cu 19 cazuri (9%), urmate de câini cu 14 cazuri (6,64%), pisici cu 11 cazuri (5,21%), cabaline cu 3 cazuri (1,42%) și un singur caz la o porcină (0,47%) (Tabel 4.5), prevelanța totală al celor 7 ani luați în studiu fiind de 22,74%.

În ceea ce privește repartitia cazurilor pozitive pe ani, cele mai multe cazuri de rabie au fost înregistrate în anii 2012 (7 bovine, 1 câine, 4 pisici) și 2013 (4 bovine, 4 câini, 4 pisici) cu câte 12 cazuri fiecare, urmate îndeaproape de anii 2010 (6 bovine, 2 pisici, 3 cai) și 2011 (9 câini, 1 pisică, 1 porc) cu câte 11 cazuri fiecare, la polul opus aflându-se 2014 cu 2 cazuri (2 bovine) și anii 2015-2016 cu zero cazuri.

Tabel 4.5 / Table 4.5

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Iași
Situation of positive and negative cases of rabies in domestic animals during 2010-2016 in Iași County

Animale domestice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bovine	6	0	0	1	7	5	4	1	2	3	0	4	0	2	19	16
Câini	0	14	9	12	1	21	4	11	0	8	0	8	0	6	14	80
Pisici	2	12	1	6	4	6	4	15	0	11	0	7	0	0	11	57
Cabaline	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	1
Porcine	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Ovine	0	1	0	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	7
Caprine	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	11	27	11	22	12	34	12	29	2	22	0	20	0	9	48	163

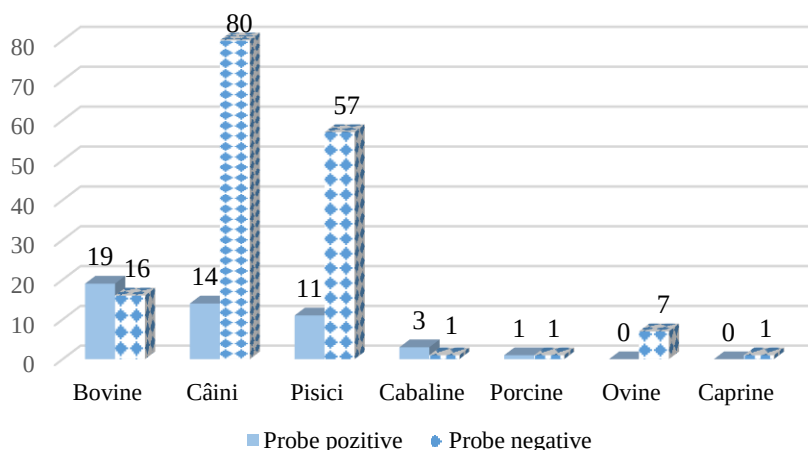


Fig. 4.7 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Iași

Fig. 4.7 The total number of positive and negative cases of rabies recorded in domestic animals during 2010-2016 in Iași County

Cele mai multe probe testate pentru suspiciunea de rabie au provenit de la animalele sălbatice, cu un total de 351 de probe. Dintre acestea, 63 au fost confirmate ca fiind pozitive, iar restul de 288, negative. Cu toate că, au fost primite către testare probe provenite de la mai multe specii de animale sălbatice, cele mai multe cazuri pozitive au fost raportate în rândul vulpilei, așa cum era de așteptat, cu un total de 60 de probe (17,09%), urmate de dihori cu doar 3 probe (0,85%).

Cel mai mare număr de cazuri pozitive a fost înregistrat în anii 2012 cu 17 cazuri (17 vulpi) și 2013 cu 20 de cazuri (17 vulpi, 3 dihori), reprezentând apogeul cazurilor de rabie pentru toate județele regiunii Moldova, urmați îndeaproape de 2010 și 2011 cu 13 (13 vulpi) și respectiv 12 cazuri (12 vulpi). La polul opus s-au situat anul 2016 cu un singur caz (1 vulpe) și anii 2014-2015 cu zero cazuri. Prevalența totală al cazurilor de rabie raportate la animalele sălbatice a înregistrat un procent de 17,94%.

Tabel 4.6 / Table 4.6

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Iași
Situation of positive and negative cases of rabies in wild animals during 2010-2016 in Iași County

Animale sălbatice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Vulpi	13	36	12	13	17	19	17	38	0	49	0	46	1	75	60	276
Dihori	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	1
Bursuci	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4
Căpriori	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4
Pisici sălbatice	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
Veveriță	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	13	38	12	13	17	24	20	41	0	50	0	47	1	75	63	288

Prezența și prevalența infecției rabice la animale în județul Bacău

Județul Bacău, situat în nord-estul țării, este pe locul 3 în ceea ce privește numărul total al cazurilor de rabie raportate în perioada 2010-2016. Un total de 218 probe provenite de la animale suspecte de rabie au fost testate, dintre care 110 de la animalele domestice și 108 de la cele sălbatice.

Ca și în cazul județelor vecine, o gamă variată de specii de animale domestice a fost testată. Astfel, 46 de probe provenite de la câini, 28 de la bovine, 23 de la pisici, 6 de la caprine, 6 de la ovine și o singură probă de la porcine au fost primite la laborator în vederea realizării diagnosticului pentru rabie. Dintre acestea, cele mai multe cazuri pozitive au fost confirmate la bovine, în număr de 7 (6,36%), urmate de 3 câini (2,72%) și două pisici (1,82%), înregistrându-se o prevalență totală de 10,90%.

Cele mai multe cazuri pozitive au fost raportate în anul 2016 (4 bovine), urmat îndeaproape de anul 2012 cu 3 cazuri (2 bovine, 1 pisică), anii 2010 (1 pisică, 1 câine) și 2013 (1 bovină, 1 pisică) cu câte 2 cazuri fiecare și un singur caz în anul 2015 confirmat la o pisică (Tabel 4.7).

Tabel 4.7 / Table 4.7

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Bacău
Situation of positive and negative cases of rabies in domestic animals during 2010-2016 in Bacău County

Animale domestice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bovine	0	6	0	1	2	2	1	10	0	2	0	0	4	0	7	21
Pisici	1	2	0	1	0	1	1	4	0	4	1	3	0	5	3	20
Câini	1	9	0	8	1	2	0	8	0	4	0	4	0	9	2	44
Ovine	0	3	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	6
Caprine	0	0	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	6
Porcine	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	2	20	0	10	3	8	2	29	0	10	1	7	4	14	12	98

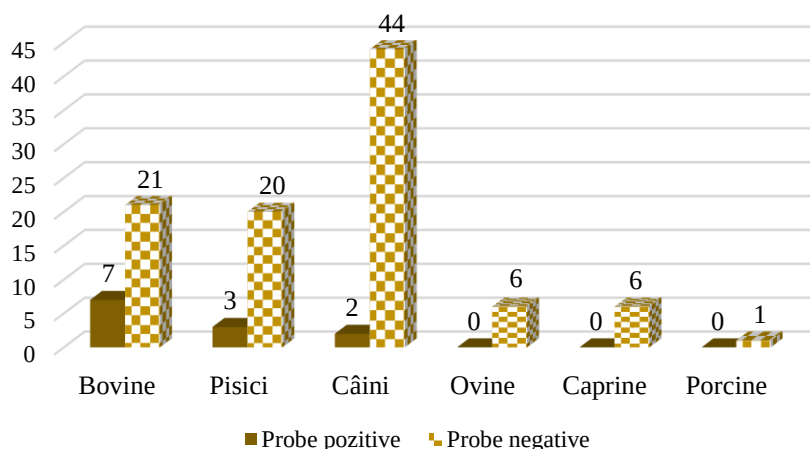


Fig. 4.8 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Bacău

Fig. 4.8 The total number of positive and negative cases of rabies recorded in domestic animals during 2010-2016 in Bacău County

Un număr crescut de probe provenite de la animale sălbatice au fost trimise la laborator pentru testare. Astfel, un total de 108 probe, dintre care 99 au provenit de la vulpi, 2 de la jderi, 2 de la cerbi, 2 de la lupi, 2 de la căpriori și una de la o pisică sălbatică. Ca și în cazul celorlalte județe, cele mai mare număr de cazuri pozitive au fost înregistrate în rândul vulpilei, cu un total de 40 de probe (37,05%), urmate de către 2 jderi (1,85%), un lup (0,92%), un căprior (0,92%) și o pisică sălbatică (0,92%).

Cele mai multe cazuri pozitive au fost raportate în anul 2013 (12 vulpi, 2 jderi), urmat îndeaproape de anii 2010 (11 vulpi, 1 lup) și 2012 (10 vulpi, 1 căprior, 1 pisică sălbatică) cu câte 12 cazuri fiecare, anul 2015 cu 2 cazuri (2 vulpi) și nici un caz pentru anii 2011, respectiv 2016. Prevalența totală înregistrată pentru perioada luată în studiu a fost de 41,66%.

Tabel 4.8 / Table 4.8

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Bacău
Situation of positive and negative cases of rabies in wild animals during 2010-2016 in Bacău County

Animale sălbatice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Vulpi	11	15	0	9	10	17	12	5	5	4	2	3	0	6	40	59
Jderi	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Lupi	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
Căpriori	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Pisici sălbatice	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Cerbi	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Total	12	15	0	11	12	17	14	7	5	4	2	3	0	6	45	63

Prezența și prevalența infecției rabice la animale în județul Botoșani

Județul Botoșani este situat în nord-estul țării, la granița cu Ucraina și Republica Moldova. Conform statisticii realizate pentru perioada 2010-2016, acesta se află pe locul al 4-lea în ceea ce privește numărul total al cazurilor de rabie. Un total de 234 de probe provenite de la animale suspecte de rabie au fost primite la laborator pentru testare. Dintre acestea, 72 au provenit de la animale domestice, iar 162 de la cele sălbatice.

Ca și în cazul celorlalte județe vecine luate în studiu, cele mai afectate animale domestice au fost bovinele cu un total de 19 cazuri (26,38%) și câinii cu 7 cazuri (9,72%), la pisică fiind raportat un singur caz (1,4%) pe parcursul acestor 7 ani, înregistrându-se o prevalență totală de 37,5%.

În ceea ce privește repartitia cazurilor pozitive pe ani, cele mai multe au fost înregistrate în anul 2012 cu 11 cazuri (8 bovine, 3 câini), urmat îndeaproape de anii 2010 (5 bovine, 1 câine) și 2013 (4 bovine, 3 câini) cu câte 7 cazuri, la polul opus situându-se anii 2011 (1 bovină), respectiv 2014 (1 bovină) cu câte un caz și anii 2015-2016 cu zero cazuri.

Tabel 4.9 / Table 4.9

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Botoșani
 Situation of positive and negative cases of rabies in domestic animals during 2010-2016 in Botoșani County

Animale domestice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bovine	5	0	1	11	8	0	4	0	1	6	0	0	0	0	19	17
Câini	1	0	0	6	3	0	3	16	0	0	0	0	0	0	7	22
Pisici	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
Cabaline	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Ovine	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	3
Caprine	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	7	0	1	18	11	0	7	19	1	8	0	0	0	0	27	45

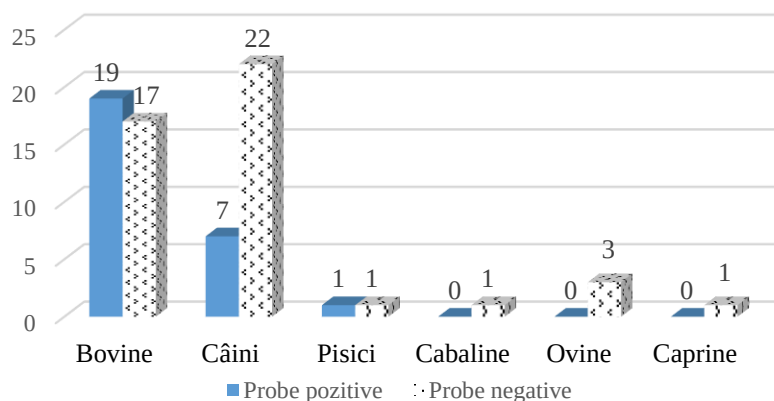


Fig. 4.9 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Botoșani

Fig. 4.9 The total number of positive and negative cases of rabies recorded in domestic animals during 2010-2016 in Botoșani County

În cazul animalelor sălbatice, au fost primite la laborator către testare doar probe recoltate de la vulpi și de la o singură pisică sălbatică. Din totalul celor 162 de probe, 15 cazuri pozitive (9,26%) au fost confirmate la vulpi și o singură probă (0,61%) la o pisică sălbatică. Cele mai multe cazuri de rabie au fost înregistrate în anul 2012 în număr de 10 (10 vulpi), acest trend fiind observat și în cazul celorlalte județe, la polul opus situându-se anii 2013 cu 3 cazuri (2 vulpi, 1 pisică sălbatică), 2010 cu 2 cazuri (2 vulpi), 2011 cu un singur caz (1 vulpe) și zero cazuri pentru anii 2014-2016. Prevalența totală al celor 7 ani luați în studiu a fost de 9,87%.

Tabel 4.10 / Table 4.10

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Botoșani
 Situation of positive and negative cases of rabies in wild animals during 2010-2016 in Botoșani County

Animale sălbatice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Vulpi	2	14	1	15	10	31	2	53	0	33	0	0	0	0	15	145
Pisici sălbatice	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Total	2	14	1	15	10	31	3	53	0	33	0	0	0	0	16	145

Prezența și prevalența infecției rabice la animale în județul Vaslui

Județul Vaslui, situat în estul României, în apropierea frontierei cu Republica Moldova, ocupă locul al 5-lea în ceea ce privește numărul total al cazurilor pozitive de rabie raportate în perioada 2010-2016. Astfel, din cele 186 de probe supuse testărilor provenite atât de la animale domestice (n=90), cât și de la animale sălbatice (n=96), au fost confirmate 38 de cazuri pozitive de rabie, din care 23 la animalele domestice și 15 la cele sălbatice.

În ceea ce privește situația rabiei în cazul animalelor domestice, în perioada luată în studiu, au fost testate 32 probe de bovine, 15 pisici, 29 câini, 8 ovine, 3 caprine, două porcine și o cabalină. Din totalul celor 90 de probe, 23 (25,56%) au fost pozitive și 67 (74,44%) negative (Tabel 4.11).

Cele mai multe cazuri pozitive de rabie în rândul animalelor domestice au fost raportate la bovine cu un total de 8 cazuri (8,89%), urmate de pisici cu 6 cazuri (6,67%), câini 5 cazuri (5,56%) și ovine 4 cazuri (4,44%), înregistrându-se o prevalență totală al celor 7 ani de 25,56%. Referitor la repartitia acestora pe ani, cele mai multe au fost raportate în anul 2012 cu un total de 9 cazuri, iar cele mai puține în anii 2012 și 2016 cu un caz per an și 0 cazuri în anul 2015

Tabel 4.11 / Table 4.11

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Vaslui
Situation of positive and negative cases of rabies in domestic animals during 2010-2016 in Vaslui County

Animale domestice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bovine	1	2	2	0	2	3	3	13	0	1	0	0	0	5	8	24
Pisici	3	1	1	0	0	3	0	2	1	2	0	1	1	0	6	9
Câini	1	2	0	2	4	1	0	5	0	2	0	3	0	9	5	24
Ovine	0	0	0	0	3	1	1	2	0	0	0	1	0	0	4	4
Caprine	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3
Porcine	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Cabaline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Total	5	6	3	3	9	9	4	22	1	6	0	6	1	6	23	67

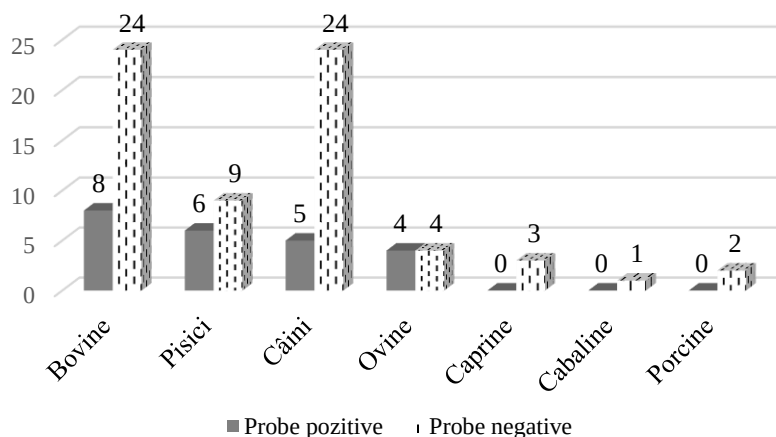


Fig. 4.10 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Vaslui

Fig. 4.10 The total number of positive and negative cases of rabies recorded in domestic animals during 2010-2016 in Vaslui County

Comparativ cu județele vecine, pentru județul Vaslui au fost primite pentru testare probe provenite de la o gamă variată de animale sălbatice, acestea fiind reprezentate de către: 90 de vulpi, o lamă, 2 dihori, 1 hamster, o vidră și o pisică sălbatică. Cu toate acestea, singurele cazuri pozitive au fost înregistrate doar la vulpi, cu un total de 15 cazuri din totalul celor 90 de probe primite la laborator (Tabel 4.12), înregistrând o prevalență totală a anilor luați în studiu de 15,62%. Cele mai multe cazuri pozitive au fost raportate în anii 2012 (8 cazuri) și 2013 (5 cazuri), la polul opus aflându-se 2014-2016 cu zero cazuri de rabie.

Tabel 4.12 / Table 4.12

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Vaslui
Situation of positive and negative cases of rabies in wild animals during 2010-2016 in Vaslui County

Animale sălbatice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Vulpi	2	9	0	6	8	20	5	1	0	21	0	9	0	9	15	75
Lame	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Dihori	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
Hamsteri	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Vidre	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pisici sălbatice	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	2	11	0	6	8	20	5	2	0	21	0	10	0	11	15	81

Ca și în marea majoritate a județelor luate în studiu, unde principalele specii de animale afectate de rabie au fost reprezentate de către bovine, câini, pisici, ovine și vulpi, același trend a fost observat și pe raza județului Vaslui.

Prezența și prevalența infecției rabice la animale în județul Vrancea

Județul Vrancea este situat în partea de sud-est a țării, la curbura Carpaților Orientali, la granița dintre regiunile Moldova și Muntenia. În perioada de studiu, 143 de probe provenite de la animale suspecte de rabie (67 de la animale domestice și 76 de la cele sălbatice) au fost testate pentru confirmarea sau infirmarea diagnosticului de rabie.

Comparativ cu județele vecine, a fost raportat un număr redus de cazuri de rabie în rândul animalelor domestice, 3 dintre acestea fiind înregistrate la câini în anii 2012-2013, iar două la pisici tot în anul 2012. Probele au provenit de la 31 câini, 10 pisici, 13 bovine, 10 caprine, 2 cabaline și o ovină. De remarcat faptul că, în ultimii 3 ani (2014-2016) nu a fost înregistrat nici un caz pozitiv. Prevalența celor 7 ani luați în studiu a înregistrat un procentaj de 7,46% în rândul animalelor domestice.

Tabel 4.13 / Table 4.13

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Vrancea
Situation of positive and negative cases of rabies in domestic animals during 2010-2016 in Vrancea County

Animale domestice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Câini	0	3	0	1	2	9	1	5	0	5	0	3	0	2	3	28
Pisici	0	1	0	0	2	3	0	0	0	2	0	2	0	0	2	8
Bovine	0	0	0	3	0	2	0	7	0	1	0	0	0	0	0	13
Caprine	0	1	0	1	0	2	0	6	0	0	0	0	0	0	0	10
Cabaline	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Ovine	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	0	6	0	2	4	18	1	18	0	8	0	5	0	2	5	62

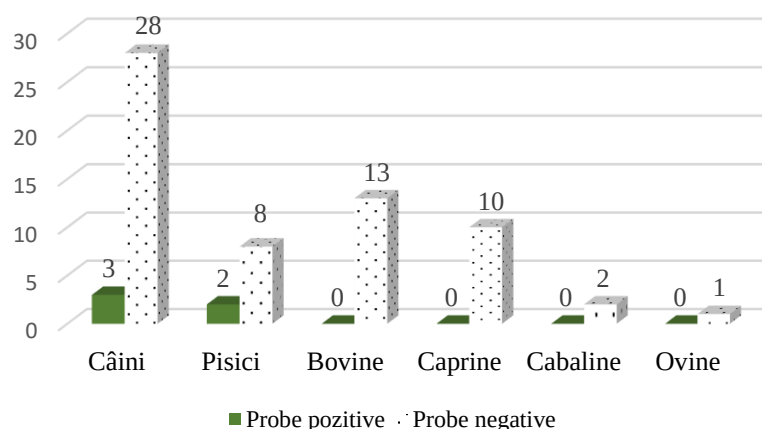


Fig. 4.11 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Vrancea

Fig. 4.11 The total number of positive and negative cases of rabies recorded in domestic animals during 2010-2016 in Vrancea County

Dacă animalele domestice au fost afectate într-un procent mai mic, lucrurile stau diferit când vine vorba de cele sălbatice. Astfel, un total de 76 de probe, provenite de la 41 de vulpi, 7 dihori, 4 lupi, 3 pisici sălbatice, 1 râs, 1 șobolan și 1 mistreț au fost supuse testărilor. Dintre acestea, 30 au fost confirmate pozitive, 25 provenind de la vulpi (32,90%), câte două de la dihori (2,63%), respectiv lupi (2,63%) și una singură de la o pisică sălbatică (1,31%). Cele mai multe cazuri pozitive au fost raportate în anul 2012 la vulpi, urmate de anul 2010 cu 6 cazuri (3 vulpi, 2 lupi, 1 dihor), anul 2013 cu 5 cazuri (4 vulpi și o pisică sălbatică), anul 2011 cu 4 cazuri (3 vulpi, 1 dihor) și câte un caz pentru anii 2015 și 2016, ambele fiind raportate la vulpi, înregistrându-se o prevalență totală al anilor luați în studiu de 39,47%.

Tabel 4.14 / Table 4.14

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Vrancea
Situation of positive and negative cases of rabies in wild animals during 2010-2016 in Vrancea County

Animale sălbatice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Vulpi	3	0	3	0	11	5	4	25	2	0	1	2	1	2	25	34
Dihori	1	1	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	2	5
Lupi	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2
Pisici sălbatice	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Râs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Șobolani	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Mistreți	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Total	6	3	4	1	11	5	5	30	2	2	1	3	1	2	30	46

Conform datelor obținute după corelarea celor 2 surse (DSVSA și OIE), Vrancea ocupă poziția a 6-a a cazurilor pozitive de rabie cu un total de 35 de cazuri din totalul celor 143 de probe testate pe parcursul celor 7 ani.

Prezența și prevalența infecției rabice la animale în județul Galați

Județul Galați este situat în partea de est a țării, fiind punctul de întâlnire a 3 mari regiuni: Moldova, Muntenia și Dobrogea. Conform statisticii realizate pe parcursul celor 7 ani luați în studiu, prin corelarea datelor obținute de la DSVSA-ul aferent și a celor de pe OIE, județul se află pe penultimul loc în ceea ce privește cazurile pozitive de rabie. Astfel, din totalul celor 78 de probe ajunse la laborator cu suspiciunea de rabie, 33 dintre acestea au fost confirmate ca fiind pozitive, iar 45 negative.

În cazul animalelor domestice, au fost testate în perioada menționată, un total de 39 de probe, dintre care 17 au provenit de la câini, 16 de la pisici, 4 de la bovine, o singură probă de la o caprină și una de la o cabalină. Cele mai multe cazuri pozitive au fost raportate la câini în număr de 8 (20,51%), urmate de bovine cu 4 cazuri (10,26%) și de câte un caz pentru pisici (2,56%), respectiv caprine (2,56%), înregistrându-se o prevalență totală de 35,89%. În ceea ce privește repartitia cazurilor pozitive pe ani, cele mai multe au fost raportate în anul 2012 (6 câini, o pisică), urmat îndeaproape de anul 2014 cu 5 cazuri (2 câini, 3 pisici) și de anii 2010, respectiv 2013 cu câte un singur caz. De precizat faptul că, pentru anii 2011, 2015 și 2016 nu au fost raportate cazuri de rabie în rândul animalelor domestice (Tabel 4.15).

Tabel 4.15 / Table 4.15

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Galați

Situation of positive and negative cases of rabies in domestic animals during 2010-2016 in Galați County

Animale domestice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Câini	0	0	0	0	6	0	0	3	2	2	0	3	0	1	8	9
Bovine	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	4	0
Pisici	0	1	0	0	1	6	0	2	0	2	0	3	0	1	1	15
Caprine	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Cabaline	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	1	1	0	0	7	7	1	5	5	4	0	6	0	2	14	25

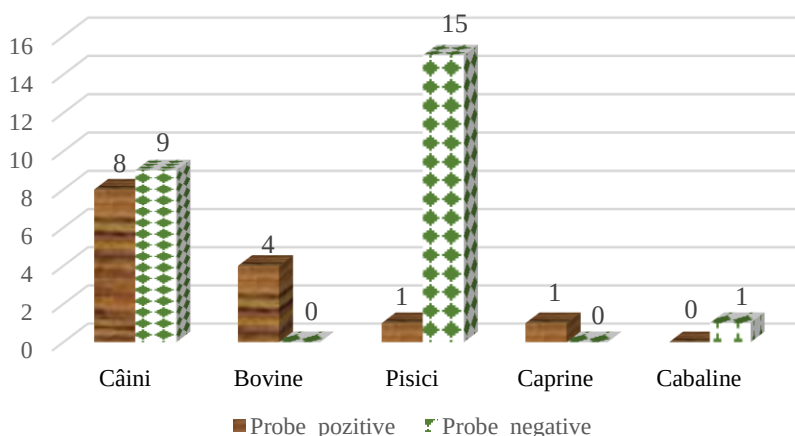


Fig. 4.12 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Galați

Fig. 4.12 The total number of positive and negative cases of rabies recorded in domestic animals during 2010-2016 in Galați County

În ceea ce privește animalele sălbatice, ca și în cazul celor domestice au fost primite pentru testare tot 39 de probe, după cum urmează: 34 de la vulpi, 2 de la cerbi lopătari, o singură probă de la o pisică sălbatică, respectiv căprior, dihor și lup. Din acest total, 19 dintre probe au fost pozitive, 18 (46,15%) dintre acestea provenind de la vulpi și una (2,56%) de la o pisică sălbatică. Cele mai multe cazuri pozitive au fost raportate în anul anul 2010 (8 vulpi, 1 pisică sălbatică), urmat de anii 2011 (3 vulpi) și 2013 (3 vulpi) cu câte 3 cazuri fiecare și de câte 2 cazuri pentru anii 2012 (2 vulpi) și 2014 (2 vulpi). Pentru anii 2015 și 2016 nu a fost raportat nici un caz pozitiv, situație întânită și în cazul animalelor domestice, prevalența totală înregistrată la animalele sălbatice fiind de 48,71%.

Tabel 4.16 / Table 4.16

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Galați
Situation of positive and negative cases of rabies in wild animals during 2010-2016 in Galați County

Animale sălbatice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Vulpi	8	1	3	3	2	1	3	3	2	5	0	0	0	3	18	16
Pisici sălbatice	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Cerbi lopătari	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Căprior	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Dihori	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Lupi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	9	4	3	3	2	1	3	3	2	5	0	2	0	3	19	21

Prezența și prevalența infecției rabice la animale în județul Neamț

În perioada 2010-2016, un total de 114 probe provenite atât de la animale domestice (n=74), cât și de la animale sălbatice (n=40) suspecte de rabie de pe raza județului Neamț, au fost supuse testărilor. Conform situației realizate prin corelarea datelor obținute din cadrul DSVSA-ului aferent cu a situației oficiale de pe OIE, acest județ se află pe ultimul loc în ceea ce privește numărul total de cazuri pozitive de rabie înregistrate în perioada 2010-2016.

Astfel, pe parcursul acestor ani, au fost testate 29 probe de bovine, 27 de câini, 5 pisici, 3 capre, 2 oi, 8 iepuri și 40 de vulpi.

În ceea ce privește situația animalelor domestice, pe parcursul celor 7 ani luați în studiu, din totalul celor 74 de probe testate, au fost raportate 8 cazuri pozitive (10,81%) la bovine și 4 la câini (5,40%). Cele mai multe cazuri pozitive la bovine au fost înregistrate în anul 2010 în număr de 4 și câte un caz în anii 2011, 2012, 2014 și respectiv 2015. Pentru cea de-a doua specie afectată, câinele, un total de 4 cazuri pozitive au fost confirmate, acestea înregistrându-se îndeosebi în anii 2010, 2012 și 2013. De remarcat faptul că, în anul 2016 nu a fost raportat nici un caz pozitiv de rabie la animalele domestice (Tabel 4.17). Prevalența înregistrată pentru cei 7 ani luați în studiu a fost de 16,21%.

Tabel 4.17 / Table 4.17

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Neamț
Situation of positive and negative cases of rabies in domestic animals during 2010-2016 in Neamț County

Animale domestice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bovine	4	2	1	1	1	3	0	13	1	0	1	0	0	2	8	21
Câini	2	8	0	4	1	2	1	4	0	3	0	1	0	1	4	23
Pisici	0	1	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5
Ovine	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Caprine	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	3
Iepuri	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8
Total	6	11	1	6	2	9	1	20	1	3	1	2	0	11	12	62

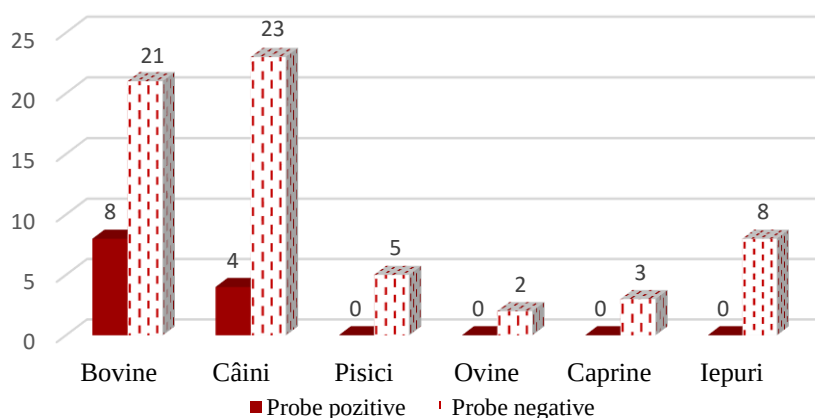


Fig. 4.13 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Neamț

Fig. 4.13 The total number of positive and negative cases of rabies recorded in domestic animals during 2010-2016 in Neamț County

Comparativ cu celelalte județe luate în studiu, unde a fost testat un număr variat de specii de animale sălbatice, în cazul județului Neamț, în perioada luată în studiu, au fost primite pentru confirmarea sau infirmarea diagnosticului de rabie un total de 40 de probe recoltate doar de la vulpi. Din acest total, 18 (45%) au fost confirmate pozitive, iar restul de 22 (55%), negative (Tabel 4.18). Prevalența cazurilor de rabie în rândul animalelor sălbatice a fost de 45%.

Tabel 4.18 / Table 4.18

Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Neamț
Situation of positive and negative cases of rabies in wild animals during 2010-2016 in Neamț County

Animale sălbatice	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Vulpi	6	2	2	1	7	1	2	3	0	3	1	7	0	5	18	22

Pe raza județului Neamț, a fost înregistrat cel mai scăzut număr de cazuri pozitive de rabie, comparativ cu celelalte județe din regiunea Moldovei, însumând un total de 30 de cazuri.

4.2 Investigații epidemiologice privind prezența și prevalența infecției rabice la animale în Republica Moldova

Investigațiile epidemiologice întreprinse în Republica Moldova au vizat aceeași perioadă de 7 ani (2010-2016) ca și în cazul celei efectuate în nord-estul României. Datele au fost colectate din cadrul Centrului Republican de Diagnostică Veterinară (CRDV) din Chișinău, fiind corelate cu situația oficială de pe Oficiul Internațional de Epizootii.

Țara este împărțită în 32 de raioane (Anenii Noi, Basarabeasca, Briceni, Cahul, Cantemir, Călărași, Căușeni, Cimișlia, Criuleni, Dondușeni, Drochia, Dubăsari, Edineț, Fălești, Florești, Glodeni, Hîncești, Ialoveni, Leova, Nisporeni, Ocnița, Orhei, Rezina, Rîșcani, Singerei, Soroca, Strășeni, Șoldănești, Ștefan Vodă, Taraclia, Telenești și Ungheni), 5 municipii (Chișinău, Bălți, Tighina, Tiraspol și Comrat) și 2 regiuni cu statut special (Unitatea Teritorială Autonomă Găgăuzia și Unitățile administrativ-teritoriale din stînga Nistrului sau Transnistria) (Fig. 4.14). Singurul laborator de pe teritoriul acestei țări care efectuează diagnosticul de laborator pentru confirmarea sau infirmarea rabiei este CRDV, situat în Chișinău.



Fig. 4.14 Harta Republicii Moldova (sursa: wikipedia.org)

Fig. 4.14 Republic of Moldova map (surse: wikipedia.org)

Situația cazurilor de rabie la animalele domestice. În perioada luată în studiu, 1150 de probe provenite de la animale domestice suspecte de rabie de pe întreg teritoriul țării, au fost primite la laborator în vederea confirmării sau infirmării bolii. Dintre acestea, 482 au provenit de la câini, 359 de la bovine, 205 de la pisici, 42 de la caprine, 27 de la ovine, 17 de la cabaline, 14 de la porcine, 2 de la măgari și 2 de la iepuri (Tabel 4.19).

Conform situației realizate, cele mai multe cazuri de rabie au fost raportate în rândul bovinelor cu un total de 255 de cazuri, urmate de câini cu 191 de cazuri, pisici cu 91 de cazuri, la polul opus aflându-se caprinele cu 13 cazuri, cabalinele cu 9 cazuri, porcinele cu 8 cazuri și 6 cazuri la ovine.

Referitor la repartitia cazurilor pozitive pe ani, cele mai multe au fost confirmate pe parcursul anului 2015, cu un total de 138 de cazuri, reprezentând apogeul rabiei la animalele domestice. În anul 2014 au fost raportate 94 de cazuri, urmat îndeaproape de anii 2010 și 2012 cu câte 80 de cazuri fiecare, anul 2013 cu 77 de cazuri, anul 2016 cu 64 de cazuri, cele mai puține fiind confirmate în anul 2011 cu doar 40 de cazuri.

Tabel 4.19 / Table 4.19

Numărul total de cazuri pozitive și negative înregistrate la animalele domestice pe teritoriul Republicii Moldova

Total number of positive and negative cases recorded in domestic animals in Republic of Moldova																
Specia	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bovine	37	22	19	5	56	43	33	18	20	8	68	8	22	0	255	104
Canine	27	37	13	38	12	85	26	41	53	7	38	58	22	25	191	291
Felidae	7	20	5	13	8	35	14	18	16	4	24	24	17	0	91	114
Caprine	1	0	0	3	1	8	2	1	2	13	5	4	2	0	13	29
Cabaline	3	0	1	1	1	1	2	1	1	0	1	2	0	3	9	8
Porcine	4	0	2	0	0	2	0	2	0	1	2	1	0	0	8	6
Ovine	1	3	0	3	2	13	0	1	2	0	0	1	1	0	6	21
Măgari	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Leporide	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Total	80	83	40	64	80	187	77	82	94	33	138	98	64	30	573	577

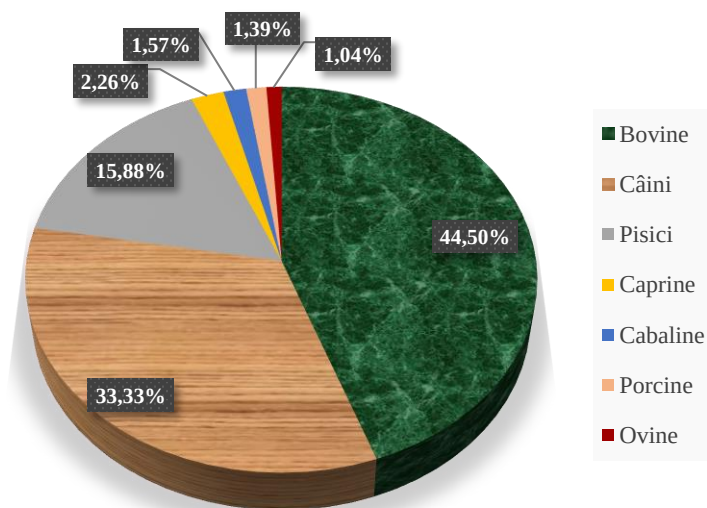


Fig. 4.15 Reprezentarea grafică a cazurilor pozitive de rabie la animalele domestice

Fig. 4.15 Graphical representation of rabies positive cases in domestic animals

Prevalența totală a cazurilor pozitive de rabie raportate în rândul animalelor domestice în perioada 2010-2016 a fost de 49,82%.

Situația cazurilor de rabie la animalele sălbatice

În perioada 2010-2016, 305 probe provenite de la animale sălbatice, dar și de la rozătoare, respectiv chiroptere supecte de rabie au fost primite la laborator pentru testare.

Cele mai multe dintre probe în număr de 227 au provenit de la vulpi, la polul opus aflându-se dihorii cu 16 probe, jderii cu 13 probe, căprioarele cu 12 probe, lilieci cu 8 probe, mistreții și șoarecii cu 4 probe fiecare, iepurii de câmp, nutriile și șobolanii cu 3 probe fiecare, cerbii, veverițele și bursucii cu câte 2 probe fiecare și câte o singură probe pentru capre sălbatice, șacali, arici, cobai, hârciogii și lamă (Tabel 4.20).

Din totalul probelor testate, 191 au fost pozitive și 114 negative. Primele 3 specii afectate au fost în ordine descrescătoare reprezentate de către vulpi cu 158 de cazuri, dihorii cu 12 cazuri și căprioare cu 10 cazuri. La polul opus s-au aflat jderii cu 3 cazuri și câte un singur caz pentru mistreț, capră sălbatică, șacal, arici, liliac, șoarece, cerb și iepure de câmp (Tabel 4.20), înregistrându-se o prevalență totală al cazurilor pozitive de 62,62%.

Tabel 4.20 / Table 4.20

Numărul total de cazuri pozitive și negative înregistrate la animalele sălbatice pe teritoriul Republicii Moldova

Total number of positive and negative cases recorded in wild animals in Republic of Moldova																	
Specia	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		Total		
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
Vulpi	23	16	15	10	26	17	22	18	32	4	28	4	12	0	158	69	
Dihori	3	1	0	0	3	3	1	0	2	0	1	0	2	0	12	4	
Căprioare	0	0	0	0	0	0	1	0	8	0	1	0	0	2	10	2	
Jderi	3	1	0	0	0	3	0	0	0	2	0	3	0	1	3	10	
Mistreți	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	
Capră sălbatică	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Șacali	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Arici	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Lilieci	0	0	0	4	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	1	7	
Șoareci	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	3	
Cerbi	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
Iepure de câmp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2	
Cobai	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Veverițe	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	
Bursuci	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	
Hârciogii	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Nutrie	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	
Șobolani	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	3	
Lamă	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
Total	30	18	17	19	29	34	24	24	45	6	31	9	15	6	191	114	

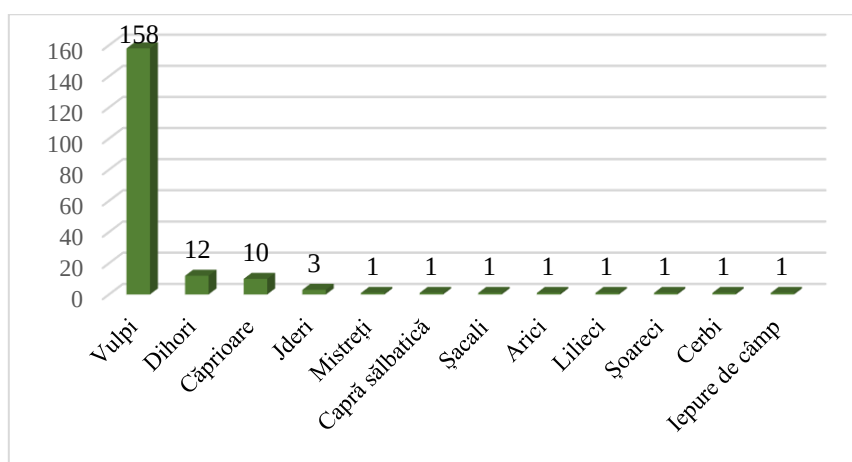


Fig. 4.16 Reprezentarea grafică a cazurilor pozitive de rabie înregistrate la animalele sălbatice, rozătoare și chiroptere

Fig. 4.16 Graphical representation of rabies positive cases recorded in wild animals, rodents and chiroptera

În ceea ce privește distribuția cazurilor pozitive raportate atât la animalele domestice, cât și la cele sălbatice, cele mai afectate au fost în special raioanele din centrul țării și mai puține din celelalte regiuni: Ungheni, Orhei, Strășeni, Călărași, Fălești, Anenii Noi, Soroca, Edineț și în municipiul Chișinău. La polul opus s-au aflat raioanele Bălți, Basarabeasca, Cimișlia, Ocnîța, Rîșcani și Ștefan Vodă (Tabel 4.21).

Tabel 4.21 / Table 4.21

Distribuția cazurilor pozitive de rabie pe raioane în perioada 2010-2016
Distribution of rabies positive cases on districts during 2010-2016

Nr.	Județ	Cazuri pozitive de rabie raportate în perioada 2010-2016							
		2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
1	Anenii Noi	4	3	3	7	8	9	3	37
2	Bălți	0	0	0	0	2	2	5	9
3	Basarabeasca	0	0	3	1	2	1	2	9
4	Briceni	2	0	2	2	3	0	5	14
5	Cahul	2	2	1	2	5	4	1	17
6	Călărași	5	4	9	12	3	5	2	40
7	Cantemir	2	2	0	1	1	1	3	10
8	Căușeni	0	0	0	0	3	4	4	11
9	Chișinău	5	3	5	6	13	4	3	39
10	Cimișlia	1	0	0	2	1	2	1	7
11	Criuleni	4	0	1	0	2	9	6	22
12	Dondușeni	1	0	3	1	4	6	7	22
13	Dubăsari	0	0	2	3	6	0	1	12
14	Drochia	2	1	9	6	0	5	2	25
15	Edineț	5	4	6	1	2	5	9	32
16	Fălești	6	2	9	4	4	13	0	38
17	Florești	3	2	3	2	5	3	1	19
18	Glodeni	12	3	1	5	3	2	2	28
19	Hincești	3	1	1	1	6	1	3	16
20	Ialoveni	0	0	2	3	3	4	3	15
21	Leova	0	0	0	3	3	2	1	9
22	Nisporeni	5	3	3	2	10	5	1	29
23	Ocnîța	0	0	0	0	1	1	1	3

Nr.	Județ	Cazuri pozitive de rabie raportate în perioada 2010-2016							
		2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
24	Orhei	13	2	6	5	10	8	2	46
25	Rezina	7	0	0	5	2	5	2	21
26	Rîșcani	1	3	1	0	0	3	1	9
27	Sîngerei	6	5	7	2	3	2	0	25
28	Soldanesti	2	1	0	1	0	0	0	4
29	Soroca	5	3	4	7	2	10	2	33
30	Ștefan-Vodă	2	1	0	0	0	4	0	7
31	Straseni	2	2	4	5	10	17	1	41
32	Taraclia	3	4	4	3	4	6	1	25
33	Telenești	2	1	1	5	5	6	0	20
34	Ungheni	5	5	17	3	9	11	2	52
35	U.T.A Gagauzia	0	0	2	1	4	9	2	18
36	Total	110	57	109	101	139	169	79	764

CONCLUZII PARȚIALE

Întrucât Republica Moldova nu dispune de un program de supraveghere și control în rândul vulpilor, situația cazurilor pozitive de rabie a fost scăpată de sub control de-a lungul acestor ani și nu numai.

Cazurile raportate în rândul animalelor domestice au fost triple comparativ cu cele din rândul animalelor sălbatice, situație complet diferită de cea înregistrată în cele 8 județe din regiunea Moldovei a țării noastre.

Astfel, dacă în Republica Moldova, de-a lungul celor 7 ani au fost raportate 573 de cazuri la animalele domestice înregistrându-se o prevalență totală de 49,82%, în regiunea luată în studiu din țara noastră, au fost confirmate 188 de cazuri, de 3 ori mai puține, cu o prevalență totală de 24,07%. În ambele țări, cele mai multe cazuri pozitive de rabie la animalele domestice au fost raportate la bovine.

Lucrurile stau diferit însă, când vine vorba de animalele sălbatice. Astfel, în Republica Moldova a fost testat un număr mult mai redus de probe (n=305) comparativ cu nord-estul țării noastre (n=1314). Astfel, prevalența cazurilor pozitive de rabie, raportată la cele 305 probe în Republica Moldova a fost de 62,62%, iar cea din nord-estul României de 23,05%. În ambele situații însă, vulpea a fost cea mai afectată din rândul animalelor sălbatice.

CAPITOLUL V
CONFIRMAREA DIAGNOSTICULUI DE RABIE PRIN METODA DE
IMUNOFLUORESCENȚĂ DIRECTĂ
CHAPTER V
RABIES DIAGNOSTIC CONFIRMATION BY DIRECT
FLUORESCENT ANTIBODY TEST

Introducerea testului cu anticorpi fluorescenți în studiul rabiei a revoluționat diagnosticul și cu toate că, acesta necesită tehnici microscopice speciale, este privit în prezent ca fiind superior tuturor celorlalte teste, din punct de vedere al rapidității, acurateții, sensibilității și specificității (99-100%) (Trimarchi ș.a., 1974; Palmer ș.a., 2005; Rudd ș.a., 2005).

Imunofluorescența directă (IFD) este metoda recomandată de către OMS și OIE, de referință în diagnosticul rabiei, alături de proba biologică pe șoareci (PBȘ) și izolarea virusului rabic pe culturi celulare (RTCIT – Rabies Tissue Cultures Infection Test) (Campbell ș.a., 1988).

În vederea obținerii unui rezultat de o mare acuratețe, pe lângă utilizarea de aparatură în stare optimă de funcționare, experiența personalului, alegerea unui conjugat calitativ prezintă o mare importanță. Numeroase tipuri de conjugate se găsesc pe piață la ora actuală pentru realizarea IFD-ului, cele mai utilizate la nivel european și nu numai, fiind reprezentate de către:

- BIO-RAD (BIO-RAD LABORATORIES, Marnes-la-Coquette Franța)
- FUJIREBIO (FDI FITC Antirabies Monoclonal Globulin / Fujirebio Diagnostics, Inc. Malvern, PA, USA)
- MILLIPORE (Light Diagnostic TM Rabies DFA Reagent, Livingston, United Kingdom)
- BIOVETA (Ivanovice na Hane, Cehia)
- SIFIN (Berlin, Germania)
- RABITEST (ROMVAC S.A. Romania).

Acestea pot prezenta diferite dezavantaje, de la costurile crescute la dificultatea în achiziționare până la specificitatea acestora. Astfel, anticorpii monoclonali din compoziția acestor conjugate prezintă o specificitate mult mai mare față de anticorpii policlonali, și asta datorită faptului că aceștia se fixează pe o gamă restrânsă de variante ale virusului rabic, însă alegerea tipului de anticorpi trebuie realizată și în funcție de variantele de virus rabic circulante pe teritoriul unei țări (OMS, 2017(a)).

Scopul acestor cercetări a fost acela de a reconfirma probele luate în studiu atât din nord-estul României, cât și din Republica Moldova înaintea caracterizării moleculare a acestora în vederea corelării rezultatelor, dar și de a evidenția conjugatul optim în vederea obținerii de rezultate precise și valide.

5.1 MATERIALE ȘI METODE

Probe luate în studiu. Zona inițială de studiu a fost reprezentată de către regiunea de nord-est a României (Fig. 5.1) însă, odată cu avansarea cercetărilor, au fost introduse noi probe din Republica Moldova.

Astfel, un total de 59 de probe de creier au fost luate în studiu, 38 din nord-estul României și 21 din Republica Moldova.

Probele din țara noastră au fost procurate din cadrul Direcțiilor Sanitar-Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor (DSVSA) județene, și anume Botoșani, Suceava, Iași, Piatra Neamț, Vaslui, Bacău, Galați, Vrancea și Maramureș, dar și din cadrul Institutului de Diagnostic și Sănătate Animală (IDSA) din București. Acestea au fost testate în cadrul laboratoarelor anterior menționate prin intermediul tehnicilor de diagnostic de rutină specifice rabiei, recomandate de către OMS și OIE, și anume imunofluorescența directă (IFD) și proba biologică pe șoareci (doar în cazul rezultatelor negative sau dubioase obținute la IFD), cu excepția probelor din Maramureș, care au provenit din campaniile de vânatoare, ele nefiind testate pentru rabie.

Probele au fost izolate în perioada 2012-2016 atât de la animale domestice, cât și de la animale sălbatice suspecte de rabie, și anume: 1 pisică (*Felix catus*), 3 câini (*Canis canis*), 10 bovine (*Bos taurus*), 1 lup (*Canis lupus*), 1 căprior (*Capreolus capreolus*) și 22 vulpi (*Vulpes vulpes*) (Tabel 5.1).



Fig. 5.1 Harta României cu originea geografică a celor 38 de probe (original)

Fig. 5.1. Romanian map with the geographical origin of the 38 samples (original)

În ceea ce privește probele de creier din Republica Moldova, acestea au fost procurate din cadrul Centrului Regional de Diagnostic Veterinar (CRDV) din Chișinău. Astfel, au fost luate în studiu 21 de probe, izolate pe parcursul anilor 2016 și 2017 în județele Anenii Noi, Briceni, Criuleni, Călărași, Camenca, Chișinău, Cahul, Comrat, Cimișlia, Căușeni, Dondușeni, Edineț, Ialoveni, Nisporeni, Orhei, Slobozia și Strășeni. Acestea au provenit de la 5 câini, 4 pisici, 9 bovine, o capră (*Capra aegragus hircus*), o vulpe și un dihor (*Mustela putorius*), fiind testate în cadrul laboratorului prin IFD și probă biologică pe șoareci (doar în cazul rezultatelor negative sau dubioase obținute la IFD).

Tabelul 5.1 descrie originea geografică a probelor, atât din România, cât și din Republica Moldova, sursa, anul izolării și specia de la care au fost izolate. Probele sunt introduse în tabel în ordinea testărilor efectuate în cadrul laboratorului din Nancy, Franța.

Tabel 5.1 / Table 5.1

Probele testate din Romania și Republica Moldova
Tested samples from Romania and Republic of Moldova

Nr.	Țara	Oraș	Specie	Cod probă	Anul izolării	Sursa	Rezultat IFD
1	Romania	Bârlad	Vulpe	DR1016	2013	DSVSA VS	Negativ
2	Romania	Bârlad	Pisică	DR1017	2014	DSVSA VS	Pozitiv
3	Romania	Vrancea	Vulpe	DR1018	2015	DSVSA VN	Pozitiv
4	Romania	Vrancea	Vulpe	DR1019	2014	DSVSA VN	Pozitiv
5	Romania	Vrancea	Vulpe	DR1020	2013	DSVSA VN	Pozitiv
6	Romania	Vrancea	Lup	DR1021	2014	DSVSA VN	Pozitiv
7	Romania	Vrancea	Bovină	DR1022	2013	DSVSA VN	Pozitiv
8	Romania	Vrancea	Bovină	DR1023	2013	DSVSA VN	Pozitiv
9	Romania	Bacău	Vulpe	DR1024	2012	DSVSA BC	Pozitiv
10	Romania	Bacău	Vulpe	DR1025	2012	DSVSA BC	Pozitiv
11	Romania	Bacău	Câine	DR1026	2012	DSVSA BC	Pozitiv
12	Romania	Bacău	Căprior	DR1027	2012	DSVSA BC	Pozitiv
13	Romania	Iași	Bovină	DR1028	2013	DSVSA IS	Pozitiv
14	Romania	Iași	Bovină	DR1029	2014	DSVSA IS	Pozitiv
15	Romania	Iași	Bovină	DR1030	2013	DSVSA IS	Pozitiv
16	Romania	Galați	Bovină	DR1031	2015	DSVSA GL	Pozitiv
17	Romania	Neamț	Câine	DR1032	2012	DSVSA NT	Pozitiv
18	Romania	Neamț	Vulpe	DR1033	2013	DSVSA NT	Pozitiv
19	Romania	Neamț	Vulpe	DR1034	2013	DSVSA NT	Pozitiv
20	Romania	Neamț	Bovină	DR1035	2012	DSVSA NT	Pozitiv
21	Romania	Neamț	Câine	DR1036	2013	DSVSA NT	Pozitiv
22	Romania	Bârlad	Vulpe	DR1187	2014	DSVSA VS	Pozitiv
23	Romania	Maramureș	Vulpe	DR1188	2016	DSVSA MM	Negativ
24	Romania	Maramureș	Vulpe	DR1189	2016	DSVSA MM	Negativ
25	Romania	Maramureș	Vulpe	DR1190	2016	DSVSA MM	Negativ
26	Romania	Maramureș	Vulpe	DR1191	2016	DSVSA MM	Negativ
27	Romania	Maramureș	Vulpe	DR1192	2016	DSVSA MM	Negativ
28	Romania	Maramureș	Vulpe	DR1193	2016	DSVSA MM	Negativ
29	Romania	Maramureș	Vulpe	DR1194	2016	DSVSA MM	Negativ
30	Romania	Maramureș	Vulpe	DR1195	2016	DSVSA MM	Negativ
31	Romania	Maramureș	Vulpe	DR1196	2016	DSVSA MM	Negativ
32	Romania	Maramureș	Vulpe	DR1197	2016	DSVSA MM	Negativ
33	Republica Moldova	193 Chisinau	Capră	DR1198	2016	CRDV MD	Pozitiv
34	Republica Moldova	182 Chisinau	Pisică	DR1199	2016	CRDV MD	Negativ
35	Republica Moldova	146 Criuleni	Câine	DR1200	2016	CRDV MD	Pozitiv
36	Republica Moldova	167 Calarasi	Bovină	DR1201	2016	CRDV MD	Pozitiv
37	Republica Moldova	163 Camenca	Câine	DR1202	2016	CRDV MD	Negativ
38	Romania	Vrancea	Vulpe	DR1331	2016	IDSA	Pozitiv
39	Romania	Suceava	Bovină	DR1332	2016	IDSA	Pozitiv
40	Romania	Suceava	Vulpe	DR1333	2016	IDSA	Pozitiv
41	Romania	Botoșani	Bovină	DR1334	2016	IDSA	Pozitiv

Nr.	Țara	Oraș	Specie	Cod probă	Anul izolării	Sursa	Rezultat IFD
42	Romania	Iași	Vulpe	DR1335	2016	IDSA	Pozitiv
43	Romania	Botoșani	Bovină	DR1336	2016	IDSA	Pozitiv
44	Republica Moldova	Cahul	Pisică	DR1343	2016	CRDV MD	Pozitiv
45	Republica Moldova	Orhei	Vulpe	DR1344	2016	CRDV MD	Negativ
46	Republica Moldova	Criuleni	Bovină	DR1345	2016	CRDV MD	Pozitiv
47	Republica Moldova	Căușeni	Bovină	DR1346	2016	CRDV MD	Pozitiv
48	Republica Moldova	Edineți	Bovină	DR1347	2016	CRDV MD	Pozitiv
49	Republica Moldova	Comrat	Pisică	DR1348	2017	CRDV MD	Pozitiv
50	Republica Moldova	Nisporeni	Bovină	DR1349	2016	CRDV MD	Pozitiv
51	Republica Moldova	Cimișlia	Bovină	DR1350	2016	CRDV MD	Pozitiv
52	Republica Moldova	Dondiușeni	Pisică	DR1351	2016	CRDV MD	Pozitiv
53	Republica Moldova	Criuleni	Bovină	DR1352	2016	CRDV MD	Pozitiv
54	Republica Moldova	Căușeni	Bovină	DR1353	2016	CRDV MD	Pozitiv
55	Republica Moldova	Anenii Noi	Câine	DR1354	2016	CRDV MD	Negativ
56	Republica Moldova	Slobozia	Câine	DR1355	2016	CRDV MD	Negativ
57	Republica Moldova	Strășeni	Bovină	DR1356	2016	CRDV MD	Pozitiv
58	Republica Moldova	Ialoveni	Dihor	DR1357	2016	CRDV MD	Pozitiv
59	Republica Moldova	Briceni	Câine	DR1358	2016	CRDV MD	Pozitiv

Aceste probe au fost retestate în cadrul Laboratorului European de Referință în Rabie din Nancy, Franța, în stagiile de cercetare efectuate pe parcursul anilor 2015, 2016 și 2017 pentru prezența antigenului rabic și a virusului rabic prin intermediul tehnicilor de referință, și anume IFD și RTCIT, așa cum sunt descrise în “OIE *Terrestrial Manual*”, 2013.

Toate cele 59 de probe au fost testate inițial pentru confirmarea sau infirmarea diagnosticului de rabie, utilizând conjugatul francezesc Bio-Rad. Odată cu avansarea cercetărilor, alte 2 conjugate au fost testate pe un număr diferit de probe, cu scopul de a realiza un studiu comparativ privind calitatea fiecărui conjugat în parte, capacitatea de detecție a virusului rabic, intensitatea fluorescenței, distribuția și cantitatea de antigen rabic detectat, cât și colorația de fundal (Dascalu ș.a., 2017(a)). Astfel, cele 3 conjugate folosite au fost (Tabel 5.2):

- BIO-RAD (BIO-RAD LABORATORIES, Marnes-la-Coquette France);
- FUJIREBIO (FDI FITC Antirabies Monoclonal Globulin, Fujirebio Diagnostics, Inc. Malvern, PA, USA);
- RABITEST (ROMVAC S.A Romania).

Tabel 5.2 / Table 5.2

Conjugatele utilizate și caracteristicile acestora The conjugates used and their characteristics			
Conjugat	BIO-RAD	FUJIREBIO	RABITEST
Producător	BIO-RAD LABORATORIES, Marnes-la-Coquette France	Fujirebio Diagnostics, Inc. Malvern, PA, USA	ROMVAC S.A Romania
Compoziție	Anticorpi policlonali	Anticorpi monoclonali	Ser hiperimun de iepure/cobai
Detectie	Toate genotipurile de Lyssavirus, indiferent de specia de animal testată.	Virusul rabic clasic RABV (tulpinile fixe și sălbatice) și virusurile înrudite cu acesta (Duvenhage, Lagos Bat și Mokola)	Nu specifică
Reconstituire	În 3 ml apă distilată, centrifugare 5 min, la 1500 rpm.	În 5 ml apă distilată, repaus 30 min până la dizolvare.	1 ml apă distilată, centrifugare 10 min, 2000 rpm



Fig. 5.2 A) Conjugatul Bio-Rad; B) Conjugatul Rabitest (activ și martor); C) Aspectul conjugatelor după reconstituire. De la stânga la dreapta: Fujirebio, Bio-Rad și Rabitest (original)

Fig. 5.2 A) Bio-Rad conjugate; B) Rabitest conjugate (active and martor); C) The aspect of the conjugates after reconstitution. From left to the right: Fujirebio, Bio-Rad and Rabitest (original)

Materiale și echipamente. Acestea au fost reprezentate de: lame de teflon (Immuno-Cell Inc.), lamele (Knittel glass), spatulă de lemn, acetonă, hotă clasa a 2-a (Holten LaminAir, Danemarca), 3 conjugate (Bio-rad, Fujirebio, Rabitest), etuvă (Incucell, Fisher Bioblock Scientific, MMM Medcenter), tampon fosfat salin steril (TFS, Sigma Life Science, UK), apă distilată (Sigma Life Science, UK), mediu de montare (Light Diagnostics, USA) și de un microscop cu UV (Microscop UV Olympus BX41).

Tehnica pentru cele 3 tipuri de conjugate a respectat instrucțiunile descrise în “OIE *Terrestrial Manual*”, 2013, singura diferență fiind reprezentată de către reconstituirea conjugatelor, urmărindu-se recomandările producătorilor (Bio-Rad, Fujirebio și Rabitest).

Conjugate utilizate. Conjugatul Bio-Rad (Fig. 5.2A), furnizat sub formă liofilizată, conține o cantitate echivalentă a 3 ml de imunoglobuline adsorbite marcate. Acesta a fost reconstituit în 3 ml de apă distilată și centrifugat timp de 5 minute la 1500 rpm pentru clarificarea soluției, supernatantul obținut fiind cel utilizat pentru colorare.

Conjugatul Fujirebio se prezintă de asemenea sub formă liofilizată. Conținutul unui flacon a fost resuspendat în 5 ml de apă distilată și lăsat în repaus timp de 30 de minute până la dizolvare, după care a fost folosit pentru colorare.

Conjugatul Rabitest (Fig. 5.2B) se prezintă sub forma a 2 flacoane, și anume: ser antirabic fluorescent liofilizat activ (fl x 1 ml) și ser antirabic fluorescent liofilizat martor negativ (fl. x 1 ml). Conținutul ambelor flacoane se prezintă sub forma unei pastile pufoase de culoare gălbui-roșietică. Atât flaconul activ, cât și cel martor au fost resuspendate separat într-un ml de apă distilată, centrifugate timp de 10 min la 2000 rpm, supernatantul fiind cel folosit pentru colorare.

Principiul metodei constă în faptul că anticorpii monoclonali sau policlonali antirabici (în funcție de conjugatul ales), conjugați cu izotiocianat de fluoresceină (FITC), în prezența virusului rabic vor forma complexe antigen-anticorp. Dacă țesutul examinat nu conține antigen viral, complexele specifice antigen-anticorp nu se vor forma. FITC este o substanță stabilă și produce o fluorescență cu aspect de măr verde caracteristică, acestea fiind motivele pentru care se folosește în realizarea conjugatelor (Jackson ș.a., 2002).

Descrierea metodei:

- ❖ realizarea amprentelor de creier din zonele țintă pentru virusul rabic (cornul lui Ammon, bulb, cortex și trunchi cerebral) pe lame de teflon (Fig. 5.3A, B);
- ❖ eliminarea excesului de pe lamă cu o spatulă de lemn (Fig. 5.3C) ;
- ❖ fixarea lamelor în acetona la -20°C timp de 30 min (Fig. 5.3D, E);
- ❖ uscarea acestora sub hotă;
- ❖ adăugarea a 50 μl de conjugat pe fiecare amprentă în parte (Fig. 5.4A);
- ❖ incubarea la 37°C timp de 30 min într-o cameră umedă pentru a evita uscarea conjugatului (Fig. 5.4B);
- ❖ îndepărtarea conjugatului cu TFS, respectiv cu apă distilată (Fig. 5.4C);
- ❖ uscarea lamelor sub hotă;
- ❖ adăugarea unei picături de mediu de montare (Fig. 5.4D) și a lamei;
- ❖ citirea și interpretarea rezultatelor la microscopul cu UV (Fig. 5.4E).

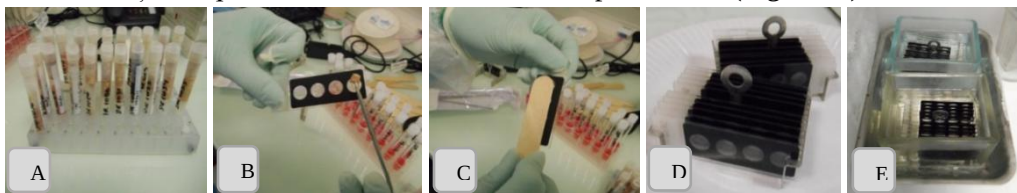


Fig. 5.3 A) Pregătirea probelor; B) Realizarea amprentelor; C) Îndepărtarea excesului cu o spatulă de lemn; D) Aranjarea lamelor în suport; E) Fixarea lamelor în acetona la -20°C, 30 min. (original)

Fig. 5.3 A) Samples preparation; B) Smears preparation; C) Excess removal with a wood spatula; D) Arranging the slides in the support; E) Smears fixation in cold acetone for 30 minutes (original)



Fig. 5.4 A) Adăugarea conjugatului; B) Incubare la 37°C, 30 min.; C) Îndepărtarea conjugatului cu TFS și apă distilată; D) Adăugarea unei picături de mediu de montare; E) Citirea la microscopul cu UV (original)

Fig. 5.4 A) Slides staining; B) Incubation at 37°C for 30 min.; C) Conjugate removal with the aid of PBS and distilled water; D) Mounting medium addition; E) UV microscope reading (original)

5.2 REZULTATE

În realizarea tehnicii IFD, pentru fiecare conjugat testat, au fost utilizate 2 controale pozitive obținute de la șoareci infectați experimental cu o tulpină fixă de laborator CVS-27 (Challenge Virus Standard), respectiv cu EBLV-1b izolat de la un liliac din specia *Epesicus serotinus*, dar și un control negativ (creier provenit de la șoarece sănătos), necesare pentru validarea tehnicii.

Astfel, pentru confirmarea sau infirmarea diagnosticului de rabie pentru cele 59 de probe luate în studiu, a fost utilizat conjugatul Bio-Rad, obținând un total de 43 de probe pozitive (DR1017-DR1036, DR1198, DR1200, DR1201, DR1331-DR1336, DR1343, DR1345-DR1353 și DR1356-DR1358) și 16 negative (DR1016, DR1188-DR1197, DR 1199, DR1202, DR1344, DR1354 și DR1355) (Tabel 5.1).

Pentru efectuarea studiului comparativ privind cele 3 tipuri de conjugate utilizate (Bio-Rad, Fujirebio și Rabitest), au fost testate 21 de probe (DR1016-DR1036). Astfel, pentru conjugatul Bio-Rad, din totalul celor 21 de probe, 20 au fost pozitive (DR1017-DR1036) și doar una singură, negativă (DR1016). Rezultatele obținute pentru celelalte 2 conjugate, au fost în concordanță cu cele obținute în cazul conjugatului Bio-Rad.

Probele DR1016 (Fig. 5.5A, B, C), DR1199, DR1202, DR1344, DR1354 și DR1355 considerate a fi pozitive în urma IFD-ului realizate de către laboratoarele județene din cadrul cărora au fost procurate, în urma retestărilor, acestea au fost negative atât la IFD, cât și la RTCIT, dar și la tehnicile de biologie moleculară, nefiind detectat ARN viral. De asemenea, cele 10 probe de vulpi provenite din Maramureș (DR1188-DR1197) au fost negative, atât prin IFD, cât și prin celelalte tehnici menționate anterior.

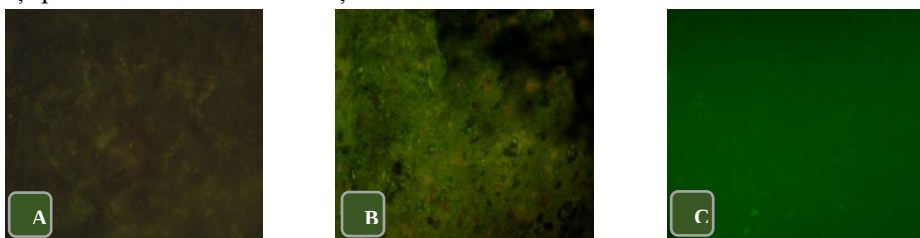


Fig. 5.5 A) IFD negativă, conjugat Bio-Rad, magnitudine x400, DR1016; B) IFD negativă, conjugat Fujirebio, magnitudine x400, DR1016; C) IFD negativă, conjugat Rabitest, magnitudine x400, DR1016 (original)
Fig. 5.5 A) Negative FAT, stained with Bio-Rad, x400, DR1016; B) Negative FAT, stained with Fujirebio, x400, DR1016; C) Negative FAT, stained with Rabitest, x400, DR1016 (original)

În ceea ce privește interpretarea rezultatelor, acestea au fost clasificate în două categorii: intensitatea fluorescenței, alături de distribuția și cantitatea de antigen rabic detectat.

Astfel, conform producătorilor, intensitatea fluorescenței fost evaluată pe o scară de la 4+ la negativ după cum urmează: 4+ fluorescență strălucitoare cu aspect de măr verde; 3+ fluorescență luminoasă cu aspect de măr verde; 2+ fluorescență slabă cu aspect de măr verde; 1+ fluorescență foarte slabă, dar detectabilă cu aspect de măr verde; negativ: nu apare fluorescență cu aspect de măr verde.

În cazul celor 3 conjugate folosite, atât Bio-Rad (Fig. 5.6 A, 5.7 A, 5.8 A), cât și Fujirebio (Fig. 5.6 B, 5.7 B, 5.8 B) au prezentat o colorație de fundal închisă ceea ce a dus la o evidențiere foarte bună a complexelor fluorescente atg-atc, comparativ cu Rabitest (Fig. 5.6 C,

5.7 C, 5.8 C), care a oferit o colorație de fundal verde deschis spre fluorescent, fiind mult mai greu de identificat aceste complexe și de a face o delimitare netă față de artefacte.

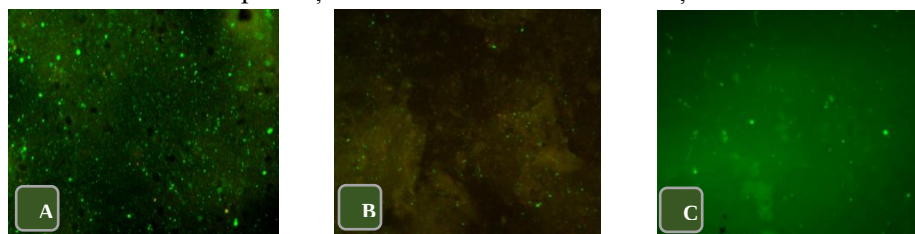


Fig. 5.6 A) IFD pozitivă, conjugat Bio-Rad, magnitudine x400, DR1017; B) IFD pozitivă, conjugat Fujirebio, magnitudine x400, DR1017; C) IFD pozitivă, conjugat Rabitest, magnitudine x400, DR1017 (original)

Fig. 5.6 A) Positive FAT, stained with Bio-Rad, x400, DR1017; B) Positive FAT, stained with Fujirebio, x400, DR1017; C) Positive FAT, stained with Rabitest, x400, DR1017 (original)

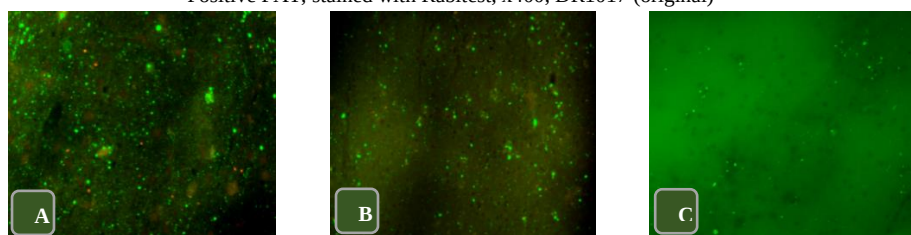


Fig. 5.7 A) IFD pozitivă, conjugat Bio-Rad, magnitudine x400, DR1027; B) IFD pozitivă, conjugat Fujirebio, magnitudine x400, DR1027; C) IFD pozitivă, conjugat Rabitest, magnitudine x400, DR1027 (original)

Fig. 5.7 A) Positive FAT, stained with Bio-Rad, x400, DR1027; B) Positive FAT, stained with Fujirebio, x400, DR1027; C) Positive FAT, stained with Rabitest, x400, DR1027 (original)

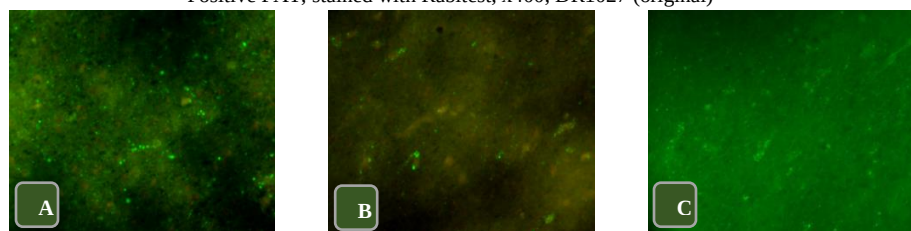


Fig. 5.8. A) IFD pozitivă, conjugat Bio-Rad, magnitudine x400, DR1028; B) IFD pozitivă, conjugat Fujirebio, magnitudine x400, DR1028; C) IFD pozitivă, conjugat Rabitest, magnitudine x400, DR1028 (original)

Fig. 5.8 A) Positive FAT, stained with Bio-Rad, x400, DR1028; B) Positive FAT, stained with Fujirebio, x400, DR1028; C) Positive FAT, stained with Rabitest, x400, DR1028 (original)

Cea mai ușoară interpretare și cele mai bune rezultate au fost obținute în cazul conjugatului Bio-Rad, colorația de fundal închisă oferindu-ne o fluorescență strălucitoare, respectiv luminoasă cu aspect de măr verde a complexelor atg-atc în cazul a 15 probe din 21 și o fluorescență slabă, dar detectabilă în cazul altor 5 probe.

Tabel 5.3 / Table 5.3

Rezultatele obținute pentru conjugatul Bio-Rad privind intensitatea fluorescenței al probelor luate în studiu

The results obtained for the Bio-Rad conjugate regarding the fluorescence intensity of the tested samples

Scara de evaluare a intensității fluorescenței	Probe luate în studiu (DR1016-DR1036)
4 +	DR1017, DR1024, DR1025, DR1027, DR1029
3 +	DR1018-DR1021, DR1026, DR1028, DR1030, DR1031, DR1033, DR1034
2 +	DR1022, DR1023, DR1032, DR1035, DR1036
1 +	-
Negativ	DR1016

Fujirebio s-a clasat pe locul al doilea, 13 probe din cele 21 încadrându-se în categoria 4+ și 3+ în ceea ce privește intensitatea fluorescenței și doar 7 dintre acestea în categoriile 2+ și 1+ cu o fluorescență slabă și foarte slabă, dar detectabilă.

Tabel 5.4 / Table 5.4

Rezultatele obținute pentru conjugatul Fujirebio privind intensitatea fluorescenței al probelor luate în studiu
The results obtained for the Fujirebio conjugate regarding the fluorescence intensity of the tested samples

Scara de evaluare a intensității fluorescenței	Probe luate în studiu (DR1016-DR1036)
4 +	DR1020, DR1021, DR1024, DR1025, DR1027, DR1031, DR1033, DR1034
3 +	DR1017-DR1019, DR1026, DR1036
2 +	DR1022, DR1023, DR1028, DR1029, DR1035
1 +	DR1030, DR1032
Negativ	DR1016

În cazul Rabitestului, rezultatele obținute au fost inferioare celorlalte două conjugate, nici o probă reușind să se încadreze în categoria 4+ și doar una singură în categoria 3+. Majoritatea probelor s-au încadrat în ultimele două categorii, și anume 2+ și 1+, mai exact 19 dintre acestea fiind incluse ca având o intensitatea a fluorescenței slabă și foarte slabă și relativ greu detectabilă.

Tabel 5.5 / Table 5.5

Rezultate obținute pentru conjugatul Rabitest privind intensitatea fluorescenței al probelor luate în studiu
The results obtained for the Rabitest conjugate regarding the fluorescence intensity of the tested samples

Scara de evaluare a intensității fluorescenței	Probe luate în studiu (DR1016-DR1036)
4 +	-
3 +	DR1026
2 +	DR1019-DR1021, DR1023-DR1025, DR1027, DR1031, DR1032, DR1034 și DR1035
1 +	DR1017, DR1018, DR1022, DR1028-DR1030, DR1032 și DR1036
Negativ	DR1016

Cea de-a doua categorie reprezentată de distribuția și cantitatea de antigen rabic detectat a fost evaluată la fel ca și în cazul intensității fluorescenței pe o scară de la 4+ la negativ, după cum urmează: 4+ / 3+ / 2+ / 1+ / negativ, antigen prezent în ~ 100% / 75% / 50% / 25% și 0% din câmpurile microscopice examinate per amprentă.

Astfel, pentru categoria de 100%, primul clasat a fost conjugatul Bio-Rad cu 5 probe (23,80%), urmat de Fujirebio cu 3 probe (14,28%) și nici o probă pentru Rabitest. Pentru a doua categorie de 75%, pe primul loc s-a clasat Fujirebio cu 7 probe (33,33%), urmat îndeaproape de Bio-Rad cu 6 probe (28,57%) și nici una pentru Rabitest.

În ceea ce privește detecția și distribuția antigenului în proporție de 50% din câmpurile microscopice examinate, pentru Rabitest s-au încadrat 10 probe (47,61%), pentru Bio-Rad 5 (23,80%), iar pentru Fujirebio 3 (14,28%). Pentru ultima categorie de 25%, 10 probe (47,61%) s-au înregistrat pentru Rabitest, 7 (33,33%) pentru Fujirebio și 4 (19,04%) pentru Bio-Rad.

Pentru proba DR1016, nu a fost detectat nici o urmă de antigen, fiind considerată negativă (Fig. 5.9).

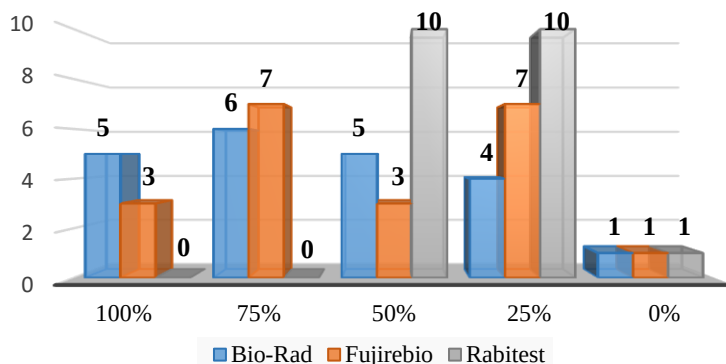


Fig. 5.9 Reprezentarea grafică a rezultatelor obținute privind distribuția de antigen rabic detectat în cazul celor 3 conjugate analizate Bio-Rad, Fujirebio și Rabitest. Scala de evaluare a fost aceeași ca și în cazul intensității fluorescenței, și anume de la 4+ la negativ

Fig. 5.9 Graphic representation of the results obtained regarding the distribution of rabies antigen detected in the three Bio-Rad, Fujirebio and Rabitest conjugates. The evaluation scale was the same as for fluorescence intensity, from 4+ to negative.

5.3 DISCUȚII

Diferențele de rezultate dintre cele obținute în cadrul laboratoarelor județene și cele din cadrul laboratorului din Franța, pot avea la bază mai multe explicații. Astfel, în marea majoritate a cazurilor, calitatea probelor de testat are o importanță majoră în obținerea unui rezultat valid, alături de cea a conjugatului implementat. Pentru a evita rezultatele fals pozitive sau negative, trebuie îndeplinite mai multe criterii, și anume: utilizarea de controale valide, folosirea unui conjugat calitativ cu o diluție și reconstituire adecvată, aparatură în condiții optime de funcționare și foarte important, respectarea cu strictețe a fiecărei etape în parte pentru a evita posibilele contaminări încrucișate între controalele pozitive și negative și între probele de testat (Jackson ș.a., 2002; Robardet ș.a., 2013(a)).

Eventuale erori de citire date de fluorescența nespecifică pot să apară în urma utilizării de probe aflate în stare de putrefacție sau inadecvat conservate, de aceea este recomandată examinarea de țesut proaspăt și nealterat, pentru a nu denatura exactitatea diagnosticului (Meslin ș.a., 1999). Degradarea probelor, în final va afecta sensibilitatea tuturor procedurilor de diagnostic (Jackson ș.a., 2002). De asemenea, calitatea deficitară a conjugatului, uscarea acestuia în etapa de incubare a lamelor la 37°C (dacă nu se adaugă apă distilată în tăviță), precipitarea FITC-ului datorată reconstituirii neadecvate, a depozitării sau al agenților de clarificare sau prezența de coci pozitivi în proba de testat pot duce la apariția de fluorescență nespecifică (Jackson ș.a., 2002).

O colorație de fundal redusă în cazul IFD-ului are o importanță remarcabilă pentru un diagnostic corect și precis în cazul rabiei, facilitându-ne astfel observarea complexelor fluorescente virus rabic – anticorpi antirabici. De asemenea, ne poate ajuta în a diferenția mult mai ușor artefactele de complexe atg-atc care, de multe ori pot reprezenta probleme grave ce pot duce ușor la un diagnostic fals pozitiv sau negativ. Zonele de creier examinate, durată și

tipul fixării probelor, alcalinitatea substanței de imersie, pH-ul substanței de imersie, folosirea unui microscop adecvat sunt factori ce pot contribui la afectarea sensibilității, respectiv a specificității IFD-ului (Pital ș.a., 1963; Durham ș.a., 1986; OIE, 2013, Robardet ș.a., 2013(a)). Substanța de imersie cu un pH de 8,5 este de preferat pentru obținerea unei fluorescențe bune și pentru menținerea strălucirii acesteia pentru o perioadă mai îndelungată de timp (Durham ș.a., 1986).

Din cunoștințele noastre, acesta este primul studiu ce a implicat conjugatul Rabitest atât pe probe pozitive, cât și negative. Pentru a putea compara calitatea acestuia, alte 2 conjugate au fost utilizate (Bio-Rad și Fujirebio). Într-un studiu realizat de către Robardet ș.a. în anul 2013, aceștia au comparat conjugatele Bio-Rad și Fujirebio alături de altele utilizate în tehnica de IFD, obținând de asemenea rezultate bune. Au fost raportate, în schimb, și probleme precum fluorescență nespecifică, fundal deschis la culoare, situații ce au fost în principal atribuite diluțiilor și recontiturilor neadecvate ale acestor conjugate, alături de performanța scăzută al unor laboratoare. Rezultatele noastre au arătat faptul că Bio-Rad se pretează cel mai bine pentru a fi folosit în confirmarea diagnosticului de rabie, oferind o intensitate crescută a semnalului fluorescent și un fundal întunecat, fiind capabil să identifice antigenul viral în 100% din câmpurile microscopice examinate într-un număr crescut de probe, pe când Rabitest nu a reușit să identifice concentrații atât de ridicate de antigen.

5.4 CONCLUZII PARȚIALE

Tehnica de imunofluorescență directă a fost realizată în cazul tuturor celor 59 de probe luate în studiu, atât din nord-estul României, cât și din Republica Moldova, rezultatele obținute fiind în concordanță cu toate tehnicile realizate ulterior, nefiind înregistrate rezultate fals negative sau fals pozitive, demonstrându-se sensibilitatea și specificitatea tehnicii în cauză.

Studiul nostru subliniază importanța utilizării unui conjugat calitativ în stabilirea unui diagnostic corect și precis. În majoritatea cazurilor, calitatea probelor de testat alături de cea a conjugatului implementat au o importanță majoră în obținerea unui rezultat valid, nerespectarea acestor recomandări ducând la posibilitatea aparițiilor de rezultate fals pozitive sau fals negative. Chiar dacă, un rezultat fals pozitiv nu are consecințe severe, unul fals negativ în schimb, poate avea consecințe tragice atunci când sunt implicate și victime umane.

În cadrul studiului comparativ privind cele 3 tipuri de conjugate utilizate, cele mai bune rezultate au fost obținute cu ajutorul conjugatului Bio-Rad, rezultate superioare celorlalte două, acesta oferind o intensitate crescută a semnalului fluorescent și un fundal întunecat, fiind capabil să identifice antigenul viral în 100% din câmpurile microscopice examinate într-un număr crescut de probe.

CAPITOLUL VI
CONFIRMAREA DIAGNOSTICULUI DE RABIE PRIN TEHNICA DE
IZOLARE A VIRUSULUI RABIC PE CULTURI CELULARE (RTCIT)
CHAPTER VI
RABIES DIAGNOSTIC CONFIRMATION BY RABIES TISSUE
CULTURE INFECTION TEST

În prezent, conform OIE și OMS, sunt recunoscute la nivel mondial trei tehnici de referință pentru confirmarea diagnosticului de rabie la animale, și anume: imunofluorescența directă (IFD), proba biologică pe șoareci (PBȘ) și izolarea virusului pe culturi celulare (*Rabies Tissue Culture Infection Test* - RTCIT) (OIE, 2013).

De-a lungul timpului, numeroase studii comparative au fost realizate între cele 3 tehnici de referință (Webster ș.a., 1976; Bourhy ș.a., 1989; Chhabra ș.a., 2007;). Înainte ca o tehnică să poată fi acceptată și considerată de referință, sensibilitatea acesteia trebuie comparată într-un mod riguros cu tehnicile recunoscute de către OMS. Astfel, dezvoltarea unei proceduri ce utilizează culturi celulare ca și alternativă pentru PBȘ trebuie să fie la fel de sensibilă (Rudd și Trimarchi, 1989).

PBȘ, cunoscută drept cea mai veche metodă utilizată în diagnosticul rabiei la animale, a fost inițiată de către Webster și Dawson în anul 1935 fiind încă realizată în unele țări (Bourhy ș.a., 1989), printre care și în România. Punctul forte al acestei metode, constă în abilitatea de a detecta cantități reduse de virus rabic din probe slab pozitive (Rudd și Trimarchi, 1989; Chhabra ș.a., 2007).

Aceasta însă, a fost înlocuită cu succes de către majoritatea țărilor dezvoltate cu RTCIT, fiind a doua cea mai utilizată tehnică de referință în diagnosticul rabiei. Cea din urmă oferă numeroase avantaje, printre care se numără costurile reduse, rapiditatea, ușurința în realizarea metodei, sensibilitatea crescută, capacitatea de a detecta cantități foarte scăzute de virus dintr-o probă și nu în ultimul rând lipsa utilizării animalelor de laborator (Rudd și Trimarchi, 1989; Kuzmin, 2014).

Scopul acestor cercetări a fost de a realiza RTCIT ca și metodă alternativă pentru PBȘ, de a evidenția linia celulară optimă pentru multiplicarea virusului rabic, dar și sistemul ideal în izolarea virusului rabic.

Astfel, acest capitol este structurat în 3 subcapitole:

- ❖ Izolarea virusului rabic pe culturi celulare (RTCIT) ca și metodă alternativă pentru proba biologică pe șoareci;
- ❖ Studiu comparativ privind sensibilitatea a două linii celulare distincte N2a și BHK-21 pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare.
- ❖ Utilizarea a două sisteme diferite pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare.

6.1. Izolarea virusului rabic pe culturi celulare (RTCIT) ca metodă alternativă pentru proba biologică pe șoareci

Începând cu anul 1982, numeroase țări au optat pentru înlocuirea PBȘ cu RTCIT, asta datorită numeroaselor avantaje și facilități pe care le oferă tehnica (Bourhy ș.a., 1989). Reducerea timpului în obținerea rezultatului de la 15-30 de zile în cazul PBȘ la doar 48 de ore în cazul metodei alternative, dar și sensibilitatea ridicată, egală, chiar superioară PBȘ, au fost doar câteva dintre motivele de bază ale implementării noii metode (Charlton ș.a., 1986; Webster, 1987).

6.1.1 MATERIALE ȘI METODE

Probe luate în studiu

RTCIT ca și metodă alternativă pentru PBȘ în vederea confirmării diagnosticului de rabie a fost realizată pentru toate cele 59 de probe luate în studiu din nord-estul României și din Republica Moldova. Toate detaliile privind originea geografică a probelor, anul, sursa și speciile de la care au fost izolate, sunt descrise în amănunt în Capitolul V.

Aceste probe au fost testate inițial în cadrul laboratoarelor din ambele țări prin intermediul IFD-ului, iar în cazul rezultatelor negative sau dubioase la prima tehnică și prin PBȘ.

Scopul acestei metode a fost de a izola virusul rabic pe culturi celulare, utilizând linia celulară N2a, ca și metodă alternativă pentru PBȘ.

Materiale necesare

Metoda a fost realizată cu ajutorul liniei celulare de referință N2a (neuroblastome murine), la concentrația celulară de 8×10^5 celule/ml, în cameră LabTek, cu ajutorul conjugatului Bio-Rad (Dascalu ș.a., 2017(d)).

Materialele folosite au fost atât biologice, cât și chimice. Cele biologice au fost reprezentate de către 2 controale pozitive CVS-27 (creier provenit de la șoarece infectat experimental cu tulpina CVS-27) și EBLV-1 (creier provenit de la un liliac infectat experimental cu EBLV-1b), 2 controale negative (creier provenit de la șoarece sănătos și linie celulară neinoculată) și probele de testat.

Cele chimice au implicat utilizarea următoarelor elemente: linia celulară N2a (ATCC CCL-131); mediu de cultură DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco by life technologies, UK); mediu de cultură GMEM (Glasgow Minimum Essential Medium, Sigma-Aldrich, Germany); ser de vițel nou-născut 5% (SVNN 5%, Sigma^R Life Science, UK); ser fetal bovin 10% (SFB 10%, Sigma^R Life Science, UK); tripsină 10%; acetonă 80% (Thermo Chemical, UK); conjugat BioRad (France, Lot 5K0067); tampon fosfat salin steril (Sigma Life Science, UK); Apă distilată (Sigma Life Science, UK); glicerină (Light Diagnostic, USA).

Echipamentele necesare acestei metode au fost următoarele: hotă laminară, clasa a-2 a, (Holten LaminAir, Danemarca); centrifugă (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X1R); vortex (Velp Scientifica ZX4 Vortex Mixer); cameră Neubauer (Optik Labor, Germany); cameră Labtek (Chamber SlideTM System, Thermo Fisher Scientific Inc, USA); pipetă aspirare (Vacuubrand, Germany); tuburi Rohren x 11,5 ml (Sarstedt, Germany); pipetă electronică

Multichannel cu vârfuri sterile, pipetă sterilă x 25 ml (Sarstedt, Germany); pipetă sterilă x 5 ml / x 10 ml / x 50 ml (Cellstar Greiner Bio-one); cuțit (pentru îndepărtarea marginilor de silicon de pe lame ce rămân după detașarea căsuțelor); microscop cu UV Olympus BX41; microscop cu LED Lordill AXIO cu ecran încorporat; microscop Lordil AE 2000; incubator CO₂ (SANYO); lamele (Knittel glass, Cover Slips 24 x 60mm); halat, mască, mănuși, ochelari de protecție.

Etapele metodei

Pregătirea mediului și a inoculului

Prima etapă a constat în pregătirea mediului DMEM prin suplimentarea acestuia cu antibiotic 1% (Penicilina 10.000 UI, Streptomicina 10.000 μg, Amfotericin 25 μg), antimicoplasmic Plasmocin 0,02% (2,5 μg/ml) și SVNN 5% (inactivat la 56°C timp de 30 de minute). În eprubete Rohren x 11,5 ml s-a realizat suspensia 1/5 de țesut cerebral (1 gram creier și 4 ml DMEM anterior pregătit), urmată de omogenizarea și centrifugarea acesteia timp de 15 min. la 3000 rpm, fiind depozitată la 4°C până la inoculare.

Pregătirea suspensiei celulare

Suspensia celulară a fost pregătită utilizând linia celulară N2a la concentrația celulară de 8×10^5 celule/ml și mediul de cultură anterior pregătit. Prezența unui monostratul celular de minim 80% la microscopul ranversat, a permis realizarea unei acțiuni mecanice cu tripsină, DMEM și SVNN 5%, asupra celulelor, urmate de numărarea acestora în camera Neubauer la microscopul ranversat, cu scopul de a dilua suspensia celulară într-o cantitate de mediu suficientă, care să asigure concentrația celulară finală.

Astfel, pașii pregătirii celulelor N2a pentru cutia de 75 cm² utilizată în laborator pentru menținerea liniei celulare a constat în:

- pregătirea tripsinei 10% (9 ml TFS și 1 ml tripsină);
- pregătirea mediului DMEM prin adăugarea serului de vițel nou-născut 5% (inactivat la 56°C timp de 30 min.), al antibioticelor și antimicoplasmelor;
- îndepărtarea mediului de cultură din cutie;
- tripsinizarea celulelor, realizată în 2 etape: adăugarea primilor 5 ml, urmați de mișcări ușoare de rotire pentru o distribuție uniformă a tripsinei peste monostratul celular; aruncarea tripsinei și adăugarea celorlalți 5 ml rămași, omogenizarea și îndepărtarea acesteia, urmate de incubarea la incubatorul cu CO₂ 5% la 35°C timp de 2 min, pentru decolarea celulelor;
- după incubare, tripsina a fost îndepărtată, fiind adăugați în continuare 10 ml de mediu DMEM preparat anterior, efectuându-se pipetări succesive cu scopul de a neutraliza tripsina rămasă după a doua distribuire și de a separa celulele;
- numărarea celulelor în camera Neubauer pentru a determina concentrația celulară;
- în funcție de numărul de celule obținut, a fost adăugat un volum determinat de mediu pentru a ajunge la concentrația celulară finală, în cazul nostru de 8×10^5 celule/ml.

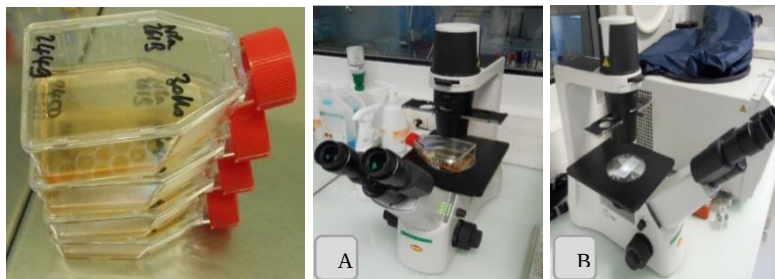


Fig. 6.1 Cutie x 75 cm² cu linia celulară N2a (original). Fig. 6.2 Microscop ranversat Lordill (original); A) Evaluarea confluentei monostratului celular; B) Numărarea celulelor în camera Neubauer
Fig. 6.1 75 cm² flask with the N2a cell line (original). Fig. 6.2 Lordill reversed microscope (original); A) Evaluation of cellular monolayer confluency; B) Cells counting in the Neubauer chamber

Inocularea și incubarea

În fiecare cameră LabTek s-au distribuit câte 400 μ l de suspensie celulară, fiind lăsate la temperatura camerei timp de 5-10 min. pentru sedimentarea celulelor, după care s-au adăugat câte 50 de μ l de suspensie virală. Acestea au fost mai departe incubate la 37°C, în cameră umedă cu 5% CO₂ pentru o perioadă de 48 de ore. După incubare, mediul a fost aspirat cu o pipetă automată, camerele Labtek detașate, iar lamele rămase, uscate sub hotă timp de 10 minute.

Fixarea în acetonă

Odată uscate, lamele au fost introduse în acetonă 80% timp de 30 de minute la - 20°C pentru fixare. După cele 30 de minute, acestea au fost scoase din recipientul cu acetonă și lăsate la uscat la temperatura camerei, sub hotă.

Colorarea lamelor

Prepararea conjugatului: Conjugatul liofilizat a fost reconstituit în 3 ml de apă distilată. Odată omogenizat, acesta a fost transferat într-un tub steril și centrifugat timp de 5 minute la 1500 rpm pentru clarificare, supernatantul fiind cel recoltat și depozitat la 4°C până la utilizare. Conjugatul s-a utilizat concentrat, fără a fi diluat.

Cu ajutorul unei pipete electronice, câte 50 μ l de conjugat au fost repartizați în fiecare căsuță de inoculat, urmată de incubarea acestora la 37°C în cameră umedă cu 5% CO₂, timp de 30 de minute.

Spălarea lamelor și adăugarea mediului de montare

După incubare, lamele au fost spălate cu TFS, respectiv cu apă distilată și lăsate la uscat timp de 15 minute, iar marginile siliconate îndepărtate cu un cuțit. Odată uscate, pentru fiecare lamă s-au adăugat câte o picătură de glicerină și o lamelă.

Citirea rezultatelor la microscopul cu UV

Citirea lamelor a fost realizată cu ajutorul unui microscop cu led (Fig. 6.3) și cu UV (Fig. 6.4), cu mărimea de x200 și x400. Pentru validarea tehnicii, examinarea lamelor de control este primordială.

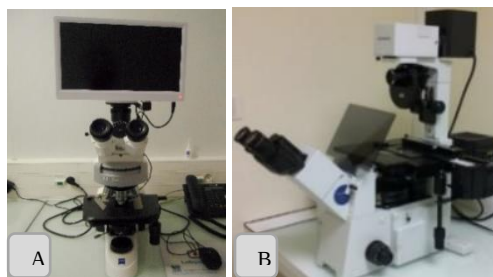


Fig. 6.3 A) Microscop cu LED Lordill AXIO cu ecran încorporat; B) Microscop cu UV Olympus BX41 (original)
 Fig. 6.3 A) Lordill AXIO LED microscope with incorporated screen; B) Olympus BX41 UV microscope (original)

6.1.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din totalul celor 59 de probe luate în studiu, 43 au fost pozitive și 16 negative la izolarea virusului pe culturi celulare, rezultate aflate în concordanță cu cele de la IFD, obținându-se o corelație de 100% între cele 2 metode, nefiind înregistrate rezultate fals pozitive sau fals negative (Fig. 6.4). Pentru validarea tehnicii au fost utilizate 2 controale pozitive și 2 negative, acestea încadrându-se standardelor.

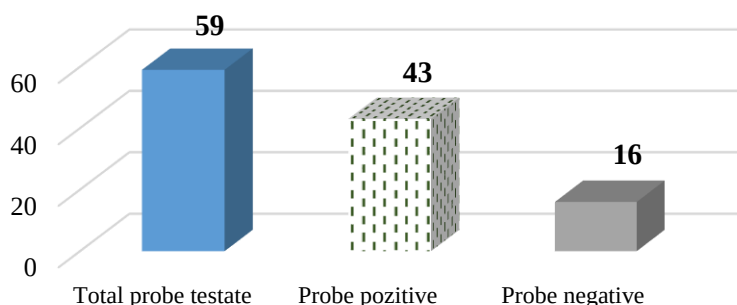


Fig. 6.4 Rezultatele obținute pentru cele 59 de probe testate prin intermediul RTCIT

Fig. 6.4 The results obtained for the 59 samples tested by RTCIT

Metoda de examinare a culturilor celulare pentru prezența virusului rabic a fost realizată prin intermediul colorării lamelor cu fluoresceină. Astfel, în acest sens a fost utilizat conjugatul franțuzesc Bio-Rad.

Tehnica este validată atunci când este detectată fluorescență în cazul celor 2 controale pozitive (Fig. 6.5 A, B) și atunci când nu este detectată nici o urmă de fluorescență în controalele negative (Fig. 6.5 C).

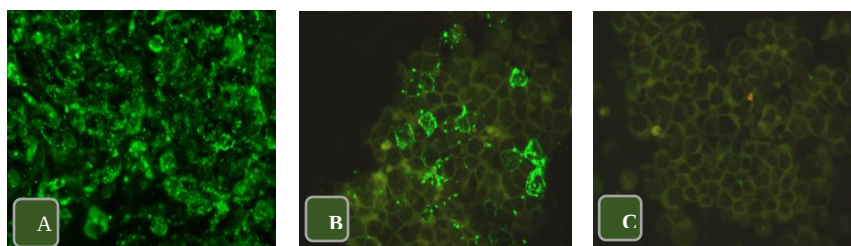


Fig. 6.5 A) Control pozitiv CVS 27; B) Control pozitiv EBLV-1; C) Control negativ (original)
 Fig. 6.5 A) CVS 27 positive control; B) EBLV-1 positive control; C) Negative control (original)

Pentru a pune un diagnostic pozitiv, o singură celulă infectată este considerată a fi suficientă (Fig. 6.6A).

Intensitatea pozitivității unei probe cu respect față de alta este de asemenea reflectată și în concentrația de virus prezentă în fiecare probă, unele dintre ele fiind mult mai intens infectate de către virusul rabic (Fig. 6.6B).

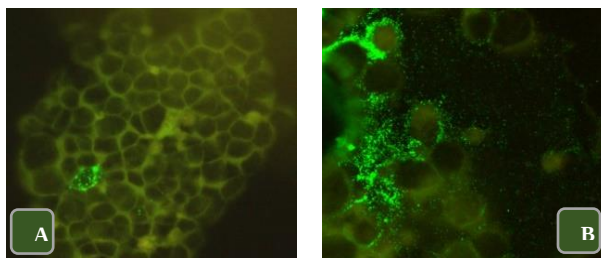


Fig. 6.6 A) Cultură celulară pozitivă: DR1034; B) Cultură celulară pozitivă: Vulpe, 2014 (original)

Fig. 6.6 A) Positive cell culture: DR1034; B) Positive cell culture: Fox, 2014 (original)

Cu toate că, PBŞ a fost considerată multă vreme singura tehnică care poate confirma sau nu diagnosticul de rabie, din cauza perioadei îndelungate de observație a șoriceilor, a costurilor crescute și a necesității înlocuirii animalelor de laborator, a fost implementată o tehnică alternativă, recunoscută de către OMS și OIE, și anume RTCIT.

De asemenea, în cazul victimelor umane consecutive mușcăturilor provenite de la animale suspecte de rabie, decizia în orientarea schemei de vaccinare este dependentă și de rezultatele tehnicilor de diagnostic furnizate de către laboratoarele județene aferente.

Ținând cont de faptul că, rabia are un impact medical major în rândul oamenilor, chiar dacă rezultatele fals negative nu sunt comune în cazul tehnicii de IFD, o metodă alternativă care să fie rapidă, specifică și sensibilă trebuie să fie disponibilă ca și back-up pentru IFD.

Perspectivile pentru îmbunătățiri viitoare ale acestei tehnici includ măsuri care ar reduce timpul necesar pentru un rezultat final de la 48-72 de ore la doar 24 de ore, fără pierderea sensibilității.

6.1.3 CONCLUZII PARȚIALE

Tehnica de izolare a virusului rabic pe culturi celulare poate fi realizată cu succes în caz de rezultate negative sau dubioase obținute la IFD și ar trebui să înlocuiască proba biologică pe șoareci oricând este posibil.

Izolarea virusului rabic pe linia celulară N2a este la fel de sensibilă ca și PBŞ chiar și în cazul probelor cu o concentrație redusă de virus rabic.

Furnizarea de date corecte și rapide este indispensabilă mai ales în cazul în care sunt implicate victime umane și pot fi de un real ajutor pentru personalul medical în orientarea schemei de vaccinare.

6.2 Studiu comparativ privind sensibilitatea a două linii celulare distincte N2a și BHK-21 utilizate pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare

Prima descriere privind utilizarea culturilor celulare pentru studiul virusului rabic a fost realizată în anul 1913 de către Noguchi și Levaditi. De-a lungul timpului, diferite linii celulare atât de origine neuronală (ex: N2a), dar și non-neuronală (ex: CER (chick embryo-related), BSR, BHK-21, HEK-293, McCoy, celule provenite de la bovine, lilieci, rătoni, câini și șconșii), cât și diferite protocoale, au fost experimentate până în zilele noastre (Webster ș.a., 1988; Webster ș.a., 1989; Meslin ș.a., 1999; Webster ș.a., 1996; Madhusudana ș.a., 2010).

Primele încercări în izolarea virusului rabic au fost realizate pe celule renale de pui de hamster BHK-21, însă rezultatele nu au fost încurajatoare, sensibilitatea fiind cu mult inferioară PBŞ (Webster ș.a., 1996; Madhusudana ș.a., 2010).

Celulele neuroblastome murine N2a, derivate din diferite clone, au fost introduse pentru izolarea virusului rabic începând cu anul 1978 (Nogueira, 2004). De-a lungul anilor, numeroase studii realizate pe diferite linii celulare, au demonstrat faptul că, N2a rămâne cea mai sensibilă linie celulară, de referință pentru virusul rabic, fapt recunoscut de către OMS și OIE (Madhusudana ș.a., 2010).

Scopul acestui studiu a fost de a evidenția și confirma linia celulară optimă pentru izolarea și multiplicarea virusului rabic pe culturi celulare, potrivit cercetărilor realizate la nivel mondial până în prezent.

6.2.1 MATERIALE ȘI METODE

Probe luate în studiu

Pentru a compara sensibilitatea izolării virusului rabic pe cele 2 linii celulare N2a și BHK-21, un total de 20 probe de creier provenite de la animale suspecte de rabie din nord-estul României au fost luate în studiu. Acestea au fost izolate în perioada 2012-2015, atât de la animale domestice (1 pisică, 3 câini, 7 bovine), cât și de la animale sălbatice (1 lup, 1 căprior, 7 vulpi), fiind testate inițial prin IFD, confirmându-se astfel diagnosticul pozitiv de rabie (Tabel 6.1).

Tabel 6.1 / Table 6.1

Probele luate în studiu pentru realizarea studiului comparativ
The samples tested for the comparative study

Nr.	Țara	Oraș	Specia	Cod probă	Anul izolării	Sursa
1	Romania	Bârlad	Pisică	DR1017	2014	DSVSA VS
2	Romania	Vrancea	Vulpe	DR1018	2015	DSVSA VN
3	Romania	Vrancea	Vulpe	DR1019	2014	DSVSA VN
4	Romania	Vrancea	Vulpe	DR1020	2013	DSVSA VN
5	Romania	Vrancea	Lup	DR1021	2014	DSVSA VN
6	Romania	Vrancea	Bovină	DR1022	2013	DSVSA VN
7	Romania	Vrancea	Bovină	DR1023	2013	DSVSA VN
8	Romania	Bacău	Vulpe	DR1024	2012	DSVSA BC
9	Romania	Bacău	Vulpe	DR1025	2012	DSVSA BC
10	Romania	Bacău	Câine	DR1026	2012	DSVSA BC

Nr.	Țara	Oraș	Specia	Cod probă	Anul izolării	Sursa
11	Romania	Bacău	Căprior	DR1027	2012	DSVSA BC
12	Romania	Iași	Bovină	DR1028	2013	DSVSA IS
13	Romania	Iași	Bovină	DR1029	2014	DSVSA IS
14	Romania	Iași	Bovină	DR1030	2013	DSVSA IS
15	Romania	Galați	Bovină	DR1031	2015	DSVSA GL
16	Romania	Neamț	Câine	DR1032	2012	DSVSA NT
17	Romania	Neamț	Vulpe	DR1033	2013	DSVSA NT
18	Romania	Neamț	Vulpe	DR1034	2013	DSVSA NT
19	Romania	Neamț	Bovină	DR1035	2012	DSVSA NT
20	Romania	Neamț	Câine	DR1036	2013	DSVSA NT

Materiale necesare

Pentru realizarea acestui studiu comparativ, materialele necesare au fost aceleași cu cele prezentate în subcapitolul 6.1, la care s-au adăugat linia celulară BHK-21 și serul fetal bovin 10%. S-au folosit de asemenea 2 controale pozitive (CVS 27 și EBLV-1) și 2 controale negative (creier provenit de la șoarece sănătos și linie celulară neinoculată) pentru fiecare testare realizată. Pentru ambele linii celulare, metoda a fost efectuată cu ajutorul camerei LabTek, utilizând 2 perioade diferite de incubație, și anume de 48, respectiv 72 de ore.

Etapele metodei

Etapele metodei pentru cele două linii celulare, au fost aceleași cu cele prezentate în subcapitolul 6.1, cu excepția pașilor de pregătire a mediului și a suspensiei celulare, care diferă pentru linia celulară BHK-21.

Pregătirea celulelor BHK-21 pentru cutia de 75 cm² utilizată în laborator pentru menținerea liniei celulare a urmărit aceiași pași ca și în cazul liniei N2a. Diferența a constat în tipul de mediu de cultură utilizat, și anume GMEM și de îmbogățirea acestuia cu SVNN 10% și nu cu SFB 5% cum a fost în cazul liniei N2a.

De asemenea, concentrația celulară necesară pentru linia BHK-21, a fost de 5x10⁵ celule/ml, diferită de cea a liniei N2a.

6.2.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

În ceea ce privește linia celulară N2a, din cele 20 de probe testate, toate (100%) au fost pozitive pentru perioada de incubație de 48 de ore și 19 (95%) pentru cea de 72 de ore, în timp ce pentru linia celulară BHK-21, 19 probe (95%) au fost pozitive pentru perioada de incubație de 48 de ore (cu excepția probei DR1032) și doar 14 probe (70%) pentru cea de 72 de ore (cu excepția probelor DR1020, DR1022, DR1027, DR1029, DR1030 și DR1036) (Tabel 6.2.).

Tabel 6.2 / Table 6.2

Rezultatele obținute pentru cele două linii celulare luate în studiu

The results obtained for the two cell lines used in the study

Linia celulară	Concentrația celulară	Perioada de incubație	Metoda de inoculare	Conjugat	Nr. probe testate	Rezultate probe +
N2a	8x10 ⁵ celule/ml	48h	LabTek	BioRad	20	20
		72h			20	19
BHK-21	5x10 ⁵ celule/ml	48h	LabTek	BioRad	20	19
		72h			20	14

În continuare sunt redate pentru linia celulară N2a controalele utilizate pentru validarea tehnicii, cât și câteva imagini reprezentative pentru cele 2 perioade de incubație.

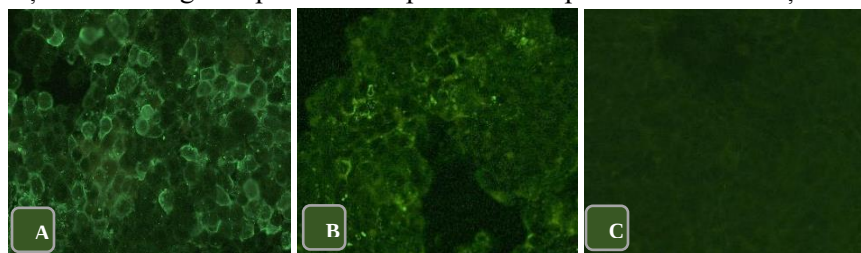


Fig. 6.7 A) Cultură celulară N2a pozitivă, Control CVS 27, 48h; B) Cultură celulară N2a pozitivă, Control EBLV-1, 48h; C) Cultură celulară N2a negativă, Control negativ, 48h (original)

Fig. 6.7 A) N2a positive cell culture, CVS 27 control, 48 h; B) N2a positive cell culture, EBLV-1 control, 48 h; C) N2a negative cell culture, Negative control 48h (original)

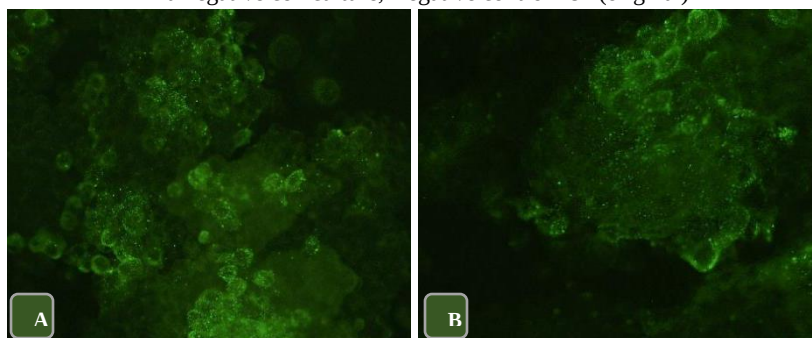


Fig. 6.8 A) Cultură celulară N2a pozitivă: DR1201, 48h; B) Cultură celulară N2a pozitivă: DR1198, 48h (original)

Fig. 6.8 A) N2a positive cell culture: DR1201, 48h; B) N2a positive cell culture: DR1198, 48h (original)

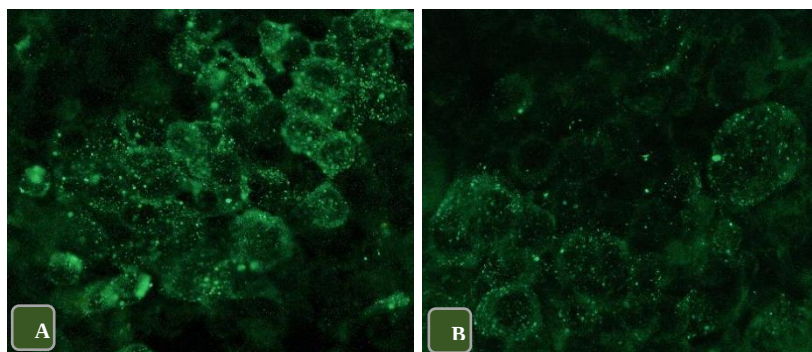


Fig. 6.9 A) Cultură celulară N2a pozitivă: DR1201, 72h; B) Cultură celulară N2a pozitivă: DR1198, 72h (original)

Fig. 6.9 A) N2a positive cell culture: DR1201, 72h; B) N2a positive cell culture: DR1198, 72h (original)

Diferențele de nuanțe între imaginile prezentate sunt date de tipul de microscop utilizat, astfel imaginile pozitive de un verde fluorescent mai deschis (ex.: Fig. 6.8A, B) sunt cele obținute la microscopul cu UV, pe când cele de un verde smarald (ex.: Fig. 6.9A, B), au fost redate cu ajutorul microscopului cu led, cele din urmă fiind mult mai clare și mai calitative.

Referitor la rezultatele obținute pentru linia celulară BHK-21, pentru cele 2 perioade de incubație de 48, respectiv 72 de ore, înainte de citirea și interpretarea rezultatelor pentru cele 20

de probe testate, s-au examinat ca și în cazul liniei N2a, controalele utilizate (Fig. 6.18, 6.19, 6.20), pentru validarea tehnicii, acestea încadrându-se standardelor.

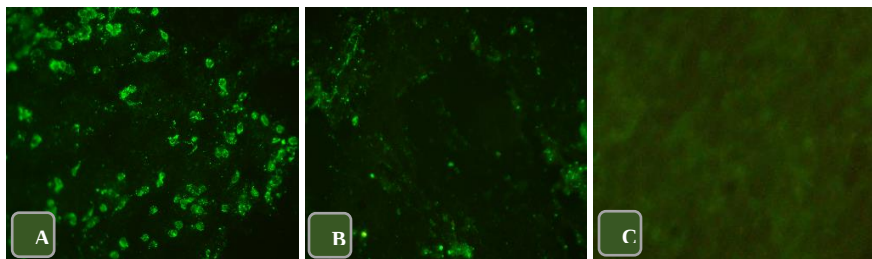


Fig. 6.10 A) Cultură celulară BHK-21, 48h, Control pozitiv CVS 27; B) Cultură celulară BHK-21, 48h, Control pozitiv EBLV-1; C) Cultură celulară BHK-21, 48h, Control negativ (original)

Fig. 6.10 A) BHK-21 cell culture, 48h, CVS 27 positive control; B) BHK-21 cell culture, 48h, EBLV-1 positive control; C) BHK-21 cell culture, 48h, Negative control (original)

Pentru perioada de incubație de 48 de ore, 19 dintre cele 20 de probe testate au fost pozitive, comparativ cu a doua perioadă de incubație de 72 de ore, unde doar 14 probe au fost pozitive.

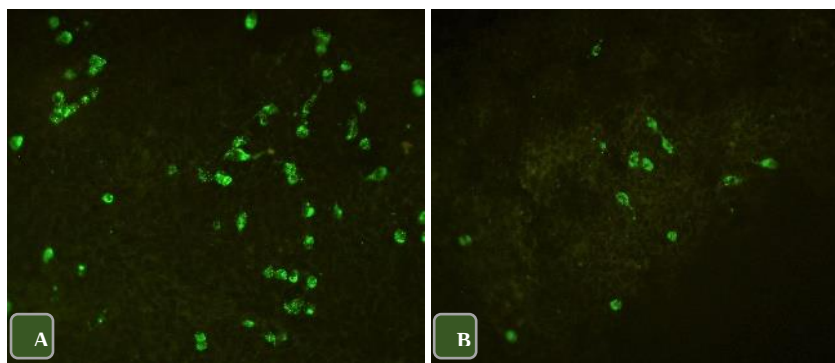


Fig. 6.11 A) Cultură celulară BHK-21, 48h, DR1017; B) Cultură celulară BHK-21, 48h, DR1033 (original)

Fig. 6.11 A) BHK-21 positive cell culture, 48h, DR1017; B) BHK-21 positive cell culture, 48h, DR1033 (original)

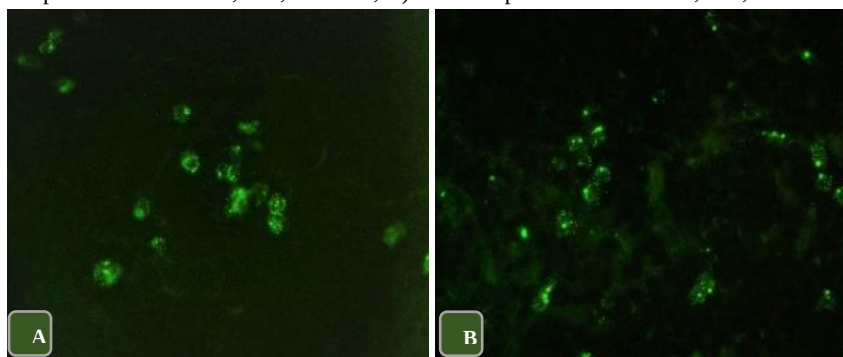


Fig. 6.12 A) Cultură celulară BHK-21, 72h, DR1017; B) Cultură celulară BHK-21, 72h, DR1018 (original)

Fig. 6.12 A) BHK-21 positive cell culture, 72h, DR1017; B) BHK-21 positive cell culture, 72h, DR1018 (original)

Multiplicarea virusului rabic pentru perioada de incubație de 72 de ore a fost mult mai slabă, doar în cazul a 14 probe obținându-se rezultate pozitive.

Evaluând rezultatele obținute pentru cele 2 linii celulare, N2a este mult mai sensibilă pentru multiplicarea virusului rabic decât BHK-21, fiind preferată perioada de incubație de 48 de ore (Dascalu ș.a., 2017(c)).

Este cunoscut faptul că virusul rabic este unul neurotrop, iar după multiplicarea acestuia în SNC, se poate distribui către majoritatea organelor. Acest lucru a făcut posibilă izolarea virusului pe o gamă largă de celule, însă cu rezultate mai mult sau mai puțin satisfăcătoare (King A.A. 1996). Astfel, s-a demonstrat prin numeroase studii faptul că, virusul rabic se multiplică cel mai bine în celule de origine neuronală și în celule care posedă în structura membranei celulare receptori de acetilcolină și neurotransmițători enzimatici sintetici, așa cum sunt celulele N2a (Webster ș.a., 1989(a); OIE, 2013; Chhabra ș.a., 2007; Madhusudana ș.a., 2010; Yang ș.a., 2012).

Această tehnică alternativă a fost utilizată în studiul nostru și în cazul probelor slab pozitive, fapt ce subliniază sensibilitatea acesteia, de multe ori superioară PBS, așa cum a fost demonstrată de către Smith ș.a., 1978, Rudd și Trimarchi, 1980, Umoh ș.a., 1983, Rudd și Trimarchi, 1987.

6.2.3 CONCLUZII PARȚIALE

Cu toate că, ambele linii celulare sunt de referință pentru virusul rabic, linia N2a rămâne cea mai sensibilă, rezultatele fiind superioare celor obținute pentru linia BHK-21.

Studiile noastre sunt în concordanță cu cele raportate și publicate de-a lungul timpului, acestea susținând ideea utilizării liniei celulare N2a în confirmarea diagnosticului de rabie.

6.3. Utilizarea a două sisteme diferite pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare

Conform OIE și OMS, RTCIT poate fi realizată în diferite sisteme, cum ar fi: microplăci de titrare n=96 godeuri (Webster, 1987; Rudd ș.a., 1989), plăci de plastic HLA de 60 sau 96 de godeuri (Tollis ș.a., 1988), pe lamele (Chitra ș.a., 1988) sau în camere LabTek (Rudd ș.a., 1987; Barrat ș.a., 1988; Bourhy ș.a., 1989; Webster ș.a., 1989(b)), cu diferite dezavantaje. Dacă plăcile HLA dau rezultate inconstante în cazul probelor slab concentrate în virus, lamelele ridică unele probleme de manipulare din cauza fragilității acestora, pe când camerele LabTek pot reprezenta o problemă economică serioasă atunci când se dorește testarea unui număr mare de probe (Meslin ș.a., 1999).

Scopul acestui subcapitol a fost acela de a realiza RTCIT utilizând 2 sisteme diferite, și anume: microplăcile de titrare n=96 godeuri de plastic și camerele de sticlă Labtek (n=8 căsuțe) în ideea de a observa și de a stabili dacă virusul rabic se multiplică la fel de bine în ambele sisteme.

6.3.1 MATERIALE ȘI METODE

Zona de studiu. Pentru realizarea acestor cercetări, au fost luate în studiu un număr total de 16 probe din nord-estul României și din Republica Moldova (Dascalu ș.a., 2017), fiind testate anterior în cadrul acestor laboratoare prin tehnica de IFD și PBS (doar atunci când rezultatele IFD au fost negative sau dubioase), confirmându-se diagnosticul de rabie (Fig. 6.13).



Fig. 6.13 Harta României (verde) și a Republicii Moldova (albastru) cu originea geografică a celor 16 probe (original)

Fig. 6.13 Map of Romania (green colour) and Republic of Moldova (blue colour) representing the geographical origin of the 16 samples (original)

Probe testate. Toate cele 16 probe au fost izolate în perioada 2012-2016 de la 6 bovine (*Bos taurus*), 4 câini (*Canis canis*), 1 capră (*Capra aegragus hircus*), 1 căprior (*Capreolus capreolus*) și 4 vulpi (*Vulpes vulpes*) (Tabel 6.3). Înaintea cercetărilor noastre, probele au fost retestate pentru detecția antigenului rabic cu ajutorul IFD-ului.

Tabel 6.3 / Table 6.3

Caracteristicile probelor luate în studiu din România și Republica Moldova
Characteristics of the samples tested from Romania and Republic of Moldova

Nr.	Țara	Specia	Cod probă	Anul izolării	Sursa
1	Romania	Vulpe	DR1025	2012	DSVSA* BC
2	Romania	Câine	DR1026	2012	DSVSA BC
3	Romania	Căprior	DR1027	2012	DSVSA BC
4	Romania	Bovină	DR1028	2013	DSVSA IS
5	Romania	Bovină	DR1029	2014	DSVSA IS
6	Romania	Bovină	DR1030	2013	DSVSA IS
7	Romania	Bovină	DR1031	2015	DSVSA GL
8	Romania	Câine	DR1032	2012	DSVSA NT
9	Romania	Vulpe	DR1033	2013	DSVSA NT
10	Romania	Vulpe	DR1034	2013	DSVSA NT
11	Romania	Bovină	DR1035	2012	DSVSA NT
12	Romania	Câine	DR1036	2013	DSVSA NT
13	Romania	Vulpe	DR1187	2014	DSVSA VS
14	Republica Moldova	Capră	DR1198	2016	CRDV* RM
15	Republica Moldova	Câine	DR1200	2016	CRDV RM
16	Republica Moldova	Bovină	DR1201	2016	CRDV RM

DSVSA*: Direcția Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor; CRDV*: Centrul Regional de Diagnostic Veterinar

Materiale necesare. Pentru realizarea acestor cercetări au fost folosite atât materiale biologice, cât și chimice. Cele biologice au fost reprezentate de cele 16 probe de testat, alături de controalele pozitive (CVS-27 și EBLV-1b) și negative (creier provenit de la un șoarece

sănătos și control celular). Cele chimice au fost aceleași cu cele prezentate în subcapitolul 6.1, la care s-au adăugat microplăcile (Falcon, USA) și acetona de 80% (Thermo Chemical, UK).

Descrierea metodei.

A) RTCIT în camere de sticlă LabTek. Pașii realizării acestei metode, precum pregătirea mediului, a inoculului, a suspensiei virale, inocularea și incubarea, fixarea în acetonă, colorarea lamelor, spălarea acestora, adăugarea substanței de imersie, citirea rezultatelor la microscopul cu UV sunt aceiași cu cei descriși în subcapitolul 6.1.

B) RTCIT în microplăci de plastic. Procedura a fost realizată utilizând două concentrații celulare diferite, și anume: 5×10^5 celule/ml și $2,5 \times 10^5$ celule/ml. Pentru fiecare concentrație în parte, au fost adăugați în fiecare godeu câte 200 μ l de suspensie celulară alături de 50 μ l suspensie virală. Plăcile au fost incubate timp de 72 h într-o cameră umedă cu 5% CO_2 . Ulterior, mediul a fost aruncat, iar plăcile spălate cu TFS steril. A fost realizată o primă spălare cu acetonă 80%, urmată de o a doua, acestea fiind incubate la temperatura camerei timp de 30 min. Odată fixate, plăcile au fost spălate cu TFS steril și uscate la temperatura camerei. În continuare, 50 μ l conjugat au fost adăugați în fiecare godeu, fiind incubate timp de 30 min într-o cameră umedă cu 5% CO_2 . O ultimă spălare cu TFS a fost realizată, pentru a îndepărta restul de conjugat, după care plăcile au fost citite la microscopul cu UV la mărimea de $\times 200$, respectiv $\times 400$.

6.3.2 REZULTATE

A) RTCIT în camere de sticlă LabTek

Această procedură a fost efectuată utilizând o singură concentrație celulară de 8×10^5 celule/ml. Așa cum era de așteptat, atât controlul pozitiv CVS-27, cât și EBLV-1b s-au încadrat standardelor. După o perioadă de incubație de 48 h, din totalul celor 16 probe incluse în studiu, toate (100%) au fost pozitive în urma izolării virusului rabic pe linia celulară N2a în sistemul LabTek.

B) RTCIT în microplăci de plastic

Cea de-a doua procedură a fost realizată utilizând 2 concentrații celulare diferite, și anume 5×10^5 celule/ml și $2,5 \times 10^5$ celule/ml, cu o perioadă de incubație de 72h, fiecare probă fiind inoculată în duplicat, toate controalele încadrându-se standardelor.

Pentru concentrația celulară de 5×10^5 celule/ml, din cele 16 probe testate, 6 (37,5%) au fost negative și 10 (62,5%) pozitive, aceeași situație înregistrându-se și pentru concentrația $2,5 \times 10^5$ celule/ml (Tabel 6.4).

Probele DR1025, DR1027, DR1028, DR1030 și DR1032 au fost negative pentru ambele concentrații celulare. Pentru alte 2 probe, rezultatele au fost diferite. Astfel, DR1029 a fost pozitivă pentru prima concentrație celulară, dar negativă pentru cea de-a doua. În mod opus, proba DR1031 a fost negativă pentru 5×10^5 celule/ml, dar pozitivă pentru $2,5 \times 10^5$ celule/ml.

Pentru a stabili care sunt factorii ce au determinat aceste rezultate inconstante în cazul microplăcilor, alte 4 concentrații celulare au fost incluse în studiu pe un număr de 5 probe (DR1033, DR1187, DR1198, DR1200 și DR1201). În acest sens, au fost alese probe care au fost intens pozitive, dar și slab pozitive la IFD pentru a verifica dacă există vreo corelație între concentrația în virus rabic a unei probe și a sistemului utilizat. Cele 4 concentrații celulare per ml au fost: 2×10^5 , $1,5 \times 10^5$, 1×10^5 și $0,5 \times 10^5$ cu o perioadă de incubație de 72 h, fiecare probă fiind inoculată în duplicat.

Trei dintre probe (DR1198, DR1200 and DR1201) au fost pozitive pentru toate cele 4 concentrații celulare, pe când DR1033 și DR1187 au fost pozitive doar pentru 2×10^5 și $1,5 \times 10^5$ (Fig. 6.14 B, C) și negative la concentrații mai scăzute. Sub concentrația 2×10^5 , izolarea și multiplicarea virusului rabic pe linia N2a este inconstantă, datorită numărului redus de celule, din acest motiv nefiind indicată utilizarea unor concentrații atât de scăzute.

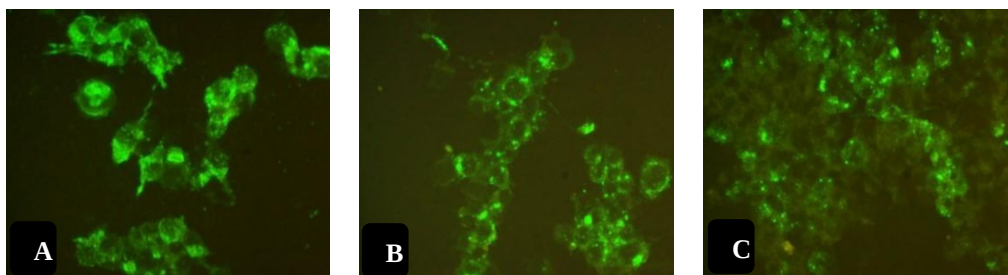


Fig. 6.14 A) Control pozitiv CVS-27, sistem microplacă, concentrația celulară 2×10^5 celule/ml, perioadă de incubare x72 h (x400); B) Cultură celulară pozitivă (DR1033), concentrația celulară 2×10^5 celule/ml, perioadă de incubare x72 h (x400); C) Cultură celulară pozitivă (DR1033), concentrația celulară $1,5 \times 10^5$ celule/ml, perioadă de incubare x72 h (x400) (original)

Fig. 6.14 A) CVS-27 positive control, microplate system, with a cell concentration of 2×10^5 cells/ml, 72 hours period of incubation (x400); B) Positive RTCIT on microplate (DR1033) with a cell concentration of 2×10^5 cells/ml, 72 hours period of incubation (x400); C) Positive RTCIT on microplate (DR1033) with a cell concentration of $1,5 \times 10^5$ cells/ml, 72 hours period of incubation (x400) (original)

Pentru a determina concentrația de virus rabic din probele luate în studiu, a fost realizată titrarea acestora pe linia celulară N2a, folosind concentrația celulară de 2×10^5 , fiecare probă fiind inoculată în microplăci, în 4 replicare și 6 diluții, cu o perioadă de incubare de 72h. Calcularea titrului a fost realizată cu ajutorul formulei Spearman-Kärber. Ca și referință, 2 controale pozitive (CVS-27 și EBLV-1b) au fost utilizate. Cum era de așteptat, cea mai ridicată concentrație de virus a fost obținută pentru controlul pozitiv CVS-27, înregistrând un titru de $10^{5,50}$ TCID₅₀/50μl. Pentru majoritatea probelor (DR1025-DR1027, DR1031, DR1033-DR1036, DR1198, DR1200 and DR1201) a fost obținut un titru ce a variat între 10^2 și $10^{2,75}$ TCID₅₀/50μl.

Pentru probele DR1029 și DR1187, titrul înregistrat a fost scăzut, $10^{1,25}$ TCID₅₀/50μl, respectiv $10^{0,50}$ TCID₅₀/50μl. Pentru probele DR1028, DR1030 și DR1032, titrarea nu a mai fost realizată, datorită cantității insuficiente de probe.

Rezultatele obținute demonstrează o concentrație scăzută de virus rabic în probe, comparativ cu tulpina fixă de laborator CVS-27. De subliniat faptul că, titrarea a fost realizată după mai multe congelări și decongelări repetate ale probelor în cauză.

Rezultatele obținute în cadrul RTCIT în sistemele LabTek și microplăci
 RTCIT results obtained for LabTek and microplate systems

Nr.	Cod probe	Rezultate LabTek	Rezultate microplăci (concentrație celulară)					
		8x10 ⁵ celule/ml	5x10 ⁵ celule/ml	2,5x10 ⁵ celule/ml	2x10 ⁵ celule/ml	1,5x10 ⁵ celule/ml	1x10 ⁵ celule/ml	0,5x10 ⁵ celule/ml
1	DR1025	Poz	Neg	Neg	NT	NT	NT	NT
2	DR1026	Poz	Poz	Poz	NT	NT	NT	NT
3	DR1027	Poz	Neg	Neg	NT	NT	NT	NT
4	DR1028	Poz	Neg	Neg	NT	NT	NT	NT
5	DR1029	Poz	Poz	Neg	NT	NT	NT	NT
6	DR1030	Poz	Neg	Neg	NT	NT	NT	NT
7	DR1031	Poz	Neg	Poz	NT	NT	NT	NT
8	DR1032	Poz	Neg	Neg	NT	NT	NT	NT
9	DR1033	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg
10	DR1034	Poz	Poz	Poz	NT	NT	NT	NT
11	DR1035	Poz	Poz	Poz	NT	NT	NT	NT
12	DR1036	Poz	Poz	Poz	NT	NT	NT	NT
13	DR1187	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg
14	DR1198	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz
15	DR1200	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz
16	DR1201	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz

*Poz: pozitiv; Neg: negativ; NT: netestat

6.3.3 DISCUȚII

Rezultatele discordante dintre cele obținute în microplăci de plastic și camerele LabTek de sticlă, se pot datora în principal calității acestor probe, ținând cont de faptul că unele dintre ele au fost păstrate o perioadă îndelungată la -20°C încă din anul 2012, congelările și decongelările repetate, dar și anul izolării acestor probe ar fi putut influența aceste rezultate (Dascalu ș.a., 2017(b)).

Obținerea de rezultate nesatisfăcătoare se poate datora și calității probelor, lizei și aglutinării celulelor utilizate, așa cum a fost arătat de către Rudd ș.a. 1989.

În ceea ce privește fixativul de elecție în microscopia imunofluorescentă pentru detecția virusului rabic, acesta este reprezentat de acetona absolută, care este foarte bine adaptată pentru sistemele de sticlă (ex. camere de sticlă LabTek), dar nu în aceeași măsură și pentru microplăcile de plastic. În aceste sens, se recomandă utilizarea de acetona diluată de 80% pentru o fixare optimă a celulelor de suportul de plastic, așa cum a fost demonstrat de către Webster, 1987 și Rudd ș.a., 1989, dar și pentru a evita degradarea suportului de plastic.

Referitor la perioada optimă de incubație, diferite variante au fost sugerate, de la 18 h (Bourhy ș.a., 1989) la 24 h (Chitra ș.a., 1988; Portnoi ș.a., 1982), în timp ce alți cercetători recomandă o perioadă între 3-5 zile pentru obținerea de rezultate valide (Webster, 1987; Rudd ș.a., 1989).

De asemenea, replicarea virusului rabic în celule poate fi influențată și de concentrația virusului din probele de testat. Astfel, pentru probele cu o concentrație ridicată de virus rabic, infecția în celulele N2a poate fi evidențiată în mai puțin de 24 h, pe când în cazul probelor cu o concentrație scăzută de virus, este nevoie între 3-4 zile pentru multiplicarea virusului în celule (Umoh ș.a., 1983; Webster, 1987).

De precizat faptul că, înainte de a testa aceste probe în cadrul cercetărilor noastre, probele au fost păstrate la -20°C pentru o perioadă îndeungată de timp. Acest factor, alături de congelările și decongelările repetate au dus la o pierdere a infectivității, din acest motiv conservarea probelor în timp este recomandată a se efectua la temperaturi foarte scăzute de -80°C , așa cum a fost demonstrat și de Wachendorfer ș.a. în 1985.

Ca și un dezavantaj pentru camerele de sticlă LabTek, ar putea fi menționată posibilitatea contaminării în momentul îndepărtării pereților și sigiliilor, din acest motiv, aceste manopere trebuie efectuate cu foarte multă atenție. Această problemă în schimb, nu este raportată în cazul microplăcilor, întrucât godeurile nu comunică între ele. Nu trebuie neglijată și partea economică, ținând cont de faptul că microplăcile sunt mult mai ieftine comparativ cu camerele Labtek.

6.3.4 CONCLUZII PARȚIALE

Cele mai bune rezultate au fost obținute în cadrul sistemului LabTek, concentrația celulară de 8×10^5 celule/ml fiind considerată a fi optimă pentru o bună izolare și multiplicare a virusului rabic.

În ceea ce privește microplăcile de plastic, rezultatele au fost inconstante, obținând rezultate satisfăcătoare pentru concentrațiile celulare per ml de 5×10^5 și $2,5 \times 10^5$, dar nu și pentru cele sub 2×10^5 celule/ml, întrucât numărul redus de celule nu a permis izolarea, respectiv multiplicarea virusului, nefiind recomandată utilizarea acestora.

Rezultatele obținute pentru microplăci este posibil să fi fost influențate de către congelările și decongelările repetate, alături de condițiile de depozitare ale acestora, ceea ce a dus la o pierdere a infectivității.

Schimbarea mediului de creștere după 24 h de incubatie, schimbarea tulpinii de neuroblastome pentru o mai bună fixare pe suportul plastic, dar și utilizarea unui contracolorant pentru a reduce nuanța de fond din cauza suportului de plastic, sunt câteva dintre aspectele care ar putea fi implementate pentru a obținute rezultate mai bune pentru aceste sistem.

CAPITOLUL VII
CONFIRMAREA DIAGNOSTICULUI DE RABIE PRIN TEHNICILE
DE BIOLOGIE MOLECULARĂ REAL TIME PCR ȘI RT-PCR
CONVENȚIONAL
CHAPTER VII
RABIES DIAGNOSTIC CONFIRMATION BY REAL TIME PCR AND
CONVENTIONAL RT-PCR TECHNIQUES

Până în prezent, a fost dezvoltată o adevărată tehnologie PCR care poate fi aplicată pentru o gamă foarte largă de domenii, cum ar fi biologia moleculară, științele medicale, microbiologia, criminalistica, iar lista poate continua (Erllich, 1989; Vassu Tatiana ș.a., 2011).

Meritele i se cuvin biochimistului american Kary Mullis, inițiatorul și dezvoltatorul tehnicii PCR, în anul 1983, merite ce aveau să fie recompensate cu un premiu Nobel pentru chimie, 10 ani mai târziu.

Pe teritoriul Europei, majoritatea laboratoarelor naționale de referință în rabie utilizează aceste tehnici PCR de ultimă oră, și asta datorită numeroaselor avantaje, printre care se numără specificitatea și sensibilitatea foarte ridicate și posibilitatea utilizării de probe aflate în stare avansată de putrefacție, lucru nerecomandat în cazul metodei de referință în diagnosticul rabiei, și anume imunofluorescența directă (David ș.a., 2002; Beltran ș.a., 2014; Picard-Meyer ș.a., 2015).

Deși PCR-ul convențional este foarte sensibil, în timp s-a dovedit faptul că tehnica Real-time PCR este de până la 100-1000 de ori mai sensibilă (Nadin-Davis ș.a., 2009).

Metoda Real time PCR sau PCR cantitativ (qPCR) a fost creată în anul 1992 de către Higuchi ș.a. și reprezintă cea mai performantă strategie de cuantificare a acizilor nucleici, fiind una dintre cele mai puternice și sensibile tehnici disponibile la ora actuală (Kubista ș.a., 2006). Este o tehnică ce combină amplificarea și detecția într-un singur pas, eliminând astfel necesitatea utilizării electroforezei în gel și mai important, permite ca metoda să fie cu adevărat cantitativă, prin stabilirea unei corelații directe între cantitatea produsului de amplificare acumulat și numărul inițial de copii ale moleculei țintă (Kubista ș.a., 2006).

În ciuda numeroaselor avantaje, Organizația Mondială a Sănătății și Oficiul Internațional de Epizootii nu le recomandă ca și diagnostic postmortem de rutină în rabie la animale. Acest lucru se datorează în principal posibilității apariției contaminărilor încrucișate în timpul realizării reacțiilor, acest lucru ducând la eventuale rezultate fals pozitive sau fals negative (Nadin-Davis ș.a., 2009; OIE, 2013).

Cele mai utilizate tehnici la nivel mondial de Real time PCR pentru detecția lyssavirusurilor sunt reprezentate de către SYBR Green Real-time RT-PCR și TaqMan Real-time RT-PCR (Picard-Meyer ș.a., 2015).

Scopul acestor cercetări a fost de a utiliza aceste tehnici de biologie moleculară ca și instrument adițional pentru detecția lyssavirusurilor atât pentru probele din nord-estul României, cât și pentru cele din Republica Moldova.

7.1 MATERIALE ȘI METODE

Probe utilizate în studiu

Un total de 59 de probe de creier au fost luate în studiu, 38 din nord-estul României și 21 din Republica Moldova (Fig. 7.1). Toate detaliile privind originea geografică a probelor, anul, sursa și speciile de la care au fost izolate, sunt descrise în amănunt în Capitolul V.



Fig. 7.1 Harta României (portocaliu) și a Republicii Moldova (roz) cu originea geografică a celor 59 de probe (original)

Fig. 7.1 Map of Romanian (orange) and Republic of Moldavia (pink) with the geographical origin of the 59 samples (original)

Materiale și echipamente necesare:

- QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix (Qiagen)
- QuantiTect RT Mix (Qiagen)
- QuantiTect Probe Master Mix (Qiagen)
- One step RT-PCR (Qiagen)
- One step RT PCR Enzyme mix (Qiagen)
- Iprep™ Pure Link™ Virus Kit (Invitrogen)
- Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen)
- Qubit DNA HS kit (Invitrogen)
- Taq Platinum ADN polimeraza (Invitrogen)
- SYBR Safe DNA Gel 10.000x (Invitrogen)
- UltraPure™ 10 x TAE Buffer (Invitrogen)
- Blue Orange Loading Dye (Thermo Scientific)
- 1 kb DNA Ladder (Promega, Spania)
- RNase Out (Invitrogen)

- RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific)
- dNTP (Qiagen)
- PCR Buffer fără MgCl₂ 10x (Qiagen)
- MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific)
- TFS (Sigma Life Science, UK)
- Agaroză (Promega, Spania)
- Hotă laminară, clasa a-2 a (Holten LaminAir, Danemarca)
- Centrifugă (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X1R)
- Vortex (Velp Scientifica ZX4 Vortex Mixer)
- Aparatul iPrepTM (Invitrogen) pentru extracție ARN
- Aparatul Rotor-Gene Q Real Time Cyclor (Qiagen)
- Termociclorul Eppendorf AG (Germania)
- Aparatul BioRad Laboratories (Franța)
- Aparatul Qubit (Invitrogen, Franța)
- Aparat de electroforeză APELEX (PS 304, minipac II)
- Tuburi Rotor-Gene Q x 0,1 ml
- Tuburi sterile x 1,5 ml, 2ml
- Pipete și conuri (0,5-1000 µl).

Înainte de caracterizarea moleculară, aceste probe au fost retestate în cadrul Laboratorului European de Referință în Rabie din Nancy, Franța, pe parcursul anilor 2015-2017 pentru prezența antigenului rabic și al virusului rabic, prin intermediul tehnicilor de diagnostic de rutină, și anume IFD și RTCIT, așa cum sunt descrise în '*Laboratory Techniques in Rabies*' (Meslin ș.a., 1999).

Pregătirea extracțiilor ARN, a reactivilor pentru PCR, dar și efectuarea propriu-zisă a reacțiilor au fost realizate în camere separate pentru a evita contaminările încrucișate. De asemenea, pentru a compensa erorile de pipetare, calcularea numărului total de reacții necesare în cadrul tehnicilor de PCR a fost efectuat cu un volum cu 10% mai mare.

7.1.1 Extracția ARN

Pregătirea probelor pentru extracțiile ARN-ului viral a fost realizată în cadrul laboratorului de nivel 3, iar extracția propriu-zisă la aparatul Iprep (Invitrogen), în sala special destinată acestei tehnici, situată în afara zonei 3.

Pentru realizarea extracțiilor de ARN, s-a recurs la prepararea unei suspensii de țesut cerebral de 5%, și anume 1 gram de probă și 4 ml tampon fosfat salin (TFS). Toate probele au fost omogenizate în TFS și centrifugate timp de 15 minute la 3000 rpm/min. Supernatantul rezultat a fost colectat (200 µl /probă) și resuspendat în 200 µl de *Viral Lysis Buffer* (Invitrogen), obținând o cantitate finală de 400 µl. Extracția a fost realizată în continuare cu ajutorul kit-ului *IprepTM Pure LinkTM Virus Kit* la aparatul de extracție Iprep, în conformitate cu recomandările producătorului. Cantitatea finală per probă de ARN viral a fost de 50 µl. Toate extracțiile ARN au fost păstrate la -80°C până la utilizare.

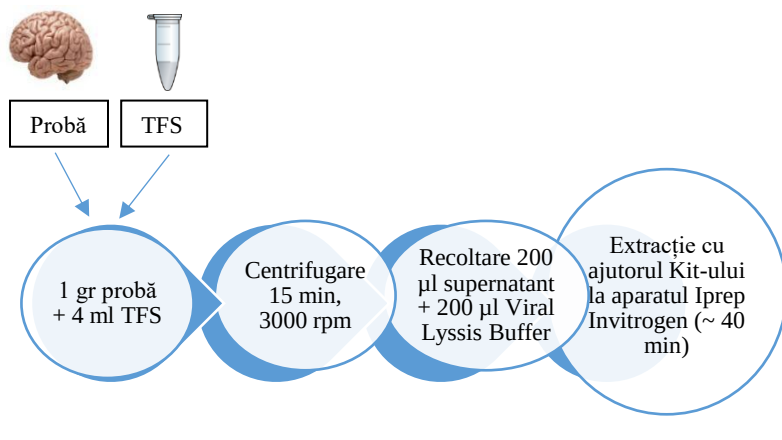


Fig. 7.2 Etapele realizării extracțiilor ARN

Fig. 7.2 RNA extraction steps



Fig. 7.3 Aparatul de extracție Iprep Invitrogen (original)

Fig. 7.3 Iprep machine Invitrogen (original)

7.1.2 SYBRGreen Real time qRT-PCR

Odată realizate extracțiile ARN, următorul pas a constat în cuantificarea acizilor nucleici prin intermediul tehnicii Real time SYBRGreen qRT-PCR. Aceasta este considerată a fi una dintre cele mai sensibile și eficiente tehnici din zilele noastre pentru detecția ARN-ului. Puterea ei reiese din abilitatea de a detecta la fiecare ciclu, cantitatea de produs PCR, cu ajutorul semnalului fluorescent (Ponchel ș.a., 2003).

Pentru realizarea acestei tehnici sunt indispensabile următoarele elemente:

- ARN-ul țintă (depozitat la -80°C până la utilizare)
- H₂O
- QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix, ce conține:
 - HotStarTaq DNA Polymerase, o formă modificată a polimerazei recombinante ADN cu greutatea moleculară de 94 kDA, izolată de la bacteria *Thermus aquaticus* și clonată pe tulpini de *E.coli* (Qiagen, 2011).
 - QuantiTect SYBR Green RT-PCR Buffer: Prezența unei soluții tampon este indispensabilă în mediul de amplificare și cu toate că, nu participă direct la desfășurarea reacției de polimerizare, are rolul de a asigura un mediu optim din punct de vedere chimic, pentru activitatea și stabilitatea ADN polimerazei (Vassu Tatiana ș.a., 2011).
 - dNTP mix: De regulă, este utilizat un amestec de 4 nucleotide (dATP, dCTP, dGTP și dTTP/dUTP), concentrația acestora depinzând de lungimea fragmentului ce trebuie amplificat, dar și de numărul de cicluri de amplificare (Qiagen, 2011).
 - SYBR Green I: Este o substanță fluorescentă care se intercalează între bazele azotate ale ADNc și astfel intensitatea fluorescenței crește direct proporțional

cu acumularea ampliconilor în timpul reacției PCR. Comparativ cu bromura de etidiu, aceasta se caracterizează printr-o toxicitate mult mai redusă și o specificitate mult mai mare și poate fi folosită pentru a monitoriza amplificarea oricărei secvențe de ADN dublu catenar (Qiagen, 2011).

- ROX passive reference dye: Este introdus în reacție cu scopul de a normaliza semnalul fluorescent, pentru a compensa variațiile de volum, pentru a regla schimbările de concentrație dar și pentru a optimiza precizia detecției (Qiagen, 2011).
- 5 Mm MgCl₂: Ioni de magneziu stimulează activitatea polimerazei. Cresc temperatura de denaturare a complexului primer-secvență țintă, conferindu-i stabilitate. Formează un complex solubil cu nucleotidele, fiind esențial pentru încorporarea acestora în catena de ADN (Qiagen, 2011).
- Primerii JW12 și N165-146: Pentru a evita dimerizarea primerilor, este necesar ca aceștia să nu fie complementari unul cu celălalt; secvența acestora influențează poziția și lungimea produsului de amplificare, temperatura de alipire și cantitatea de produs obținut (Innis ș.a., 1990; Pevsner, 2009).
- QuantiTect RT Mix: Acest mix este de fapt un amestec de enzime Omniscript și Sensiscript. Acestea prezintă o afinitate ridicată pentru ARN, facilitând transcripția. Omniscript este conceput pentru revers transcripția unor cantități de ARN mai mari de 50 ng, iar Sensiscript a celor mai mici de 50 ng. Această combinație de enzime, asigură o revers transcripție extrem de eficientă și sensibilă pe o gamă largă de cantități de ARN (Qiagen, 2011).

Astfel, a fost realizată tehnica *One-step SYBRGreen qRT-PCR*, utilizând kit-urile *QuantiTect SYBRGreen Master Mix* și *QuantiTect RT Mix*, în conformitate cu recomandările producătorului, cu ajutorul aparatului Rotor-Gene Q, care permit ca atât revers transcripția, cât și real time PCR-ul să aibă loc în același tub. În cadrul acestei proceduri pot fi procesate rapid mai multe probe, numărul redus de manipulări conducând la o înaltă reproductibilitate de la o probă la alta și foarte important la minimizarea riscului de contaminare.

Pașii realizării acestei tehnici au presupus următoarele:

- decongelarea ambelor kit-uri, al extracțiilor ARN de testat și al primerilor (în timpul preparării mix-urilor, reactivii se mențin în gheață);
- pregătirea primerilor JW12 (ATG TAA CAC CYC TAC AAT G) și N165-146 (GCA GGG TAY TTR TAC TCA TA) la o concentrație finală de 0,6 μM;
- realizarea mix-ului constituit per probă din: 7,25 μl de H₂O, 12,5 μl de *QuantiTect SG Master Mix*, 0,25 μl de *QuantiTect RT Mix*, 1,5 μl din fiecare primer, iar la final 2 μl din proba de testat (ARN viral);
- pregătirea a 2 controale pozitive ARN (DUVV și o diluție seriată 10⁶ la 10⁰ copii ARN/μL a unui ARN sintetic) și 2 controale negative (extracție ARN și control PCR) necesare pentru validarea tehnicii. Astfel, în 7 tuburi eppendorf, au fost introduși câte 45 μl H₂O. Primul tub de la care s-a pornit diluția, a cuprins și 5 μl de GT1 10⁻⁷. Din acest tub au fost recoltați 5 μl de mix realizându-se diluțiile seriate

(Fig. 7.4). Este foarte important ca între etape să se realizeze o ușoară centrifugare pentru omogenizarea mix-ului.

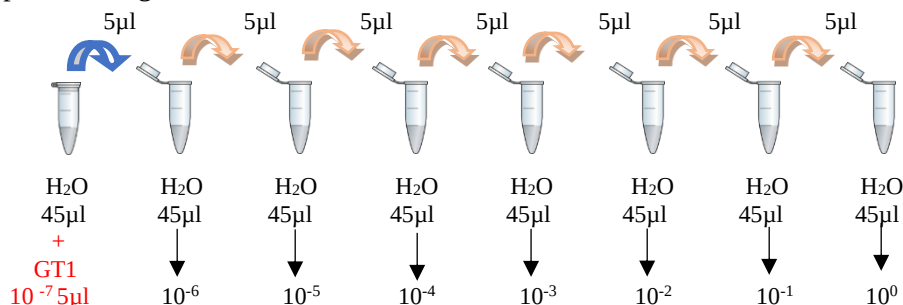


Fig. 7.4 Etapele realizării diluţiilor seriate pentru GT1 (original)

Fig. 7.4 The steps of serial dilutions for GT1 (original)

- după efectuarea diluţiilor seriate, volumul final de 25 µl a fost repartizat în tuburile speciale Rotor-Gene Q de 0,1 ml (23 µl din mix-ul realizat mai sus şi 2 µl de probă ARN), acestea fiind mai departe numerotate şi introduse în suportul aparatului Rotor Gene Q.

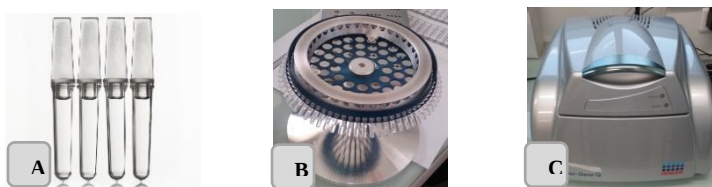


Fig. 7.5 A) Tuburi Rotor-Gene (www.4ti.co.uk); B) Amplasarea tuburilor în suportul aparatului (original); C) Aparatul Rotor-Gene Qiagen (original)

Fig. 7.5 A) Rotor-Gene tubes (www.4ti.co.uk); B) Placing the tubes in the holder (original); C) Rotor-Gene machine (original)

Pentru fiecare sesiune de PCR, o diluţie seriată a ARN-ului sintetic a fost realizată cu scopul de a determina curba standard, eficacitatea PCR-ului şi coeficientul de determinare.

În cadrul aparatului, a fost utilizat următorul program de funcţionare: 50°C timp de 30 min (moment în care are loc revers transcripţia), 95°C timp de 15 min (activarea ADN polimerazei), urmate de 45 cicluri la 94°C timp de 30 sec (denaturarea), 55°C timp de 30 sec (alipirea) şi 72°C timp de 30 sec (extensia). Durata totală a programului a fost de 2 h şi 48 de min.

7.1.3 TaqMan Real time RT-PCR

Odată cuantificaţi acizii nucleici, s-a recurs la testarea şi încadrarea probelor luate în studiu într-unul din cele 3 genotipuri (1, 5 şi 6) disponibile a fi testate prin intermediul tehnicii TaqMan Real time RT-PCR.

Până în prezent, au fost descrise 7 genotipuri şi 14 specii de virus rabic şi una în curs de omologare. Cele 7 genotipuri sunt reprezentate de către: genotipul 1 virusul rabic clasic (RABV, distribuţie globală), genotipul 2: Lagos bat virus (Africa), genotipul 3: Mokola virus (Africa), genotipul 4: Duvenhage virus (Africa), genotipurile 5 şi 6: European bat lyssavirus

(EBLV) tipul 1 și 2 (Europa) și nu în ultimul rând genotipul 7: Australian bat lyssavirus (ABLV) (Australia) (ICTV, 2016).

Tehnica TaqMan Real time RT-PCR a fost descrisă pentru prima oară în anul 2005 de către Wakeley și colab. Încorporarea tehnologiei TaqMan în tehnica Real time a revoluționat diagnosticul, fiind o metodă rapidă, specifică și sensibilă. Aceasta permite pe lângă detecția lyssavirusurilor și încadrarea acestora în unul din cele 3 genotipuri: 1 (RABV), 5 (EBLV-1) și 6 (EBLV-2) (Wakeley ș.a., 2005).

Având ca obiectiv amplificarea specifică a RABV, EBLV-1 și EBLV-2, tehnica a fost realizată utilizând un ciclor în timp real Rotor-Gene Q. Sondele fluorescente LysGt1, LysGt5 și LysGt6, permit o amplificare specifică a nucleoproteinei rabice a RABV, EBLV-1 și EBLV-2, respectiv.

Sonda LysGT1 pentru detecția virusului rabic clasic a fost concepută utilizând 557 secvențe nucleotidice ale genei N parțiale. Sondele LysGT5 și LysGT6 au fost realizate pornind de la 2-3 nucleotide inferioare primerului JW12 a genei N, utilizând secvențe derivate de la 35 de izolate ale genotipului 5 și 9 izolate ale genotipului 6 (Wakeley ș.a., 2005). Aceste sonde și primeri descriși de către Wakeley și colab. în anul 2005 au fost ulterior validați și în cadrul Laboratorului European de Referință în Rabie din Nancy, Franța.

Tabelul 7.1 / Table 7.1

Caracteristicile primerilor și sondelor utilizate în tehnica TaqMan Real time RT-PCR
Characteristics of the primers and probes used in the Real time TaqMan assay

Sondele Taqman	Secvențele nucleotidice (5' 3')	Localizarea genomului virusului rabic
JW12	ATG TAA CAC CYC TAC AAT G	55-73
N165-146	GCA GGG TAY TTR TAC TCA TA	165-146
LysGT1FAM/BHQ1	ACAAGATTGTATTCAAAGTCAATAATCAG	81-109
LysGT5 Hex/BHQ1	AACARGGTTGKTYYAAGGTCCATAA	80-105
LysGT6 Cy5/BHQ3	ACARAATTGTCTTCAARGTCCATAAYCAG	81-109

Pentru realizarea acestei tehnici au fost incluși în reacție următorii reactivi: H₂O, MgCl₂, primeri (N165-146 Fw și JW12 Rv), *QuantiTect Probe Master Mix* și *QuantiTect RT Mix* (enzimele Omniscript și Sensiscript), sondele Lys-GT1, Lys-GT5 și Lys-GT6 pentru amplificarea specifică a RABV, EBLV-1 și EBLV-2, și nu în ultimul rând, probele de testat.

Doi μl de proba ARN au fost introduși în 23 μl *QuantiTect Probe Master Mix*, 800 nmol din fiecare primer în parte (N165-146 Fw și JW12 Rv) și 0,1 μM de primer specific sondei (LysGT1, LysGT5 și LysGT6) (Tabelul 7.1).

Un prag de referință de 0,05 pentru TaqMan a fost setat manual. Pentru fiecare testare au fost folosite atât controale pozitive cât și negative pentru validarea reacțiilor.

7.1.4 Heminested RT-PCR conventional

Cu toate că, RT-PCR este o tehnică sensibilă, sensibilitatea acesteia poate fi sporită prin efectuarea unui "heminested" RT-PCR, prin realizarea a două etape succesive de PCR, utilizând două seturi diferite de primeri. Aceasta presupune utilizarea produsului obținut în cadrul primei etape, ca și matriță pentru PCR-ul secundar. Întrucât, secvențele primerilor utilizate în etapa a doua sunt diferite de cele din prima etapă, acestea nu vor mai amplifica produșii PCR nespecfici generați în PCR-ul primar, crescând astfel specificitatea reacției (O'Connell, 2002).

Această tehnică a fost realizată cu scopul de a amplifica gena parțială și completă N a virusului rabic, al tuturor probelor luate în studiu, tehnică necesară în realizarea ulterioară a secvențierii produșilor PCR amplificați.

Pentru toate extracțiile de ARN efectuate, a fost realizată revers transcripția (RT) reacția de polimerizare în lanț (PCR), utilizând primeri specifici virusului rabic. Un produs final de amplificare de 606-pb a fost obținut pentru gena parțială N și 1353-pb pentru gena completă N. În schema de mai jos (Fig. 7.6) sunt prezentați primerii pentru amplificarea parțială și completă a nucleoproteinei virusului rabic.

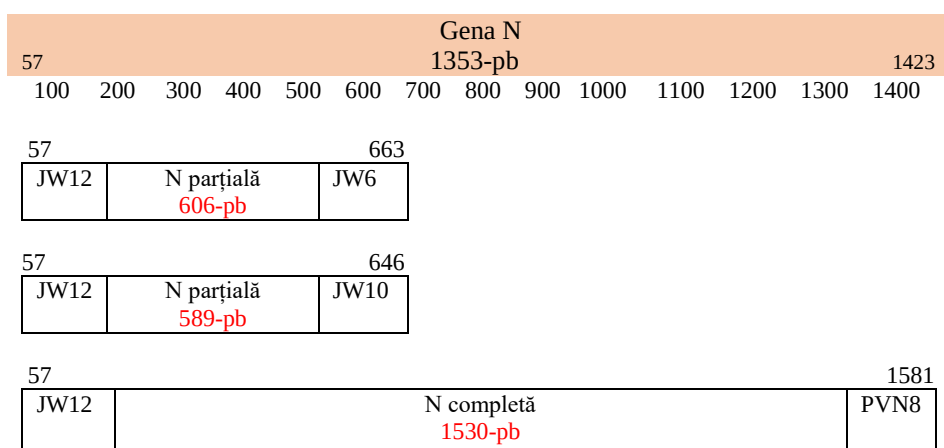


Fig. 7.6 Gena N a virusului rabic: primerii utilizați pentru amplificarea parțială și completă (original)

Fig. 7.6 N gene: the primers used for both partial and complete amplification of rabies virus (original)

7.1.4.1 Amplificarea genei parțiale N a virusului rabic

Heminested RT-PCR a fost realizat utilizând perechile de primeri JW12 / JW6 și JW12 / JW10 (Tabel 7.3). Prima pereche JW12 / JW6 descrisă de către Heaton ș.a. în anul 1997, permite amplificarea specifică a nucleoproteinei virusului rabic pentru toate cele 15 specii de virus rabic (ICTV, 2016), fiind ulterior validată în cadrul Laboratorului din Nancy, Franța (Picard-Meyer ș.a., 2004).

Astfel, pentru amplificarea genei parțiale N, au fost realizate 2 etape de RT-PCR convențional, obținând un produs de 606-pb pentru prima etapă, respectiv de 589-pb pentru cel de-al doilea PCR.

Pentru prima etapă, One step, s-a realizat următorul mix de 10 μl per probă: 4,3 μl H₂O, 3 μl Qiagen One step RT-PCT, 0,6 μl dNTP, 0,6 μl Qiagen One step RT PCR Enzyme mix, 0,5 μl RNase inhibitor, 0,5 μl din fiecare primer JW12 și JW6, la care s-au adăugat la final 5 μl de ARN viral per probă.

În continuare, tuburile au fost introduse în termociclorul Eppendorf AG (Fig. 7.7) la următorul program: 50°C timp de 30 min, 95°C timp de 15 min, 35 de cicluri la 94°C timp de 30 sec, 55°C timp de 30 sec și 72°C timp de 1 min și un ultim ciclu la 72°C timp de 10 min. Durata totală a programului a fost de aproximativ 2 ore și 25 de minute.

Cea de-a doua etapă în cadrul acestei reacții a fost realizată pentru a crește pragul de detecție al PCR-ului. Acest sistem de PCR, descris pentru prima dată de către Wakeley și colab.

în anul 2005, folosește un cocktail de primeri și un program în cadrul termociclorului, care poate detecta 6 genotipuri de virus rabic (Wakeley ș.a., 2005).

Astfel, mix-ul a fost constituit per probă (47 μ l) din: 36 μ l H₂O, 5 μ l PCR Buffer fără MgCl₂ 10x, 1,5 μ l MgCl₂, 2,5 μ l dNTP, 0,625 μ l din fiecare primer în parte M13-JW12 și M13-JW6, 0,625 Taq Platinum ADN polimeraza, iar la final câte 3 μ l din produsul PCR obținut în prima etapă. Tuburile au fost introduse în termociclorul Eppendorf AG la următorul program: 94°C timp de 5 min, 30 de cicluri la 94°C timp de 30 sec, 61 °C timp de 30 sec, 72°C timp de 30°C și un ultim ciclu la 72°C timp de 10 min. Durata totală a programului a fost de aproximativ 1 oră și 18 minute.



Fig. 7.7 Termociclorul Eppendorf AG, Germania (original)

Fig. 7.7 Eppendorf AG termocycle, Germany (original)

După terminarea celui de-al doilea PCR, a fost realizată electroforeza în gel de agaroză 2%, urmând ca probele să fie dozate pentru concentrația în acizi nucleici, cu scopul de a fi trimise mai departe pentru secvențierea nucleoproteinei parțiale a virusului rabic. Condiția ca o probă să poată fi trimisă la secvențiere este ca aceasta să conțină o cantitate minimă de 15 ng/ μ l acid nucleic.

Tabelul 7.2 / Table 7.2

Primerii utilizați pentru amplificarea genei parțiale N și pentru secvențierea produșilor PCR
The primers used for the amplification of partial N gene and for the sequencong of PCR products

Gena amplificată	Primeri	Secvența (5' 3')	Regiunea amplificată	Fragment PCR (pb)	Sens
N Parțială	JW12	ATG TAA CAC CYC TAC AAT G	55-73	PCR 606-pb	Forward
	JW6	CAR TTC GCA CAC ATT TTR TG	660-641	PCR 606-pb	Reverse
	JW10-1	GTC ATC AAA GTG TGR TGC TC	636-617	PCR 606-pb	Reverse
	JW10-2	GTC ATC AAT GTG TGR TGT TC			
	JW10-3	GTC ATT AGA GTA TGG TGT TC			
	M13-JW12	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG TAA CAC CYC TAC AAT G -3'	53-73	PCR 606-pb	Forward
	M13-JW6	5'- GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG CAR TTC GCA CAC ATT TTR TG -3'	660-641	PCR 606-pb	Reverse

7.1.4.2 Amplificarea genei complete N a virusului rabic

Aceasta a fost realizată în 2 serii de PCR. Astfel, pentru prima etapă (One step N full gene) s-a folosit kit-ul *Qiagen One step RT-PCR*. Mix-ul realizat per probă a fost compus din: 4,3 μ l H₂O, 3 μ l de *Qiagen One step RT-PCR* 5x, 0,6 μ l de mix dNTP, 0,5 μ l RNase Out (40 U/ μ L), 0,5 μ l din fiecare primer în parte JW12 (20pmol/ μ l) și PVN8bis (20pmol/ μ l), 0,6 μ l mix de enzime și 5 μ l probă ARN viral. Tuburile au fost introduse în termociclorul Eppendorf AG la următorul program:

Tabelul 7.3 / Table 7.3

Etapele programului One step full N gene la termociclorul Eppendorf AG
One step full N gene programme steps on the Eppendorf AG termocycle

One step full N gene	Temperatură	Durată	Nr. de cicluri
Revers transcripție	50°C	30 min	1
Activare inițială a PCR-ului	95°C	15 min	1
Denaturare	94°C	30 sec	45
Hibridare	44°C	30 sec	
Extensie	72°C	2 min	
Extensie finală	72°C	10 min	1

După terminarea primei etape de PCR, din produsul obținut s-a realizat a doua etapă (M13 Full Nucleo) pentru amplificarea completă a proteinei N. Mix-ul a fost compus per probă (18 µl) din: 14,25 µl H₂O, 2 µl PCR Buffer II 10x, 1 µl MgCl₂ (2,5 mM), 1 µl dNTP (2 mM), 0,25 µl din fiecare primer M13-20JW12 și M13RevPVN8Bis, 0,25 µl Platinum Taq DNA polymerase și 2 µl produs PCR etapa 1. Tuburile au fost introduse în termociclorul Eppendorf AG la următorul program:

Tabelul 7.4 / Table 7.4

Etapele programului M13 Full Nucleo la termociclorul Eppendorf AG
M13 Full Nucleo gene programme steps on the Eppendorf AG termocycle

M13 Full Nucleo	Temperatură	Durată	Nr de cicluri
1-ul ciclu de denaturare	94°C	2 min	1
Denaturare	94°C	30 sec	45
Hibridare	48°C	30 sec	
Extensie	72°C	2 min	
Extensie finală	72°C	7 min	1

Tabelul 7.5 / Table 7.5

Primerii utilizați pentru amplificării genei complete N și pentru secvențierea produsilor PCR
The primers used for the amplification of full N gene and for the sequencing of PCR products

Gena amplificată	Primeri	Secvența (5' 3')	Regiunea amplificată	Fragment PCR (pb)	Sens
N full	JW12	ATG TAA CAC CYC TAC AAT G	55-73	PCR 1531-pb	Forward
	PVN8bis	AGTTTCTTCAGCCATCTC	1585-1568	PCR 1531-pb	Reverse
	M13-20JW12 M13RevPVN8Bis			PCR 1531-pb PCR 1531-pb	Forward Reverse

7.1.5 Electroforeza: migrarea produsilor PCR în gel de agaroză 2%

După terminarea programelor pentru amplificarea nucleoproteinei parțiale și complete, produșii PCR au fost analizați prin intermediul electroforezei în gel de agaroză 2%, utilizând un reagent de intercalare SYBR Safe DNA Gel la o concentrație finală de 1/10.000, vizualizați și fotografiați la aparatul BioRad Laboratories.

Astfel, pentru pregătirea gelului, într-un pahar Erlenmeyer a fost cântărită agaroză 2%, fiind utilizată o cantitate cuprinsă între 1,05 - 1,4 grame, la care s-au adăugat 70 ml de TAE. Amestecul a fost introdus la cuptorul cu microunde timp de 2-3 minute pentru dizolvarea agarozei, după care, în hota special amenajată pentru substanțe periculoase au fost adăugați 7 µl de Sybr Safe DNA Gel (Fig. 7.8A).

Amestecul obținut a fost introdus în matrița în care au fost fixați pieptenii pentru formarea godeurilor, timp de 30 de minute, suficient cât acesta să se întărească (Fig. 7.8B). După răcirea și întărirea gelului, pieptenii au fost scoși din matriță. Înainte de a așeza gelul în cuva de electroforeză orizontală, aceasta a fost umplută cu tampon de electroforeză TAE.

Pentru inoculare, prima linie este de regulă rezervată greutateii moleculare (4 μ l de 1 kb DNA Ladder la care s-au adăugat 2 μ l de Blue Orange Loading Dye). În continuare, probele de testat au fost inoculate în cantitate de 5 μ l la care s-au adăugat 2 μ l de de Blue Orange Loading Dye. Aparatul de electroforeză a fost pornit pentru o durată de aproximativ 30-40 de minute la 110 V și 106 Ma (Fig. 7.8C), după care gelul a fost vizualizat la aparatul BioRad Laboratories cu ajutorul luminii UV (Fig. 7.8D).

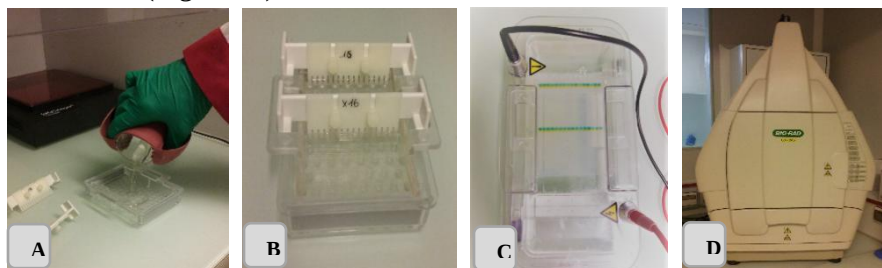


Fig. 7.8 A) Pregătirea gelului; B) Aplicarea pieptenilor; C) Inocularea probelor; D) Citirea la Aparatul BioRad Laboratories, France

Fig. 7.8 A) Preparation of the gel; B) The combs setting; C) Samples inoculation; D) Results reading using BioRad Laboratories machine, France (original)

7.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

7.2.1 SYBRGreen Real time qRT-PCR

După realizarea metodelor de referință în diagnosticul rabiei (IFD și RTCIT), pentru toate probele luate în studiu, au fost puse în aplicare și tehnicile de biologie moleculară.

Toate probele găsite pozitive prin intermediul metodelor de referință (n=43), dar și cele negative (n=16), au fost reconfirmate și prin intermediul celor de biologie moleculară, rezultatele aflându-se în concordanță cu cele inițiale.

Amplificarea și cuantificarea acizilor nucleici utilizând tehnica SYBRGreen, pe lângă numeroasele avantaje pe care ni le oferă, se numără și posibilitatea de a urmări în timp real rezultatele probelor noastre, nefiind necesar să așteptăm până la sfârșitul reacției, în acest fel reușind să ne creăm deja o imagine de ansamblu asupra rezultatului final.

Această tehnică este mult mai sensibilă, mai rapidă și mai ușor de realizat comparativ cu RT-PCR convențional, atât amplificarea cât și cuantificarea realizându-se în cadrul aceleiași reacții, nefiind nevoie de efectuarea electroforezei în gel de agaroză 2%.

Astfel, după terminarea programului la aparatul Rotor Gene Q, datele brute au fost exportate într-un fișier Excell (Fig. 7.9).

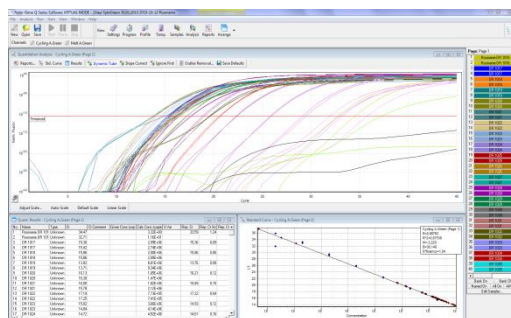


Fig. 7.9 Modul de prezentare a datelor analitice obținute, ale probelor testate în sistemul Real-time RT-PCR, cu cele 3 ferestre de analiză a software-ului Rotor-Gene Q (original)

Fig. 7.9 The presentation mode of the analytical data obtained for the samples tested with the Real-time RT-PCR system, with the 3 analyze windows of Rotor-Gene Q software (original)

Un prag de referință de 0,09 pentru SYBRGreen a fost setat manual. Acesta a fost plasat în cadrul fazei exponențiale și deasupra semnalului de fond (Fig. 7.10). Odată poziționat pragul limită, software-ul a calculat automat valorile Ct.

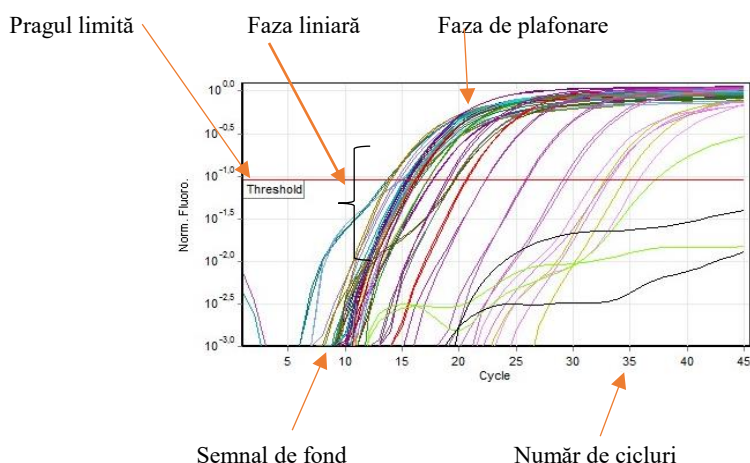


Fig. 7.10 Reprezentarea fazelor de amplificarea a reacției SYBR Green Real-time RT-PCR (original)

Fig. 7.10 Representation of amplification phases of SYBR Green Real-time qRT-PCR (original)

Ct-ul, ciclul pragului limită sau ciclul de prag (Threshold), reprezintă în esență o valoare zecimală, fiind punctul de intersecție dintre o curbă de amplificare și o linie de prag. Acesta este invers proporțional cu cantitatea de ADNc țintă din proba de analizat. Astfel, cu cât cantitatea inițială de ADNc țintă este mai mare, cu atât produsul PCR este acumulat și detectat mai repede, iar valoarea CT este mai mică.

Pentru cuantificarea acizilor nucleici au fost utilizate 2 metode: Ct și curba standard. O curbă standard a fost generată de către software-ul *RotorGene QMDx* cu ajutorul diluțiilor seriate ARN (10^6 la 10^1 copii ARN/ μ l). Aceasta ne oferă valori cu privire la curba standard, coeficientul de determinare (R^2) și eficacitatea PCR-ului, esențiale pentru validarea tehnicii. Tehnica PCR este validată doar dacă eficacitatea variază între 90% și 110% cu o valoare a lui R^2 superioară de 0,98 și dacă atât controalele pozitive cât și cele negative se încadrează standardelor (Fig. 7.11B, 7.12B, 7.13B, 7.14B).

Toate probele au fost pozitive prin tehnica SYBRGreen qRT-PCR, cu excepția probelor din Bârlad și Maramureș, România (DR1016, DR1188 – DR1197) și a 5 probe din Republica Moldova (DR1199, DR1202, DR1344, DR1354 și DR1355), fiind obținut un total de 43 de probe pozitive și 16 negative (Fig. 7.11A, 7.12A, 7.13A, 7.14A).

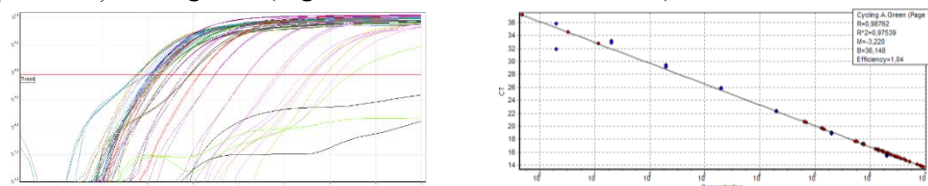


Fig. 7.11 A) (stânga) Amplificarea probelor DR1016-DR1036 și al controalelor prin intermediul tehnicii SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B) (dreapta) Curba standard SYBRGreen Real-time qRT-PCR aferentă probelor DR1016-DR1036 (original)

Fig. 7.11 A) (left) Amplification of the DR1016-DR1036 samples and of the controls by using SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B) (right) Standard curve of the DR1016-DR1036 samples by using SYBRGreen Real-time qRT-PCR (original)

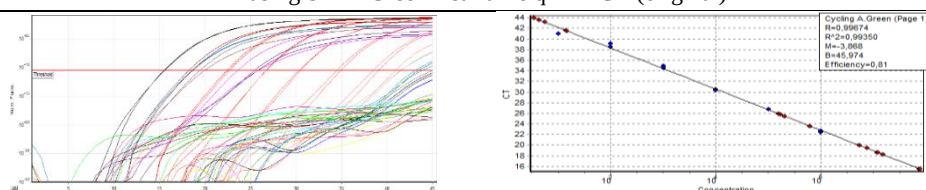


Fig. 7.12 A) (stânga) Amplificarea probelor DR1187-DR1202 și al controalelor prin intermediul tehnicii SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B) (dreapta) Curba standard SYBRGreen Real-time qRT-PCR aferentă probelor DR1187-DR1202 (original)

Fig. 7.12 A) (left) Amplification of the DR1187-DR1202 samples and of the controls by using SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B)(right) Standard curve of the DR1187-DR1202 samples by using SYBRGreen Real-time qRT-PCR (original)

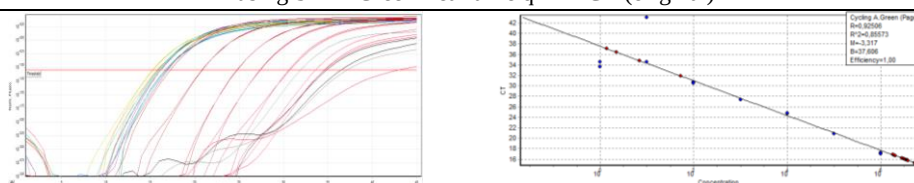


Fig. 7.13 A) (stânga) Amplificarea probelor DR1331-DR1336 și al controalelor prin intermediul tehnicii SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B) (dreapta) Curba standard SYBRGreen Real-time qRT-PCR aferentă probelor probelor DR1331-DR1336 (original)

Fig. 7.13 A) (left) Amplification of the DR1331-DR1336 samples and of the controls by using SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B)(right) Standard curve of the DR1331-DR1336 samples by using SYBRGreen Real-time qRT-PCR (original)

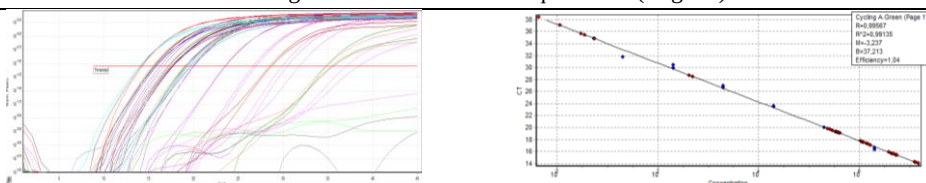


Fig. 7.14 A) (stânga) Amplificarea probelor DR1343-DR1358 și al controalelor prin intermediul tehnicii SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B) (dreapta) Curba standard SYBRGreen Real-time qRT-PCR aferentă probelor DR1343-DR1358 (original)

Fig. 7.14 A) (left) Amplification of the DR1343-DR1358 samples and of the controls by using SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B) (right) Standard curve of the DR1343-DR1358 samples by using SYBRGreen Real-time qRT-PCR (original)

Astfel, în cazul probelor testate, coeficientul de determinare R^2 a avut o valoare cuprinsă între 0,85-0,99, fiind considerată satisfăcătoare. Acest coeficient are o importanță foarte mare, întrucât exprimă precizia rezultatelor obținute. Eficacitatea PCR-ului a înregistrat o valoare cuprinsă între 1-1,04, fiind ideală pentru curba standard.

Semnalul fluorescent emis de către SYBRGreen alipit de produsul PCR al probelor testate a fost emis între ciclurile 6-14. De regulă, după 35 de cicluri, intensitatea semnalului fluorescent a început să scadă, indicând faptul că PCR-ul a ajuns la saturație.

Valorile Ct obținute au variat între 13,71 și 23,64 pentru probele pozitive confirmate. Numărul de copii/reacție a variat între $1,37E+05$ și $1,34E+08$. Aceste valori ne indică faptul că unele probe sunt mult mai concentrate în virus rabic decât altele. Concentrația probelor este de asemenea reflectată în diferența numărului necesar de cicluri pentru a dobândi semnalul fluorescent. Valorile Ct, <Ct și deviația standard sunt descrise în Tabelul 7.6.

Tabelul 7.6 / Table 7.6

Rezultate obținute în cadrul tehnicilor SYBRGreen qRT-PCR și TaqMan qRT-PCR - sonda GT1

Results of the SYBRGreen qRT-PCR and TaqMan qRT-PCR - LysGT1 probe

Probe testate	SYBRGreen qRT-PCR			TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT1, amplificare RABV		
	Ct	< Ct	Deviația standard	Ct	< Ct	Deviația standard
DR1016 neg.						
DR1017	15,30 15,42	15,36	0,09	21,36 21,58	21,47	0,16
DR1018	15,86 15,86	15,86	0,00	21,66 21,67	21,66	0,01
DR1019	13,82 13,71	13,76	0,08	20,45 20,17	20,31	0,20
DR1020	16,13 16,30	16,21	0,12	20,97 21,16	21,06	0,13
DR1021	16,00 15,78	15,89	0,15	20,95 20,69	20,82	0,18
DR1022	17,19 17,25	17,22	0,04	23,97 23,97	23,97	0,00
DR1023	15,02 14,84	14,93	0,12	22,59 22,53	22,56	0,05
DR1024	14,72 14,49	14,61	0,16	20,77 20,56	20,66	0,15
DR1025	15,72 15,57	15,65	0,10	21,21 21,56	21,38	0,25
DR1026	13,89 14,06	13,97	0,12	19,57 19,71	19,64	0,10
DR1027	15,17 15,25	15,21	0,06	21,22 21,41	21,31	0,14
DR1028	17,68 17,60	17,64	0,06	26,97 26,44	26,71	0,38

Probe testate	SYBRGreen qRT-PCR			TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT1, amplificare RABV		
	Ct	< Ct	Deviația standard	Ct	< Ct	Deviația standard
DR1029	16,09	16,29	0,29	24,62	25,06	0,63
	16,50			25,51		
DR1030	19,57	19,55	0,03	26,28	26,45	0,25
	19,52			26,63		
DR1031	16,03	16,02	0,01	22,01	22,02	0,02
	16,01			22,03		
DR1032	19,57	19,61	0,06	26,26	26,26	0,00
	19,65			26,27		
DR1033	16,31	26,35	0,05	22,55	22,77	0,32
	16,38			23,00		
DR1034	16,15	16,23	0,11	22,54	22,41	0,18
	16,30			22,28		
DR1035	15,80	15,77	0,04	22,15	22,08	0,10
	15,73			22,01		
DR1036	17,21	17,21	0,01	23,5	23,57	0,10
	17,20			23,64		
DR1187	23,56	21,68	0,17	23,81	23,83	0,03
	23,64			23,86		
DR1188 - DR1197: neg.						
DR1198	16,92	15,49	0,05	18,85	18,92	0,10
	16,93			18,98		
DR1199 neg.						
DR1200	21,93	20,91	0,66	22,31	22,23	0,12
	23,41			22,14		
DR1201	18,01	16,32	0,02	19,63	19,65	0,03
	17,75			19,68		
DR1202 neg						
DR1331	15,26	15,28	0,02	20,22	20,26	0,09
	15,30			20,31		
DR1332	15,78	15,81	0,04	28,15	28,15	0,00
	15,84			-		
DR1333	16,76	16,81	0,08	28,74	28,33	0,19
	16,87			27,93		
DR1334	16,19	16,20	0,00	22,82	22,65	0,33
	16,20			22,49		
DR1335	16,10	16,39	0,41	20,49	40,79	0,19
	16,68			20,30		
DR1336	15,98	15,93	0,08	21,31	21,17	0,27
	15,88			21,04		
DR1343	17,08	17,33	0,35	21,20	20,95	0,59
	17,58			20,79		
DR1344	28,73	28,62	0,15	-	-	-
	28,51			-		
DR1345	19,03	19,05	0,02	24,63	24,54	0,17
	19,06			24,46		
DR1346	19,81	19,74	0,11	25,26	25,28	0,04
	19,66			25,30		
DR1347	15,75	15,82	0,10	22,11	22,07	0,07
	15,89			22,04		
DR1348	17,66	17,60	0,09	22,12	22,09	0,05
	17,53			22,07		

Probe testate	SYBRGreen qRT-PCR			TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT1, amplificare RABV		
	Ct	< Ct	Deviația standard	Ct	< Ct	Deviația standard
DR1350	17,68			23,08		
	17,33	17,27	0,08	22,98	22,91	0,13
	17,21			22,85		
DR1351	14,03	14,00	0,04	18,12	18,09	0,05
	13,97			18,07		
DR1352	19,24	19,28	0,06	24,76	24,93	0,65
	19,32			25,11		
DR1353	19,25	19,39	0,20	25,31	25,19	0,24
	19,53			25,07		
DR1354	35,68	35,24	0,61	-	-	-
	34,81			-		
DR1355	34,84	35,15	0,44	-	-	-
	35,46			-		
DR1356	15,57	15,61	0,06	21,94	21,78	0,32
	15,65			21,62		
DR1357	15,36	15,41	0,06	21,32	21,33	0,03
	15,45			21,35		
DR1358	19,14	19,11	0,04	23,56	23,51	0,10
	19,09			23,46		

7.2.2 TaqMan Real time qRT-PCR

Sondele TaqMan ne permit să măsurăm producția produșilor PCR cu un sistem de sonde marcate cu fluorocromi. Pentru fiecare dintre cele 3 detecții realizate, s-au folosit controale pozitive specifice LysGT1, LysGT5 și LysGT6 pentru cele 3 genotipuri, și anume RABV, EBLV-1 și EBLV-2.

Pentru detecția genotipului 1 RABV, tehnica a fost realizată în cazul tuturor celor 47 de probe testate prin intermediul tehnicilor de biologie moleculară, și anume DR1016-DR1036, DR1187-DR1202, DR1331-DR1336, DR1343-DR1358. Pentru detecția genotipurilor 5 EBLV-1 și 6 EBLV-2, tehnica a fost realizată pentru primele probe luate în studiu în anul 2015, și anume DR1016-DR1036.

Referitor la primul genotip RABV, toate probele au fost pozitive, cu excepția DR1016, DR1188-DR1197, DR1199 și DR1202 (Fig. 7.15 A, B).

Astfel, valorile Ct obținute pentru genotipul 1 au variat între 19,57 și 26,97. Valorile Ct, <Ct și deviația standard sunt descrise în Tabelul 7.6.

Pentru detecția celorlalte 2 genotipuri, și anume 5 și 6, toate probele au fost negative, cu excepția controalelor pozitive care s-au încadrat în standard (Fig. 7.16 A, B).

Rezultatele pozitive obținute pentru primul genotip și cele negative pentru genotipurile 5 și 6, confirmă și încadrează izolatele de virus rabic în cadrul primului genotip.

În cazul probelor ulterioare luate în studiu (DR1187-DR1202, DR1331-DR1336, DR1343-DR1358) provenind din același areal, nu s-a mai repetat tehnica pentru GT5 și GT6, cunoscând deja apartenența virusului la genotipul 1, iar posibilitatea ca acestea să fie pozitive pentru genotipul 5 sau 6 fiind extrem de mică chiar nulă, ele fiind caracteristice anumitor zone geografice și specii de animale.

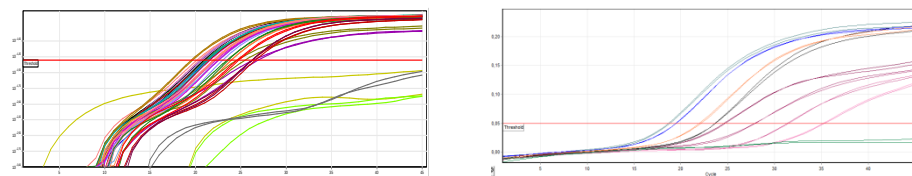


Fig. 7.15 A) (stânga) Amplificarea RABV a probelor DR1016-DR1036 utilizând tehnica TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT1; B) (dreapta) Amplificarea RABV a probelor DR1187, DR1198, DR1200 și DR1201 utilizând tehnica TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT1 (original)
Fig. 7.15 A) (left) Amplification of RABV of the DR1016-DR1036 samples by using TaqMan qRT-PCR, LysGT1 probe; B) (right) Amplification of RABV of the DR1187, DR1198, DR1200 and DR1201 samples by using TaqMan qRT-PCR, LysGT1 probe (original)

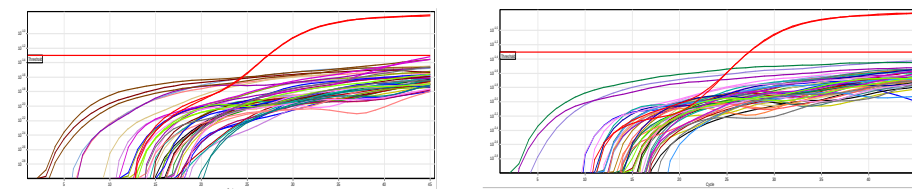


Fig. 7.16 A) stânga) Amplificarea EBLV-1 a probelor DR1016-DR1036 utilizând tehnica TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT5. Controlul pozitiv este ilustrat în roșu; B) (dreapta) Amplificarea EBLV-2 a probelor DR1016-DR1036 utilizând tehnica TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT6. Controlul pozitiv este ilustrat în roșu (original)

Fig. 7.16 A) (left) Amplification of EBLV-1 of the DR1016-DR1036 samples by using TaqMan qRT-PCR, LysGT5 probe. The positive control is ilustrted in red; B) (right) Amplification of EBLV-2 of the DR1016-DR1036 samples by using TaqMan qRT-PCR, LysGT6 probe. The positive control is ilustrted in red (original)

7.2.3 Heminested RT-PCR conventional

RT-PCR-ul convențional a fost realizat cu scopul de a amplifica gena parțială (606-pb) și completă (1353-pb) N a virusului rabic.

Din totalul celor 59 de probe luate în studiu, 47 de probe au fost testate prin intermediul tehnicii RT-PCR pentru proteina N parțială, 43 fiind pozitive și 4 negative, iar pentru proteina N completă au fost testate 43 de probe, doar 2 dintre ele fiind negative, rezultatele fiind în concordanță cu cele obținute la diagnosticul de confirmare (Tabel 7.7).

Tabelul 7.7 / Table 7.7

Corelarea rezultatelor obținute la RT-PCR convențional și la diagnosticul de referință

Results corelation of the conventional RT-PCR and referenced diagnosis

Nr.	Cod probe	Diagnostic de referință	RT-PCR Convențional Fragment proteina N606-pb / N1500-pb
1	DR1016	Neg	Neg / -
2	DR1017	Poz	Poz / Poz
3	DR1018	Poz	Poz / Poz
4	DR1019	Poz	Poz / Poz
5	DR1020	Poz	Poz / Poz
6	DR1021	Poz	Poz / Poz
7	DR1022	Poz	Poz / Poz
8	DR1023	Poz	Poz / Poz
9	DR1024	Poz	Poz / Poz
10	DR1025	Poz	Poz / Poz

Nr.	Cod probe	Diagnostic de referință	RT-PCR Convențional Fragment proteina N606-pb / N1500-pb
11	DR1026	Poz	Poz / Poz
12	DR1027	Poz	Poz / Poz
13	DR1028	Poz	Poz / Poz
14	DR1029	Poz	Poz / Poz
15	DR1030	Poz	Poz / Poz
16	DR1031	Poz	Poz / Poz
17	DR1032	Poz	Poz / Poz
18	DR1033	Poz	Poz / Poz
19	DR1034	Poz	Poz / Poz
20	DR1035	Poz	Poz / Poz
21	DR1036	Poz	Poz / Poz
22	DR1187	Poz	Poz / Poz
23	DR1188	Neg	- / -
24	DR1189	Neg	- / -
25	DR1190	Neg	- / -
26	DR1191	Neg	- / -
27	DR1192	Neg	- / -
28	DR1193	Neg	- / -
29	DR1194	Neg	- / -
30	DR1195	Neg	- / -
31	DR1196	Neg	- / -
32	DR1197	Neg	- / -
33	DR1198	Poz	Poz / Poz
34	DR1199	Neg	- / -
35	DR1200	Poz	Poz / Poz
36	DR1201	Poz	Poz / Poz
37	DR1202	Neg	Neg / -
38	DR1331	Poz	Poz / Poz
39	DR1332	Poz	Poz / Poz
40	DR1333	Poz	Poz / Poz
41	DR1334	Poz	Poz / Poz
42	DR1335	Poz	Poz / Poz
43	DR1336	Poz	Poz / Poz
44	DR1343	Poz	Poz / Poz
45	DR1344	Neg	Neg / -
46	DR1345	Poz	Poz / Poz
47	DR1346	Poz	Poz / Neg
48	DR1347	Poz	Poz / Poz
49	DR1348	Poz	Poz / Poz
50	DR1349	Poz	Poz / Poz
51	DR1350	Poz	Poz / Poz
52	DR1351	Poz	Poz / Poz
53	DR1352	Poz	Poz / Poz
54	DR1353	Poz	Poz / Poz
55	DR1354	Neg	Neg / -
56	DR1355	Neg	Neg / -
57	DR1356	Poz	Poz / Poz
58	DR1357	Poz	Poz / Poz
59	DR1358	Poz	Poz / Neg

Neg: negativ; Poz: pozitiv; -: netestat

Amplificarea genei parțiale N a virusului rabic (606-pb)

Amplificarea parțială a fost realizată pentru 47 de probe (DR1016-DR1036, DR1187, DR1198, DR1200, DR1201, DR1331-DR1336, DR1343-DR1358). Astfel, din acest total, 43 au fost pozitive și 4 negative (DR1016, DR1344, DR1354, DR1355), rezultatele fiind în concordanță cu cele obținute la diagnosticul de confirmare (Fig. 7.17 a.b.c.d.).

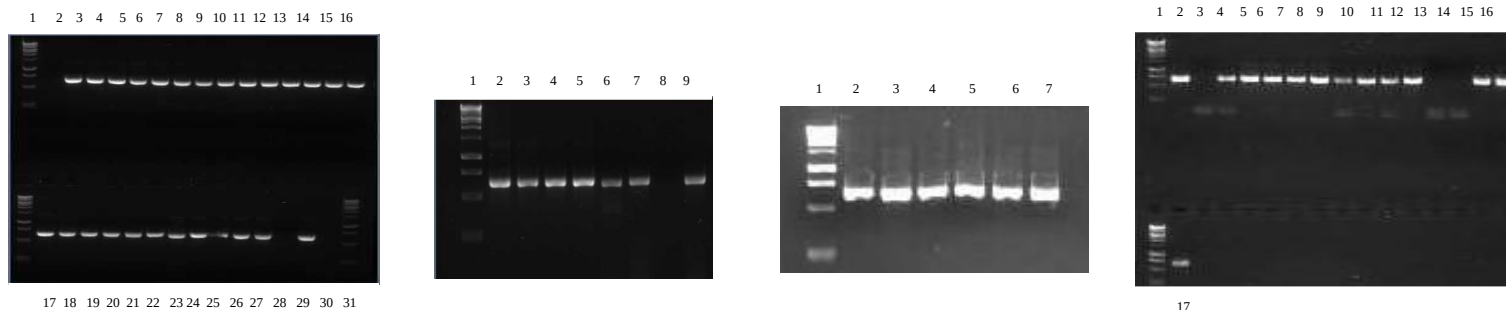


Fig. 7.17.a. Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (Fragment a genei parțiale N606-pb): Marker molecular (linia 1), probe testate DR1016 - DR1036 (liniile 2 - 22), alte probe testate în paralel (liniile 23 - 27), control negativ ARN (linia 28), control pozitiv (linia 29), control negativ PCR (linia 30) și marker molecular (linia 31) (original). **Fig. 7.17.b.** Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (fragment al proteinei N parțiale 606-pb). Marker molecular (linia 1), probe testate DR1187, DR1198, DR1200 și DR1201 (liniile 2-5), alte 2 probe testate (liniile 6 și 7), control negativ (linia 8) și control pozitiv (linia 9) (original). **Fig. 7.17.c.** Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (fragment al proteinei N parțiale 606-pb). Marker molecular (linia 1), probe testate DR1331-1336 (liniile 2-7) (original). **Fig. 7.17.d.** Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (fragment al proteinei N parțiale 606-pb). Marker molecular (linia 1), probele testate DR1343-DR1357 (liniile 2-16), DR1358 (linia 17) (original)

Fig.7.17.a. Rabies RNA detection by conventional RT-PCR (606-bp): Marker weight (line 1), tested samples DR1016 to DR1036 (lines 2 to 22), another samples tested (lines 23 to 27) at the same time, the RNA negative control (line 28), the positive control (line 29), the PCR negative control (line 30) and the marker weight (line 31) (original). **Fig.7.17.b.** Rabies RNA detection by conventional RT-PCR (606-bp): Marker weight (line1), tested samples DR1187, DR1198, DR1200, DR1201 (line 2-5), another samples tested (lines 6-7), the negative control (line 8), the positive control (line 9) (original). **Fig. 7.17.c.** Rabies RNA detection by conventional RT-PCR (606-bp): Marker weight (line1), tested samples DR1331-1336 (lines 2-7) (original). **Fig. 7.17.d.** Rabies RNA detection by conventional RT-PCR (606-bp): Marker weight (line1), tested samples DR1343-1357 (lines 2-16), DR1358 (line 17) (original)

Amplificarea genei complete N a virusului rabic (1353-pb)

Amplificarea completă a fost realizată pentru 43 de probe care au ieșit pozitive la diagnosticul de confirmare, dar și la amplificarea proteinei N parțiale. Din cele 43 de probe testate, 41 au fost pozitive și 2 negative (DR1346 și DR1358) prin intermediul PCR-ului pentru gena completa N (Fig. 7.18 a.b.c.d.).

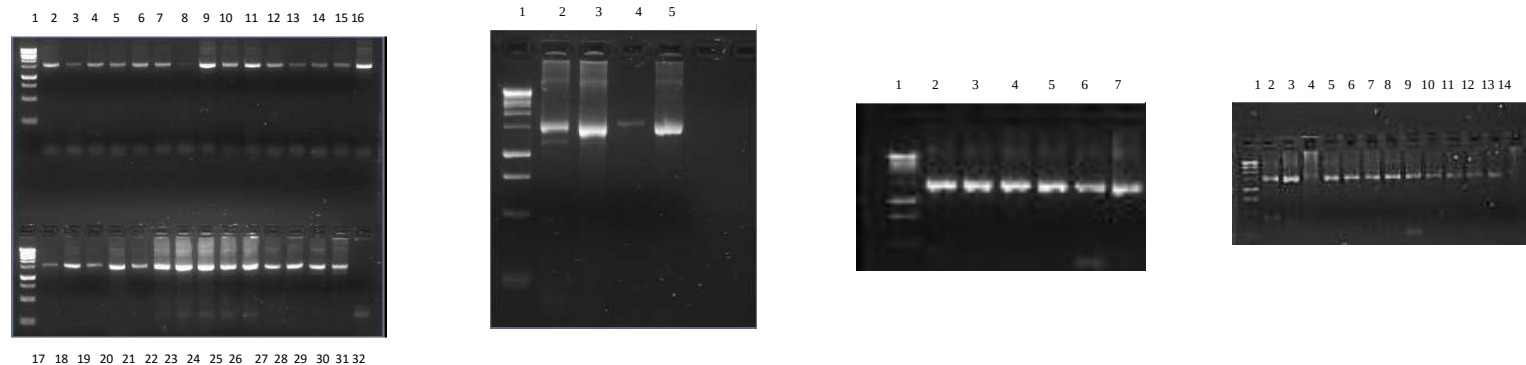


Fig. 7.18.a Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (Fragment a genei complete N 1353-bp): Marker molecular (linia 1), probe testate DR1017- DR1036 (liniile 2 - 21), alte probe testate în paralel (liniile 22 - 30), control negativ (linia 32) (original). **Fig. 7.18.b** Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional Fragment al proteinei N complete 1353-bp): Marker molecular (linia 1), probe testate DR1187, DR1198, DR1200 și DR1201 (liniile 2-5) (original). **Fig. 7.18.c** Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (Fragment al proteinei N complete 1353-bp): Marker molecular (linia 1), probe testate DR1331-DR1336 (liniile 2-7) (original). **Fig. 7.18.d** Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (Fragment al proteinei N complete 1353-bp): Marker molecular (linia 1), probe testate DR1343, DR1345-DR1353, DR1357, DR1358 (liniile 2-14) (original)

Fig. 7.18.a Rabies RNA detection by conventional RT-PCR (1353-bp): Marker weight (line 1), tested samples DR1017 to DR1036 (lines 2 to 21), another samples tested (lines 22 to 30) at the same time, negative control (line 31) (original). **Fig. 7.18.b** Rabies RNA detection by conventional RT-PCR (1353-bp): Molecular marker (line 1), tested samples DR 1187, DR1198, DR1200 and DR1201 (line 2 to 5) (original). **Fig. 7.18.c** Rabies RNA detection by conventional RT-PCR (1353-bp): Molecular marker (line 1), tested samples DR1331-DR1336 (lines 2 to 7) (original). **Fig. 7.18.d** Rabies RNA detection by conventional RT-PCR (1353-bp): Molecular marker (line 1), prtested samples DR1343, DR1345-DR1353, DR1357, DR1358 (line 2 to 14) (original)

7.2.4 Dozarea concentrației de ARN/ADNc viral

Ultima tehnică din cadrul acestui capitol, și anume dozarea concentrației ARN-ului/ADNc-ului viral a fost realizată, de regulă, după amplificarea produșilor PCR. Scopul acestuia a fost de a determina cu exactitate cantitatea de ARN/ADNc viral dintr-o probă, exprimată în nanograme/microlitru (ng/μl). O cantitate minimă de 15 ng/μl este necesară pentru a putea efectua mai departe secvențierea produșilor doriți.

Astfel, concentrația probelor a fost determinată prin intermediul metodei spectrofluorometrice, utilizând kit-ul *Qubit RNA Assay Kit* și *Qubit DNA HS kit* la aparatul Qubit.

Astfel, într-un tub Falcon de 15 ml a fost pregătit un mix compus din *Qubit dsDNA Hs Buffer* și *Qubit dsDNA Hs Reagent*. Cantitatea a fost calculată în funcție de numărul de probe dorit pentru testare. În tuburi special furnizate în kit au fost adăugați per probă 199 μl din mix-ul preparat anterior și 1 μl din proba de testat, cu o cantitate finală de 200 μl. Fiecare tub a fost vortexat, centrifugat și citit la aparat (Fig. 7.19, 7.20). Pentru ca o probă să poată fi trimisă la secvențiere, trebuie să conțină un minim de 15 ng/μl de ARN/ADNc viral.

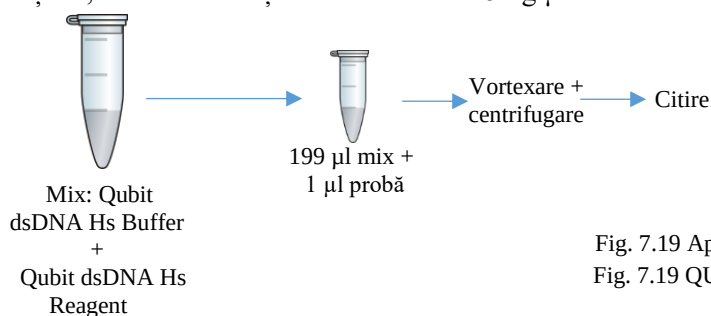


Fig. 7.19 Aparatul QUBIT, Invitrogen, (original)

Fig. 7.19 QUBIT apparatus, Invitrogen (original)

Fig. 7.20 Etapele dozării concentrației de ARN/ADNc (original)

Fig. 7.20 The steps of RNA/cDNA concentration determination (original)

Tabelul 7.8 / Table 7.8

Rezultatele determinărilor concentrației de ARN / ADNc viral din probele pozitive luate în studiu

The results of viral RNA/cDNA concentration determination of the studied samples

Nr.	Cod probă	QUBIT N606-pb	QUBIT N1353-pb
1	DR1017	83,4	23,5
2	DR1018	78	9,87
3	DR1019	83,5	18,7
4	DR1020	69,3	16,7
5	DR1021	78	28
6	DR1022	75	19,7
7	DR1023	79,2	9,91
8	DR1024	97	38,2
9	DR1025	83,2	26,1
10	DR1026	80	28,7
11	DR1027	98,2	18,1
12	DR1028	84,4	14,5
13	DR1029	90,9	12,7
14	DR1030	77,3	13,2
15	DR1031	87,3	41,8
16	DR1032	85,3	14,4

Nr.	Cod probă	QUBIT N606-pb	QUBIT N1353-pb
17	DR1033	72,8	29,6
18	DR1034	84,1	20,7
19	DR1035	79	33,9
20	DR1036	77,3	25,4
21	DR1187	72,9	59,6
22	DR1198	94,3	64,9
23	DR1200	47,6	54,8
24	DR1201	89,9	66,8
25	DR1331	73,9	54,4
26	DR1332	73,7	74,2
27	DR1333	82,5	19,1
28	DR1334	86,2	60,3
29	DR1335	70,8	71,5
30	DR1336	83,5	63,7
31	DR1343	85,7	91,6
32	DR1345	50,8	115
33	DR1346	78,8	-
34	DR1347	83,6	94,4
35	DR1348	83,1	84,6
36	DR1349	86,8	87,8
37	DR1350	51	105
38	DR1351	69,1	69,7
39	DR1352	62,7	99
40	DR1353	85,5	94,5
41	DR1356	75,6	92,8
42	DR1357	82,8	73,8
43	DR1358	36,1	-

Astfel, determinarea concentrației acizilor nucleici pentru gena parțială N a celor 43 de probe pozitive, s-a încadrat valorii minime de 15 ng/μl necesare secvențierii ulterioară a produșilor PCR obținuți, pe când în cazul celei complete, doar 38 de probe din cele 43 testate s-au încadrat în valoarea minimă, probele DR1018, DR1023, DR1028, DR1029 și DR1030 fiind sub nivelul cerut. Pe parcursul realizării tehnicilor moleculare, nu au fost semnalate contaminări încrucișate între probele testate, acest lucru susținând și întărind ideea conform căreia implementarea acestora în metodele de referință pentru diagnosticul rabiei este pe cât se poate de apropiată.

7.3 CONCLUZII PARȚIALE

Rezultatele probelor testate prin intermediul tehnicilor de biologie moleculară au fost în concordanță cu cele obținute la diagnosticul de confirmare, IFD și RTCIT, nefiind înregistrate rezultate fals pozitive sau negative. Utilizarea acestora reprezintă un instrument adițional pentru detecția lyssavirusurilor, fiind utilizate cu succes în cazul probelor aflate în stare avansată de putrefacție, conservate în condiții improprie sau pentru o perioadă îndelungată de timp (-80°C). Sensibilitatea și specificitatea ridicate ale tehnicilor subliniază necesitatea implementării lor ca și metode de referință alături de cele deja cunoscute.

CAPITOLUL VIII

CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A TULPINILOR DE VIRUS RABIC IZOLATE DIN NORD-ESTUL ROMÂNIEI ȘI DIN REPUBLICA MOLDOVA

CHAPTER VIII

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RABIES VIRUS STRAINS FROM NORTH-EAST OF ROMANIA AND REPUBLIC OF MOLDOVA

Ernst Haeckel, biolog și filozof german, a fost prima persoană care a realizat un arbore filogenetic în anul 1866, de atunci, biologia moleculară aflându-se într-o continuă evoluție. Dacă în anul 1982, conform GenBank, erau înregistrate doar 606 secvențe nucleotidice în baza de date, în luna aprilie a anului 2017 acestea au ajuns la un număr uriaș de 200.877.884 de secvențe.

8.1. Secvențierea și analiza filogenetică a nucleoproteinei virusului rabic

Amplificarea parțială și completă a nucleoproteinei N a virusului rabic a fost pe larg discutată în capitolul VII. Pentru realizarea secvențierii au fost luate în studiu probele amplificate atât pentru gena parțială N, fragment de 606-pb, cât și pentru gena completă N, fragment de 1353-pb (detaliile privind amplificarea proteinei N se regăsesc în capitolul VII).

Cu toate că, zona inițială de studiu a fost reprezentată de către partea de N-E a României, pe parcursul avansării cercetărilor s-a considerat necesară mărirea ariei de studiu prin includerea de probe din Republica Moldova (Fig. 8.1), cu scopul de a realiza o analiză filogenetică cât mai amplă și completă a variantelor de virus rabic circulante.

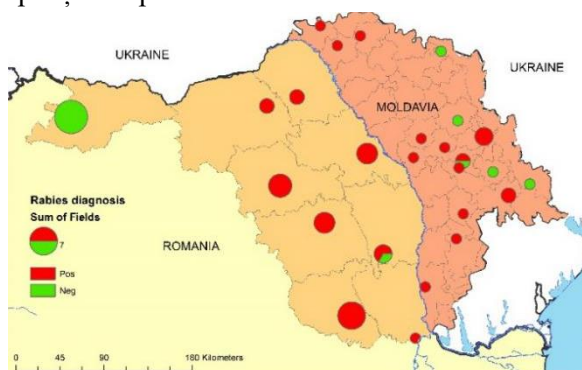


Fig. 8.1 Reprezentarea probelor luate în studiu din N-E-ul României și din Republica Moldova. Cercurile roșii reprezintă probele pozitive, iar cercurile verzi, probele negative. Harta a fost realizată cu ajutorul programului ArcView (ArcMap) (original)

Fig. 8.1 The samples tested from the N-E of Romania and Republic of Moldavia. The red circle represents the positive samples and the green ones, the negative samples. The map was performed with the ArcView (ArcMap) programme (original)

8.1 MATERIALE ȘI METODE

Secvențierea genei parțiale N, fragment de 606-pb a virusului rabic a fost realizată pentru 39 de probe, și anume: DR1017, DR1019-DR1022, DR1024-DR1027, DR1030-DR1036, DR1187, DR1198, DR1200, DR1201, DR1331-1336, DR1343, DR1345-DR1353, DR1356-DR1358.

Secvențierea genei complete N, fragment de 1353-pb a virusului rabic a fost realizată pentru un număr de 37 de probe, acestea fiind reprezentate de către DR1017, DR1019-DR1022, DR1024-DR1027, DR1030-DR1036, DR1187, DR1198, DR1200, DR1201, DR1331-DR1336, DR1343, DR1345, DR1347-DR1353, DR1356 și DR1357.

Atât gena parțială, cât și cea completă a nucleoproteinei virusului rabic au fost secvențiate de către Compania Genoscreen din Lile, Franța prin intermediul metodei enzimatice Sanger.

Această metodă a fost descrisă în anul 1977 de către cel care i-a dat numele, și anume Frederick Sanger, descoperirea fiindu-i răsplătită cu un premiu Nobel. Elementele indispensabile realizării secvențierii au fost reprezentate de către probele noastre de secvențiat (lanț simplu de ADN), primeri specifici, ADN polimeraza și nu în cele din urmă de nucleotide marcate fluorescent sau radioactiv (ddA: verde, ddT: roșu, ddG: galben, ddC: albastru).

Pentru realizarea analizei filogenetice, variabilitatea genetică a diferitelor izolate incluse în studiul nostru a fost apreciată utilizând metoda Neighbour Joining (NJ), creată de către Naruya Saitou și Masatoshi Nei în anul 1987, fiind destinată realizării de arbori filogenetici.

Construirea unui arbore filogenetic a presupus mai multe etape, și anume: alegerea secvențelor de referință din baza de date pe baza cărora se va face analiza, stabilirea similarităților și realizarea propriu-zisă a arborelui.

Astfel, în realizarea analizei filogenetice pentru gena parțială N, diferite programe și soft-uri au fost utilizate în studiul nostru. Primul dintre acestea a fost reprezentat de către Vector NTI, un soft creat de către compania InforMax Inc, fiind destinat analizei secvențelor. Prin intermediul acestui soft au fost stocate și prelucrate secvențele obținute, au fost create contig-uri, iar în cele din urmă, secvențele au fost ansamblate, editate și realizată o aliniere multiplă a acestora.

În continuare, a fost implementată metoda Neighbour Joining (NJ) bazată pe distanțe, cu ajutorul soft-ului MEGA6. Prin intermediul acestui soft creat de către Tamura ș.a. în anul 2013 a fost realizată o analiză statistică și o aliniere a secvențelor; acesta conținând funcție pentru NJ, a fost realizată construcția propriu-zisă al arborelui filogenetic. Pentru vizualizarea arborelui a fost utilizat soft-ul SeaView. Acesta a fost dezvoltat de către Manolo Gouy, fiind în esență o multiplatformă pentru alinierea multiplă a secvențelor și filogeniei moleculare, având capacitatea de a citi diferite formate (FASTA, Clustal).

În ceea ce privește analiza filogenetică pentru gena completă N, pe lângă utilizarea soft-urilor Vector NTI și MEGA 6, construcția arborelui a fost realizată cu ajutorul programului PhyML, fiind considerată cea mai bună și cea mai puternică metodă în realizarea unui arbore filogenetic, bazată pe principiu „maximum-likelihood”, mai exact pe metoda verosimilității

comparate cu 59 de secvențe nucleotidice de referință (Tabel 8.6) extrase din baza de date internațională GenBank, secvențe reprezentative grupurilor filogenetice NEE (Ucraina n=5, Polonia n=1, România n=9, Rusia n=1, Bulgaria n=2), D (Rusia n=2, România n=6, Bulgaria n=2), C (Rusia n=4, Kazakstan n=1), WE (Franța n=1, Polonia n=3), EE (Muntele Negru n=1, Iugoslavia n=1, Macedonia n=1, Ungaria n=2, România n=1, Polonia n=1, Bulgaria n=2, Serbia n=1), SF (România n=3, Bulgaria n=2, Serbia n=3), arctic (Nepal n=1, Pakistan n=1, Afganistan n=1) și asiatic (China n=1, Filipine n=1).

A fost evaluată pentru toți arborii generați prin intermediul metodei NJ, confidența arborilor. Cea mai utilizată metodă statistică, bootstrap a fost calculată în programul de analiză filogenetică (MEGA6, opțiunea bootstrap). Aceasta a fost propusă de către Felsenstein în anul 1985, fiind ulterior dezvoltată de către Efron și Tibshirani în anul 1993.

Tabel 8.1 / Table 8.1

Caracteristicile secvențelor utilizate în studiul epidemiologic molecular pentru gena parțială N, fragment de 606-pb
 Characteristics of rabies viruses used in the molecular epidemiology study for the partial N gene, fragment of 606-bp

Nr.	Țara	Nr. izolat	Specia	Anul izolării	Grup filogenetic	Nr. acces GenBank	Sursa
1	România	DR1334	bovină	2016	NEE		Acest studiu
2	Ucraina	Rvu10-08	jder	2010	NEE	JN656507	Picard-Meyer ș.a., 2011
3	Republica Moldova	DR1352	bovină	2016	NEE		Acest studiu
4	Republica Moldova	DR1351	pisică	2016	NEE		Acest studiu
5	Republica Moldova	DR1345	bovină	2016	NEE		Acest studiu
6	România	DR1031	bovină	2015	NEE		Acest studiu
7	România	DR1017	pisică	2014	NEE		Acest studiu
8	România	DR1336	bovină	2016	NEE		Acest studiu
9	Republica Moldova	DR1347	bovină	2016	NEE		Acest studiu
10	Republica Moldova	DR1200	câine	2016	NEE		Acest studiu
11	Republica Moldova	DR1358	câine	2016	NEE		Acest studiu
12	România	DR1030	bovină	2013	NEE		Acest studiu
13	Republica Moldova	DR1201	bovină	2016	NEE		Acest studiu
14	Republica Moldova	DR1349	bovină	2016	NEE		Acest studiu
15	Republica Moldova	DR1350	bovină	2016	NEE		Acest studiu
16	Republica Moldova	DR1356	bovină	2016	NEE		Acest studiu
17	România	DR1335	vulpe	2016	NEE		Acest studiu
18	Republica Moldova	DR1357	dihor	2016	NEE		Acest studiu
19	Republica Moldova	DR1198	capră	2016	NEE		Acest studiu
20	Polonia	Rv10-14141-ZW-2Pol	vulpe	2010	NEE	JN656512	Picard-Meyer ș.a., 2011
21	România	RO-RV-61-07-SV	vulpe	2007	NEE	GU086623	Turcitu ș.a., 2010
22	România	DR1332	bovină	2016	NEE		Acest studiu
23	România	DR1333	vulpe	2016	NEE		Acest studiu
24	România	RO-RV-37-08-HR	vulpe	2008	NEE	GU086649	Turcitu ș.a., 2010
25	România	DR1035	bovină	2012	NEE		Acest studiu
26	România	DR1027	căprior	2012	NEE		Acest studiu
27	România	RO-RV-2537-06-VL	vulpe	2006	NEE	GU086619	Turcitu ș.a., 2010
28	Ucraina	Rvu10-04	câine	2010	NEE	JN656503	Picard-Meyer ș.a., 2011
29	România	DR1024	vulpe	2012	NEE		Acest studiu
30	România	DR1026	câine	2012	NEE		Acest studiu

Nr.	Țara	Nr. izolat	Specia	Anul izolării	Grup filogenetic	Nr. acces GenBank	Sursa
31	România	RO-RV-58-07-SV	câine	2007	NEE	GU086620	Turcitu ș.a., 2010
32	România	DR1033	vulpe	2013	NEE		Acest studiu
33	România	DR1034	vulpe	2013	NEE		Acest studiu
34	România	DR1036	câine	2013	NEE		Acest studiu
35	România	RO-RV-09-07-SV	câine	2007	NEE	GU086635	Turcitu ș.a., 2010
36	România	DR1032	câine	2012	NEE		Acest studiu
37	România	DR1019	vulpe	2014	NEE		Acest studiu
38	România	DR1022	bovină	2013	NEE		Acest studiu
39	România	DR1025	vulpe	2012	NEE		Acest studiu
40	România	DR1187	vulpe	2014	NEE		Acest studiu
41	România	RO-RV-26-08-BC	vulpe	2008	NEE	GU086641	Turcitu ș.a., 2010
42	Rusia	RV245	om	?	NEE	AY352475	Kuszmin ș.a., 2004
43	Republica Moldova	DR1346	bovină	2016	NEE		Acest studiu
44	Republica Moldova	DR1353	bovină	2016	NEE		Acest studiu
45	Republica Moldova	DR1348	pisică	2017	NEE		Acest studiu
46	România	DR1020	vulpe	2013	NEE		Acest studiu
47	România	DR1021	lup	2014	NEE		Acest studiu
48	Republica Moldova	DR1343	pisică	2016	NEE		Acest studiu
49	Ucraina	Rvu09-39	pisică	2009	NEE	JN656500	Picard-Meyer ș.a., 2011
50	Bulgaria	09-25	vulpe	2009	NEE	JX679403	Robardet ș.a., 2012
51	Bulgaria	10-27	pisică	2010	NEE	JX679405	Robardet ș.a., 2012
52	Ucraina	Rvu10-26	câine	2010	NEE	JN656497	Picard-Meyer ș.a., 2011
53	România	RO-TL	vulpe	2005	NEE	DQ443535	Turcitu ș.a., 2010
54	România	RO-RV-208-07-BR	vulpe	2007	NEE	GU086615	Turcitu ș.a., 2010
55	România	DR1331	vulpe	2016	NEE		Acest studiu
56	România	RO-RV-207-06-BR	pisică	2006	NEE	GU086627	Turcitu ș.a., 2010
57	Ucraina	Rvu10-31	vulpe	2010	NEE	JN656498	Picard-Meyer ș.a., 2011
58	Rusia	RV234	câine	?	D	AY352476	Kuzmin ș.a., 2004
59	Rusia	RV299	vulpe	?	D	Ay352479	Kuzmin ș.a., 2004
60	România	RO-RV-201-07-CJ	vulpe	2007	D	GU086608	Turcitu ș.a., 2010
61	România	RO-RV-38-08-HR	vulpe	2008	D	GU086650	Turcitu ș.a., 2010
62	România	RO-RV-57-06-NT	lup	2006	D	GU086616	Turcitu ș.a., 2010
63	România	RO-RV-43-08-GJ	vulpe	2008	D	GU086654	Turcitu ș.a., 2010
64	România	RO-122-TR	vulpe	2005	D	DQ443538	Turcitu ș.a., 2010

Nr.	Țara	Nr. izolat	Specia	Anul izolării	Grup filogenetic	Nr. acces GenBank	Sursa
65	România	RO-RV-2536-06-VL	vulpe	2006	D	GU086618	Turcitu ș.a., 2010
66	Bulgaria	RV8	vulpe	2009	D	JQ973866	Picard-Meyer ș.a., 2012
67	Bulgaria	09-08	vulpe	2009	D	JX679399	Robardet ș.a., 2012
68	Rusia	Rus (Omsk) 7444f_2008	vulpe	2008	C	KJ958247	Poleshchuk ș.a., 2014
69	Kazakstan	KZ/cattle/4867	bovină		C	KT965738	Strochkov ș.a., 2015
70	Rusia	Rus (Voronezh) 7513f_2008	vulpe	2008	C	KC794010	Poleshchuk ș.a., 2013
71	Rusia	Rus (Lipetsk) 8064f_2012	vulpe	2012	C	KC538854	Poleshchuk ș.a., 2013
72	Rusia	PO-01_2014_Primorye	urs	2014	C	KP997032	Deviatkin ș.a., 2015
73	Franța	8663	vulpe	1984	WE	U42605	Bourhy ș.a., 1999
74	Polonia	96045	vulpe	1993	CE	KX148119	Troupin ș.a., 2016
75	Polonia	96256	vulpe	1996	CE	KX148116	Troupin ș.a., 2016
76	Polonia	97046	vulpe	1997	CE	KX148117	Troupin ș.a., 2016
77	Muntenegru	RV1268	cal	2000	EE	JF973802*	McElhinney ș.a., 2011
78	Iugoslavia	86054	lup	1986	EE	KX148145	Troupin ș.a., 2016
79	Macedonia	DR400	vulpe	2011	EE	JQ973880	Picard ș.a., 2012
80	Ungaria	93080	vulpe	1993	EE	KX148143	Troupin ș.a., 2016
81	România	RO-132-BH	pisică	2005	EE	DQ443539	Turcitu ș.a., 2010
82	Polonia	96135POL	vulpe	1992	EE	KX148141	Troupin ș.a., 2016
83	Ungaria	93091HON	vulpe	1993	EE	KX148138	Troupin ș.a., 2016
84	Bulgaria	RV10	vulpe	2009	EE	JQ973867	Picard-Meyer ș.a., 2012
85	Serbia	RV1290	vulpe	1999	EE	JF973807	McElhinney ș.a., 2011
86	Bulgaria	09-44	vulpe	2009	EE	JX679402	Robardet ș.a., 2012
87	România	RO-RV-47-05-MH	oaie	2005	SF	GU086629	Turcitu ș.a., 2010
88	Bulgaria	Bul#9	lup	?	SF	DQ300295	Johnson ș.a., 2005
89	Bulgaria	Bul#73	vulpe	?	SF	DQ300300	Johnson ș.a., 2005
90	Serbia	RV1162	pisică	1977	SF	JF973779	McElhinney ș.a., 2011
91	Serbia	RV1151	vulpe	1972	SF	JF973775	McElhinney ș.a., 2011
92	Serbia	RV1154	vulpe	1976	SF	JF973776	McElhinney ș.a., 2011
93	Nepal	99001NEP	câine	1998	Arctic	KX148228	Troupin ș.a., 2016
94	Pakistan	Pk23	bovină	2010	Arctic	HE802675	Hussain ș.a., 2014
95	Afganistan	02052	câine	2002	Arctic	KX148225	Troupin ș.a., 2016
96	China	CJS0621D	câine	2006	Asiatic	JQ970481	Tang ș.a., 2014
97	Filipine	04030PHI	câine	2004	Asiatic	KX148260	Troupin ș.a., 2016

*NEE: North-Eastern Europe; D: Centre of the European part of Russia; C: European part of Russia; WE: Western Europe; EE: Eastern Europe; SF: Serbian fox.

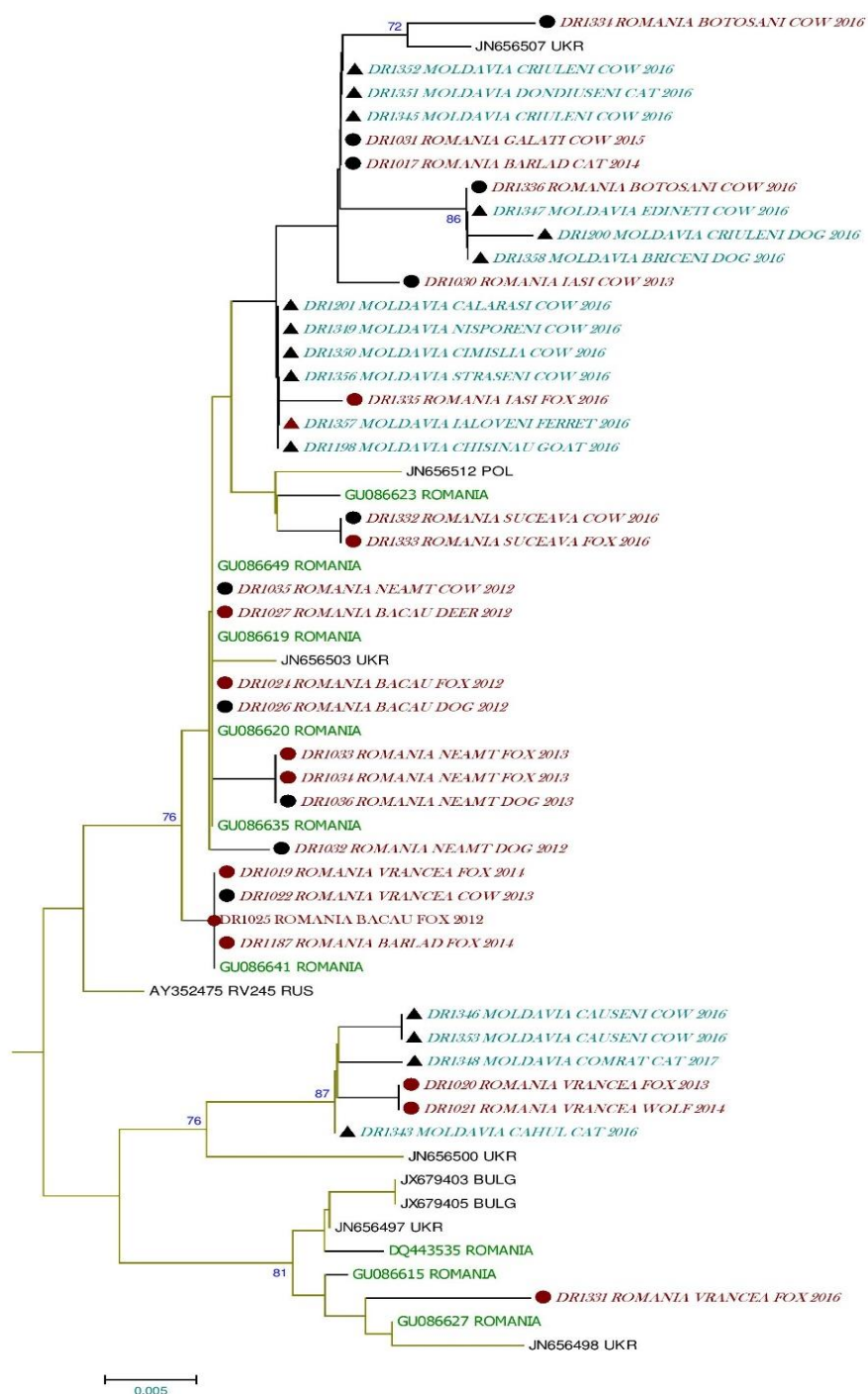


Fig. 8.3 Arbore filogenetic generat pe baza metodei NJ (original) a nucleoproteinei parțială N a virusului rabic. Animalele domestice din România sunt reprezentate cu cercuri negre, iar cele sălbatice cu cercuri roșii. Triunghiurile negre reprezintă animalele domestice din Republica Moldova, pe când triunghiurile roșii, cele sălbatice (original)

Fig. 8.3 Phylogenetic tree generated by NJ programme for the partial N gene. Domestic animals coming from Romania are represented by black circles and the wild ones by red circles. The black triangles represents domestic animals from Moldova and the red ones, wild animals (original)

Pentru gena completă N (1353-pb), au fost obținute 32 de secvențe nucleotidice din ambele țări (Romania n=23, Republica Moldova n=14), fiind comparate ca și în cazul proteinei parțiale N cu secvențe de referință extrase din baza de date internațională GenBank, secvențe reprezentative grupurilor filogenetice D (Rusia n=3), C (Rusia n=3), SF (Serbia n=3), EE (Iugoslavia n=1, Muntenegru n=1, Ungaria n=2, Macedonia n=1, Polonia n=1, Serbia n=1), CE (Polonia n=3), WE (Iugoslavia n=1, Franța n=2), NEE (Estonia n=2, Polonia n=1, Rusia n=2), asiatic (China n=1, Filipine n=1) și arctic (Nepal n=1, Afganistan n=1, Pakistan n=1) (Tabel 8.2).

Tabel 8.2 / Table 8.2

Caracteristicile secvențelor utilizate în studiul epidemiologic molecular pentru gena completă N, fragment de 1353-pb
 Characteristics of rabies viruses used in the molecular epidemiology study for the N gene, fragment of 1353-bp

Nr.	Țara	Regiunea	Nr. izolat	Specia	Anul izolării	Grup filogenetic	Nr. Acces GenBank	Sursa
1	Rusia	Tver	Rus(Tver) 7574f_2008	vulpe	2008	D	KJ958266	Poleshchuk ș.a., 2014
2	Rusia	Tver	Rus(Tver) 7573d_2008	câine	2008	D	KJ958265	Poleshchuk ș.a., 2014
3	Rusia	-	1564NNO	vulpe	2008	D	JQ944708	Chupin ș.a., 2012
4	Rusia	Omsk	Rus(Omsk) 7444f_2008	vulpe	2008	C	KJ958247	Poleshchuk ș.a., 2014
5	Rusia	Voronezh	Rus(Voronezh) 7513f_2008	vulpe	2008	C	KC794010	Poleshchuk ș.a., 2013
6	Rusia	Lipetsk	Rus(Lipetsk) 8064f_2012	vulpe	2012	C	KC538854	Poleshchuk ș.a., 2013
7	Serbia		RV1154	vulpe	1976	SF	JF973776	McElhinney ș.a., 2011
8	Serbia		RV1162	felină	1977	SF	JF973779	McElhinney ș.a., 2011
9	Serbia		RV1151	vulpe	1972	SF	JF973775	McElhinney ș.a., 2011
10	Yugoslavia		86054	lup	1986	EE	KX148145	Troupin ș.a., 2016
11	Muntenegru		RV1268	cal	2000	EE	JF973802	McElhinney ș.a., 2011
12	Ungaria		93080	vulpe	1993	EE	KX148143	Troupin ș.a., 2016
13	Macedonia		DR400	vulpe	2011	EE	JQ973880	Picard ș.a., 2012
14	Polonia		96135	vulpe	1992	EE	KX148141	Troupin ș.a., 2016
15	Ungaria		93091	vulpe	1993	EE	KX148138	Troupin ș.a., 2016
16	Serbia		RV1290	vulpe	1999	EE	JF973807	McElhinney ș.a., 2011
17	Polonia		96045	vulpe	1993	CE	KX148119	Troupin ș.a., 2016
18	Polonia		97046	vulpe	1997	CE	KX148117	Troupin ș.a., 2016
19	Polonia		96256	vulpe	1996	CE	KX148116	Troupin ș.a., 2016
20	Iugoslavia		86111YOU	vulpe	1986	WE	KX148133	Troupin ș.a., 2016
21	Franța		9223	vulpe	1974	WE	U43433	Bourhy ș.a., 1999
22	Franța		8663	vulpe	1984	WE	U42605	Bourhy ș.a., 1999
23	Estonia		9339EST	raton	1991	NEE	U42707	Bourhy ș.a., 1999

Nr.	Țara	Regiunea	Nr. izolat	Specia	Anul izolării	Grup filogenetic	Nr. Acces GenBank	Sursa
24	Estonia		9342EST	raton	1991	NEE	U43432	Bourhy ș.a., 1999
25	Polonia		96097	raton	1996	NEE	KX148153	Troupin ș.a., 2016
26	Romania	Vrancea	DR1331	vulpe	2016	NEE		Acest studiu
27	Romania	Vrancea	DR1020	vulpe	2013	NEE		Acest studiu
28	Republica Moldova	Căușeni	DR1353	bovină	2016	NEE		Acest studiu
29	Republica Moldova	Cahul	DR1343	pisică	2016	NEE		Acest studiu
30	Republica Moldova	Comrat	DR1348	pisică	2017	NEE		Acest studiu
31	Romania	Vrancea	DR1021	lup	2014	NEE		Acest studiu
32	Rusia	VNO?	184VNO	raton	2009	NEE	JQ944704	Chupin ș.a., 2012
33	Rusia	?	RV1596	?	1990	NEE	AY352474	Kuzmin ș.a., 2003
34	Romania	Suceava	DR1333	vulpe	2016	NEE		Acest studiu
35	Romania	Suceava	DR1332	bovină	2016	NEE		Acest studiu
36	Romania	Vrancea	DR1022	bovină	2013	NEE		Acest studiu
37	Romania	Vrancea	DR1019	vulpe	2014	NEE		Acest studiu
38	Romania	Bârlad	DR1187	vulpe	2014	NEE		Acest studiu
39	Romania	Bacău	DR1025	vulpe	2012	NEE		Acest studiu
40	Romania	Bacău	DR1026	câine	2012	NEE		Acest studiu
41	Romania	Bacău	DR1024	vulpe	2012	NEE		Acest studiu
42	Romania	Neamț	DR1032	câine	2012	NEE		Acest studiu
43	Romania	Neamț	DR1036	câine	2013	NEE		Acest studiu
44	Romania	Neamț	DR1034	vulpe	2013	NEE		Acest studiu
45	Romania	Neamț	DR1033	vulpe	2013	NEE		Acest studiu
46	Romania	Neamț	DR1035	bovină	2012	NEE		Acest studiu
47	Romania	Bacău	DR1027	căprior	2012	NEE		Acest studiu
48	Republica Moldova	Edineț	DR1347	bovină	2016	NEE		Acest studiu
49	Republica Moldova	Criuleni	DR1200	câine	2016	NEE		Acest studiu
50	Romania	Botoșani	DR1336	bovină	2016	NEE		Acest studiu
51	Republica Moldova	Dondiușeni	DR1351	pisică	2016	NEE		Acest studiu
52	Republica Moldova	Criuleni	DR1345	bovină	2016	NEE		Acest studiu
53	Republica Moldova	Criuleni	DR1352	bovină	2016	NEE		Acest studiu

Nr.	Țara	Regiunea	Nr. izolat	Specia	Anul izolării	Grup filogenetic	Nr. Acces GenBank	Sursa
54	Romania	Iași	DR1030	bovină	2013	NEE		Acest studiu
55	Romania	Galați	DR1031	bovină	2015	NEE		Acest studiu
56	Romania	Bârlad	DR1017	pisică	2014	NEE		Acest studiu
57	Republica Moldova	Nisporeni	DR1349	bovină	2016	NEE		Acest studiu
58	Republica Moldova	Strășeni	DR1356	bovină	2016	NEE		Acest studiu
59	Republica Moldova	Ialoveni	DR1357	dihor	2016	NEE		Acest studiu
60	Republica Moldova	Chișinău	DR1198	capră	2016	NEE		Acest studiu
61	Republica Moldova	Cimișlia	DR1350	bovină	2016	NEE		Acest studiu
62	Romania	Iași	DR1335	vulpe	2016	NEE		Acest studiu
63	Republica Moldova	Călărași	DR1201	bovină	2016	NEE		Acest studiu
64	Romania	Botoșani	DR1334	bovină	2016	NEE		Acest studiu
65	China		CJS0621D	câine	2006	Asiatic	JQ970481	Tang ș.a., 2014
66	Filipine		04030PHI	câine	2004	Asiatic	KX148260	Troupin ș.a., 2016
67	Nepal		99001	câine	1998	Arctic	KX148228	Troupin ș.a., 2016
68	Afganistan		02052	câine	2002	Arctic	KX148225	Troupin ș.a., 2016
69	Pakistan		Pk 23	bovină	2010	Arctic	HE802675	Hussain ș.a., 2014

* D: Centre of the European part of Russia; C: European part of Russia; SF: Serbian fox; EE: Eastern Europe; CE: Central Europe; WE: Western Europe; NEE: North-Eastern Europe;

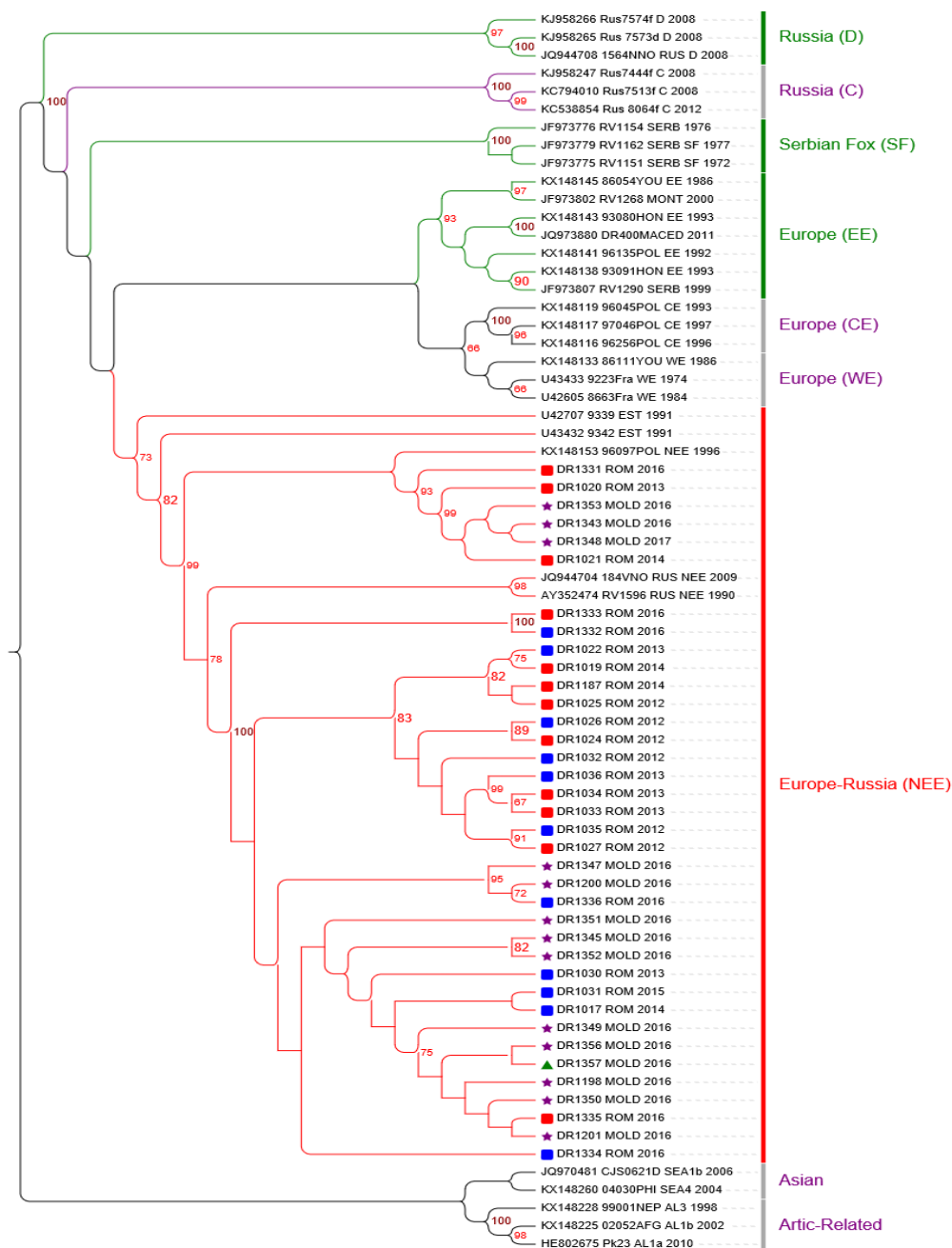


Fig. 8.11 Arbore filogenetic generat pe baza programului PhyML / EvolView pentru gena completă N a virusului rabic (1353-bp). Numerele adiacente ramurilor reprezintă în esență procentele Bootstrap. Probele provenite de la animalele domestice din zona de studiu a României sunt reprezentate cu pătrățele albastre, iar cele de la animalele sălbatice cu pătrățele roșii. Pentru Republica Moldova, animalele domestice sunt reprezentate cu stelute mov, iar cele sălbatice cu triunghi verde (original)

Fig. 8.11 Phylogenetic tree generated by PhyML / Evolview programmes for the full N gene (1353-bp). The branch numbers represent the Bootstrap percentages. The samples coming from domestic animals from the studied area from Romania are represented in blue squares and from wild animals in red squares. For Republic of Moldavia, domestic animals are represented in purple stars and the wild ones in green triangle (original)

În ciuda implementării programelor de vaccinare orală la vulpi, dar și a vaccinării obligatorii la animalele de companie, rabia încă este prezentă pe teritoriul multor țări europene. Cu toate acestea, majoritatea țărilor din Vestul Europei, au reușit eradicarea bolii cu ajutorul unui program strict de vaccinare a vulpilor, a unei gestionări corecte a mișcărilor de animale domestice de pe un teritoriu pe altul și a respectării obligativității vaccinării animalelor de companie.

Realizarea unui studiu epidemiologic molecular ne ajută să înțelegem mai bine distribuția virusului rabic, evoluția acestuia și nu în cele din urmă mecanismele moleculare ale adaptării virale.

Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a realiza o analiză filogenetică cu scopul de a urmări circulația virusului rabic în țara noastră și în Republica Moldova și de a face o comparație cu țările vecine. Gena N a virusului rabic a fost cea aleasă pentru efectuarea analizei filogenetice întrucât a fost demonstrat faptul că, aceasta codifică o proteină internă implicată în reglarea transcripției și replicării, un factor important în adaptarea la specie (Kissi ș.a., 1995, Bourhy ș.a., 1999).

Începând cu anul 1999, la nivel european, au fost descrise 7 grupuri filogenetice ale virusului rabic clasic, și anume: C (European part of Russia), CE (Central Europe), D (Centre of the European part of Russia), EE (Eastern Europe), NEE (North-Eastern Europe), SF (Serbian Fox) și WE (West Europe) (Picard ș.a., 2012). Aceste grupuri dispersate la nivel european pot coexista pe teritoriul unei singure țări și să infecteze o gamă largă de specii de animale.

În urma analizei filogenetice realizate în studiul nostru pe probe provenite din N-E-ul României, dar și din Republica Moldova, s-a arătat apartenența la un singur grup filogenetic, și anume NEE (North-Eastern Europe). Acest grup are o distribuție geografică amplă, fiind identificat de-a lungul anilor în diferite țări precum Polonia, Estonia, Lituania, Bulgaria, estul Slovaciei, Ucraina și Rusia, așa cum a fost demonstrat de către Bourhy ș.a., 1999, Kuzmin ș.a., 2004, McElhinney ș.a., 2006, Picard ș.a., 2012, Robardet ș.a., 2013(b). În aceste țări, izolatele au provenit atât de la vulpi, cât și de la ratoni, ceea ce evidențiază faptul că, ambele specii sunt rezervoare pentru această variantă de virus. În studiul nostru, grupul NEE a fost identificat la toate speciile testate și anume: câine, pisică, bovină, vulpe, lup, căprior și dihor, ceea ce demonstrează faptul că, această variantă se poate adapta la diferite specii de animale.

În România a mai fost realizat un singur studiu de către Turcitu ș.a. în anul 2010 privind caracterizarea moleculară a tulpinilor de virus rabic izolate atât de la animale domestice, cât și de la cele sălbatice, circulante pe teritoriul țării noastre, realizând doar secvențierea parțială a nucleoproteinei. Luând în considerare faptul că, a fost testat un număr mai mare de probe și dintr-un areal mai extins, vizând în cea mai mare parte întreg teritoriul țării (însă doar o mică parte din regiunea Moldovei), pe lângă grupul NEE identificat de către noi în N-E-ul României (dar și în Republica Moldova), au mai fost identificate grupurile D și SF. Grupul D a fost regăsit în județe precum Argeș, Brăila, Cluj, Dâmbovița, Giurgiu, Gorj, Harghita, Mureș, Satu-Mare și Neamț, iar cel din urmă grup doar în cazul unei probe din Mehedinți.

Până în prezent, la noi în țară nu a mai fost realizată secvențierea completă a nucleoproteinei virusului rabic, implicând o analiză filogenetică aferentă, acestea fiind primele date raportate până în prezent. Referitor la rezultatele obținute pentru probele luate în studiu din Republica Moldova, acestea sunt singulare, până în momentul de față nefiind realizată nici o secvențiere a nucleoproteinei parțiale și complete N, respectiv o analiză filogenetică, necunoscându-se până în prezent ce variante ale virusului rabic circulă pe teritoriul acestei țări.

În efectuarea acestei analize filogenetice, majoritatea probelor din zona de studiu a României au provenit de la animalele sălbatice, pe când cele din țara vecină de la animalele domestice. Astfel, pentru țara noastră au fost testate 24 de probe provenite de la animale sălbatice și 14 de la cele domestice, pe când în țara vecină, ponderea cea mai mare de probe a fost cea de la animalele domestice cu un total de 19 probe și doar 2 de la cele sălbatice.

Studiul epidemiologic realizat în perioada 2010-2016 ce a vizat Republica Moldova a arătat o incidență crescută a cazurilor de rabie la animalele domestice, cea întâlnită la animalele sălbatice fiind cu mult inferioară, acest trend fiind observat și în alte țări, precum Ucraina, Rusia și Turcia (Picard ș.a., 2012).

Țările de graniță joacă un rol important în circulația diferitelor grupuri filogenetice. Întreaga frontieră dintre țara noastră și Moldova este în exclusivitate fluvială cu o lungime de 681,3 km, cele două fiind despărțite de râul Prut. Cu toate că, apa este considerată o barieră naturală, aceasta nu este însă una absolută, ea limitând circulația animalelor infectate dintr-o regiune în alta și respectiv a distribuției bolii, în acest mod zonele geografice fiind caracteristice unor anumite variante de virus rabic circulante. Trebuie luat însă în considerare faptul că, astfel de granițe, pot permite circulația animalelor pe timp de iarnă, de exemplu, când apa îngheață, ducând astfel la răspândirea bolii și implicând la extinderea variantelor de virus rabic dintr-o zonă geografică în alta.

Întrucât atât țara noastră, cât și Republica Moldova sunt înconjurate de țări unde rabia încă este prezentă, este importantă și cunoașterea celorlalte variante care se regăsesc pe teritoriul țărilor vecine, cu scopul de a urmări circulația și distribuția acestora.

Cu toate că, Rusia nu împarte graniță cu zonele noastre de studiu, grupurile filogenetice prezente în această țară se pot dispersa către restul țărilor vecine. Astfel, conform ultimului studiu ce a vizat Rusia publicat de către Deviatkin ș.a. în anul 2016, acesta a identificat două linii majore ale virusului rabic, și anume cea arctică (care reprezintă de fapt vechile grupuri A și B) și cea cosmopolită (care cuprinde grupurile C, D, E și F).

În ceea ce privește Ucraina, au fost identificate până în prezent două grupuri filogenetice ale virusului rabic clasic, și anume C și NEE, conform unui studiu realizat de către Picard ș.a. în anul 2012. Primul dintre acestea a fost izolat cu precădere în partea de est a țării, dincolo de fluviul Nipru, considerat o barieră naturală în limitarea, chiar stoparea circulației rezervoarelor de rabie, pe când grupul NEE a avut o rată de distribuție mai largă și foarte important de precizat de jur împrejurul Republicii Moldova, ceea ce poate explica pe de o parte, existența acestui grup în analiza filogenetică obținută în studiul nostru.

Bulgaria și România împart o graniță cu o lungime de 631,3 km, dintre care 470 km reprezintă o frontieră fluvială, 22,2 km una maritimă, iar restul de 139,1 km una terestră. Un studiu recent realizat de către Robardet ș.a., 2013(b), a scos în evidență 3 grupuri filogenetice

ce se regăsesc pe teritoriul acestei țări, și anume: D, EE și NEE. Întrucât grupurile D și NEE au fost de asemenea identificate pe teritoriul țării noastre în studiul realizat de către Turcitu ș.a. în anul 2010, prezența acestora în partea de N-V a Bulgariei poate fi datorată circulației animalelor infectate, fie prin intermediul frontierei terestre (130 km), fie prin intermediul podurilor, barajelor sau al altor infrastructuri, animale ce pot proveni din țara noastră sau cele care o tranzitează din Ucraina sau Republica Moldova.

România se învecinează la sud-vest cu Serbia, însumând o frontieră de 543,4 km, dintre care 256,8 reprezintă frontiera terestră, iar ceilalți 289,6, fluvială, fiind așadar o barieră naturală. Până în momentul de față, în Serbia au fost identificate 2 grupuri filogenetice, și anume SF și EE, astfel explicându-se prezența acestora și în țara noastră.

Țara noastră dispune de un program strategic privind supravegherea și controlul rabiei la vulpi încă din anul 2011, efectuându-se o distribuție bianuală a vaccinurilor orale, înregistrându-se o scădere substanțială a cazurilor pozitive de rabie înregistrate la vulpi (rezervorul silvatic), dar și în cazul animalelor domestice. Efectuarea în continuare cu strictețe al acestui program împreună cu respectarea vaccinării obligatorii ale animalelor de companie, pot duce în timp la eradicarea rabiei în România.

Din nefericire, Republica Moldova încă nu dispune de un astfel de program, până în prezent nefiind realizată vaccinarea orală a vulpilor. O astfel de măsură este primordială în reducerea numărului de cazuri.

De-a lungul timpului, virusul rabiic a demonstrat o adaptabilitate de zonă geografică și specie foarte mare, singura modalitate de stopare a difuzibilității virusului dintr-o regiune la alta fiind implementarea în continuare a programelor strategice de vaccinare orală la vulpi și implicit vaccinarea obligatorie a animalelor de companie.

8.3 CONCLUZII PARȚIALE

Secvențierea parțială și completă a nucleoproteinei virusului rabiic a fost realizată pentru prima dată pe probe provenite atât de la animale domestice, cât și sălbatice din Republica Moldova, semnalându-se primul grup filogenetic identificat pe teritoriul acestei țări.

În ceea ce privește analiza filogenetică realizată pentru partea de nord-est a țării noastre, a fost identificat grupul filogenetic NEE, fiind semnalată pentru prima dată prezența acestuia în județele Botoșani, Iași, Vaslui, Galați și Vrancea.

Secvențierea completă a nucleoproteinei a fost pentru prima dată realizată pe probe provenite din zonele noastre de studiu, nefiind înregistrate secvențe complete în GenBank până în prezent.

CAPITOLUL IX

SECVENȚIEREA COMPLETĂ A GENOMULUI VIRUSULUI RABIC

CHAPTER IX

THE COMPLETE SEQUENCING OF RABIES VIRUS FULL GENOME

De la publicarea primei secvențe complete a genomului virusului rabic clasic RABV în anul 1988 (Tordo ș.a., 1988) până la completarea acestuia cu alte 11 specii de virus rabic în anul 2010 (LBV, MOKV, DUVV, EBLV-1, EBLV-2, ABLV, ARAV, KHUV, IRKV, WCBV și SHIBV), metodologia implementată în obținerea întregului genom a fost relativ neschimbată, utilizând transcripția inversă, clonarea ADNc sau a produșilor PCR amplificați, respectiv secvențierea Sanger (Delmas ș.a., 2008; Kuzmin ș.a., 2008; Marston ș.a., 2013).

Odată cu apariția tehnologiilor de secvențiere de nouă generație (NGS), capacitatea de a genera mari cantități de date secvențiale a revoluționat domeniul genomicii. Utilizarea acestora a devenit din ce în ce mai comună pe plan mondial, oferind numeroase avantaje, de la rapiditate, costuri reduse până la acuratețe și utilizarea unor cantități mici de acizi nucleici (Marston ș.a., 2013).

Datorită abundenței relativ scăzute a ARN-ului viral în raport cu cel al gazdei, virusurile ARN s-au dovedit a fi relativ dificile de secvențiat prin intermediul tehnologiei NGS (Marston ș.a., 2013).

Istoria evolutivă a rhabdovirusurilor a fost puternic influențată de modul de transmitere, specia gazdă și vector (Bourhy ș.a., 2005). Caracterizarea întregului genom a virusului rabic ne poate ajuta și orienta către o mai bună înțelegere a diversității lyssavirusurilor, dar și în investigarea amănunțită a imunității și protecției induse de către vaccinare (Marston ș.a., 2012). Aplicarea secvențierii de nouă generație în studiul virusurilor va conduce către o nouă eră a descoperirii și caracterizării acestora, revoluționând studiile filogeografice în domeniul virologiei.

Scopul acestor cercetări a fost de a realiza secvențierea de nouă generație pe un număr selectiv de probe în vederea identificării existenței unor posibile modificări de patogenitate la nivel de specie animală, dar și pentru o mai bună înțelegere a diversității lyssavirusurilor.

9.1 MATERIALE ȘI METODE

Probe luate în studiu

În vederea efectuării secvențierii de nouă generație a genomului virusului rabic, au fost selectate 23 de probe atât din nord-estul României, cât și din Republica Moldova. Acestea au fost izolate în perioada 2012-2017 de la 9 vulpi (*Vulpes vulpes*), 5 bovine (*Bos taurus*), 3 pisici (*Felix catus*), 3 câini (*Canis canis*), 1 capră (*Capra aegragus hircus*), 1 căprior (*Capreolus capreolus*) și 1 lup (*Canis lupus*) (Tabel 9.1).

Probe selectate în vederea efectuării secvențierii de nouă generație
The selected samples for next generation sequencing

Nr.	Cod probă	Tara	Oraș	Anul izolării	Specia
1	DR 1017	România	Bârlad	2014	Pisică
2	DR 1018	România	Vrancea	2015	Vulpe
3	DR 1024	România	Bacău	2012	Vulpe
4	DR 1025	România	Bacău	2012	Vulpe
5	DR 1026	România	Bacău	2012	Câine
6	DR 1027	România	Bacău	2012	Căprior
7	DR 1031	România	Galați	2015	Bovină
8	DR 1034	România	Neamț	2013	Vulpe
9	DR 1035	România	Neamț	2012	Bovină
10	DR 1036	România	Neamț	2013	Câine
11	DR 1187	România	Bârlad	2014	Vulpe
12	DR 1198	Republica Moldova	Chișinău	2016	Capră
13	DR 1331	România	Vrancea	2016	Vulpe
14	DR 1333	România	Suceava	2016	Vulpe
15	DR 1335	România	Iași	2016	Vulpe
16	DR1345	Republica Moldova	Criuleni	2016	Bovină
17	DR1348	Republica Moldova	Comrat	2017	Pisică
18	DR1349	Republica Moldova	Nisporeni	2016	Bovină
19	DR1350	Republica Moldova	Cimișlia	2016	Bovină
20	DR1351	Republica Moldova	Dondiușeni	2016	Pisică
21	DR1019	România	Vrancea	2014	Vulpe
22	DR1021	România	Vrancea	2014	Lup
23	DR1200	Republica Moldova	Criuleni	2016	Câine

Materiale și echipamente: kit-ul de extracție ARN „*Nucleo Spin RNA Virus*” (Macherey-Nagel, Germania), „*Rnase-Free DNase Set*” (Qiagen, Germania), kit de purificare ARN „*RNeasy Mini Kit*” (Qiagen, Germania); centrifuga *Eppendorf 5427 R*, termostatul *Eppendorf ThermoStat Plus*, ciclor Rotor Gene Q (Qiagen, Germania), spectrofotometrele Qubit (Invitrogen) și NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), kit-ul Qubit RNA Assay (Invitrogen), consumabile aferente.

Etapele pregătirii probelor pentru NGS

Înainte de secvențierii propriu-zise a probelor în cadrul laboratorului ANSES Ploufragan, respectiv Helixio din Franța, au fost realizate următoarele etape: extracția ARN-ului viral, digestia DN-azelor și purificarea ARN-ului, dozarea acizilor nucleici, amplificarea și cuantificarea acizilor nucleici prin intermediul tehnicii *One step SYBRGreen Real time RT-PCR*, respectiv amplificarea parțială și completă a nucleoproteinei virusului rabic utilizând un *Heminested RT-PCR convențional*.

Extracția ARN-ului viral

Aceasta a fost realizată cu ajutorul kit-ului *NucleoSpin^R RNA Virus* în 2 săli diferite, și anume în sala de biologie moleculară din cadrul laboratorului de nivel 3 și în sala de extracție ARN situată în afara acestuia. În prima sală a fost efectuată suspensia virală, etapele fiind următoarele:

- ✓ decongelarea probelor de testat; realizarea unei diluții de 1/5 a probei (1 gram de creier și 4 ml de TFS), urmată de omogenizarea acestuia și centrifugarea timp de 15 minute la 3000 rpm;
- ✓ transferarea supernatantului obținut după centrifugare într-un alt flacon pentru a minimiza riscurile de contaminare;
- ✓ pregătirea pentru fiecare probă în parte a câte 10 tuburi cu 600 μl de RAV1 (soluție de liză reconstituită anterior), în fiecare dintre acestea fiind adăugați câte 150 μl supernatant, obținând o cantitate finală de 750 μl;
- ✓ depozitarea tuburilor într-o pungă închisă etanș și transferarea acestora în sala de extracție situată în afara zonei 3.

În cea de-a doua sală a fost realizată extracția propriu-zisă, fiind realizate următoarele

etape:

- ✓ centrifugarea celor 10 tuburi/probă realizate anterior și introducerea acestora timp de 5 minute la 70°C la aparatul *Eppendorf ThermoStat Plus*, alături de H₂O, care va fi lăsată în aparat până la utilizarea ei în reacție;
- ✓ adăugarea în fiecare tub a câte 600 μl de etanol 96% sub hota de protecție, obținând o cantitate de 1350 μl;
- ✓ pregătirea coloanelor furnizate în kit și transferarea în 2 ture a celor 1350 μl, urmată de centrifugarea acestora timp de 1 minut la 8000 rpm și schimbarea tuburilor colectoare;
- ✓ adăugarea în fiecare tub a câte 500 μl soluție de spălare RAW, urmată de centrifugare timp de 1 minut la 8000 rpm și schimbarea tubului colector;
- ✓ adăugarea în fiecare tub a câte 600 μl de RAV3, urmată de centrifugare timp 1 minut la 8000 rpm și schimbarea tubului colector;
- ✓ o a doua adăugare a RAV3, în cantitate de 200 μl/tub, centrifugarea acestora 5 minute la 11.000 rpm și schimbarea tubului colector;
- ✓ introducerea coloanelor în tuburi eppendorf de 1,5 ml și adăugarea a câte 50 μl H₂O păstrată la temperatura de 70°C, închiderea capacelor și incubarea acestora la temperatura camerei timp de 2 minute;
- ✓ o ultimă centrifugare timp de 1 minut la 11.000 rpm, aruncarea coloanelor și păstrarea tuburilor eppendorf, toată cantitatea obținută (400 μl) fiind depozitată într-un singur tub și păstrată la -80°C până la utilizare.

Digestia DN-azelor, cea de a doua etapă a pregătirii probelor pentru NGS a fost realizată cu ajutorul kit-ului „*RNase-Free DNase*” cu scopul de a obține ARN de înaltă calitate liber de ADN, înaintea purificării acestuia. În compoziția kit-ului se regăsesc soluția RDD și enzima liofilizată DNase, cea din urmă fiind reconstituită în 550 μl H₂O. Fiecare din cele 23 de probe au fost lucrate la dublu. Astfel, pentru fiecare probă în parte au fost adăugați într-un tub eppendorf 87,5 μl ARN, 10 μl soluție RDD și 2,5 μl enzima DNase, acestea fiind mai departe incubate la temperatura camerei (20-25°C) timp de 10 minute, pasul următor constând în purificarea ARN-ului viral.

Purificarea ARN-ului viral a fost realizată cu ajutorul kit-ului „*RNeasy Mini Kit*” fiind realizate următoarele etape:

- adăugarea peste mix-ul din cea de a doua etapă (digestie Dnaze) a câte 350 µl soluție RLT, urmată de vortexarea și centrifugarea ușoară a acestora;
- adăugarea a câte 250 µl etanol pur/tub; transferarea conținutului prin pipetare în coloane furnizate în kit (~700 µl); centrifugarea timp de 15 secunde la 8000 rpm, schimbarea tuburilor colectoare;
- adăugarea a câte 500 µl RPE/tub, centrifugarea timp de 15 secunde la 8000 rpm, schimbarea tuburilor colectoare; o a doua adăugare de RPE (500 µl), centrifugare timp de 2 minute la 8000 rpm, schimbarea tuburilor colectoare și o nouă centrifugare timp de 1 minut la viteza maximă (19.090 rpm);
- aruncarea tuburilor colectoare și amplasarea coloanelor în tuburi eppendorf de 1,5 ml;
- adăugarea a câte 50 µl H₂O / tub, centrifugare timp de 1 minut la 8000 rpm, urmată de o recentrifugare prin trecerea conținutului din tubul eppendorf în coloană;
- o ultimă centrifugare timp de 1 minut la 8000 rpm și depozitarea întregii cantități într-un singur tub, acesta fiind păstrat la -80°C până la utilizare.

Cuantificarea acizilor nucleici prin intermediul tehnicii *One step SYBRGreen Real time RT-PCR*, respectiv amplificarea parțială și completă a nucleoproteinei virusului rabic utilizând un *Heminested RT-PCR convențional* au fost realizate conform procedurilor descrise în amănunt în capitolul VII.

După finalizarea extracțiilor ARN, acestea au fost dozate prin intermediul metodei spectrofotometrice *Qubit*, rezultatele fiind exprimate în ng/µl (conform tehnicii descrise în capitolul VII), iar după finalizarea tehnicilor de biologie moleculară, prin metoda spectrofotometrică *Nanodrop*, fiind evaluate valorile DO260, DO280 și raportul DO260/DO280.

9.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

În cadrul rezultatelor obținute la amplificarea și cuantificarea acizilor nucleici prin intermediul tehnicii *SYBRGreen real time RT-PCR*, toate probele selectate în vederea efectuării NGS-ului au fost pozitive. Astfel, valorile Ct obținute au variat între 10,22-16,87, iar deviația standard între 0,01-0,28. Referitor la amplificarea parțială a nucleoproteinei virusului rabic prin tehnica *Heminested RT-PCR convențional*, utilizând primeri specifici virusului rabic (descriși pe larg în capitolul VII), toate probelor au fost pozitive. În cazul nucleoproteinei totale, a fost identificată o probă negativă (DR1018), dar cu toate acestea a fost supusă secvențierii de nouă generație.

În ceea ce privește dozarea acizilor nucleici prin intermediul metodei spectrofotometrice *Qubit*, valorile au fost cuprinse între 22,2-190 ng/µl, încadrându-se cerințelor minime de 15 ng/µl, necesare secvențierii ulterioare. Dozarea acizilor nucleici utilizând metoda spectrofotometrică a fost realizată și cu ajutorul aparatului *Nanodrop*, fiind evaluate următoarele valori: DO260, DO280 și raportul DO260/280.

Raportul DO260/280 este de regulă utilizat pentru a evalua puritatea și calitatea ARN-ului viral, fiind dependent într-o oarecare măsură și de pH-ul soluției tampon utilizate pentru efectuarea măsurătorilor, o valoare de ~2 fiind acceptată ca „pură” pentru ARN. Soluțiile acide pot influența valorile acestui raport prin adăugarea unei valori suplimentare de 0,2-0,3, pe când

o soluție alcalină poate avea un efect opus. În cazul obținerii de valori inferioare, acestea ne pot indica prezența unor proteine, fenoli sau de alți contaminanți care absorb puternic la 280 nm. În cazul probelor noastre, acest raport a avut o valoare aproximativă de 2, fiind acceptată ca „pură” pentru ARN.

NGS a fost realizată de către laboratoarele Ploufragan, respectiv Helixio din Franța utilizând platforma *Génomique* a laboratorului ANSES-Ploufragan din Franța, secvențiatorul *Proton* (Life Technologies).

Secvențierea de ultimă generație, cât și analizele bioinformatiche au fost efectuate de către echipa de bioinformaticieni ai platformei naționale franceze *Génomique* (ANSES-Ploufragan), furnizând de asemenea și secvențele *consensus* pentru realizarea studiului. Fiecare secvență *consensus* a fost verificată cu ajutorul soft-ului IGV V2.3.97 și vizualizate alinierea de contig-uri înainte de a genera secvența în cauză. Acestea au fost mai departe analizate (nucleotidele și aminoacizii) cu ajutorul soft-ului *BioEdit*, iar alinierea secvențelor a fost realizată prin intermediul programului *MEGA6*.

Din totalul celor 23 de probe selectate pentru NGS, 4 dintre acestea (DR1345, DR1348-DR1350) nu au putut fi secvențiate complet, datorită degradării structurii ARN-ului viral, respectiv a unei cantități insuficiente de ARN, iar pentru 6 dintre acestea (DR1018, DR1034, DR1035, DR1036, DR1187, DR1331) a fost realizată o secvențiere parțială a genomului virusului rabic (Tabel 9.2). Consecutiv amplificării, a fost obținut un fragment de 1353-pb pentru gena N, un fragment de 894-pb pentru gena P, un fragment de 609-pb pentru gena M, un fragment de 1575-pb pentru gena G și un fragment de 6384-pb pentru gena L.

Analiza similarităților secvențelor nucleotidice și ale aminoacizilor ale celor 5 gene ale virusului rabic au înregistrat următoarele procentaje de similarități: gena N 96-100%, gena P 96-100%, gena M 96-100%, gena G 97-100%, iar gena L 97-99%. Alinierea, analiza și evaluarea similarităților aminoacizilor genelor virusului rabic au fost realizate prin intermediul programelor *GraphicView* și *Sequence Identity Matrix* în cazul a 15 probe.

Alinierea, analiza și evaluarea similarității aminoacizilor genei N a virusului rabic. În urma analizelor celor 450 secvențe de aminoacizi pentru gena N a celor 15 probe (DR1017, DR1019, DR1021, DR1024-DR1027, DR1031, DR1036, DR1198, DR1200, DR1331, DR1333, DR1335, DR1351) au fost identificate următoarele modificări în pozițiile acestora: proba DR1036 la pozițiile 66, 322 și 329, proba DR1331 la pozițiile 111, 183 și 379, proba DR1027 la poziția 189 și proba DR1333 la poziția 332. Procentele de similaritate ale aminoacizilor au fost cuprinse între 98-100%, 6 dintre probe înregistrând un procentaj maxim, și anume: DR1019, DR1024, DR1025, DR1026, DR1335 și DR1198 (Fig. 9.1). În cadrul genului *Lyssavirus*, stabilirea și încadrarea de noi genotipuri a fost realizată de-a lungul timpului pe baza procentelor de similaritate a nucleoproteinei N a virusului rabic (Bourhy ș.a., 1993; Arai ș.a., 2003; Kuzmin ș.a., 2003). De asemenea, gena N este preferată pentru efectuarea analizelor filogenetice, întrucât a fost demonstrat faptul că, aceasta codifică o proteină internă implicată în reglarea transcripției și replicării, un factor important în adaptarea la specie (Kissi ș.a., 1995; Bourhy ș.a., 1999).

Tabel 9.2 / Table 9.2

Rezultatele probelor supuse secvențierii de nouă generație / The samples results obtained for NGS

Nr	Cod probă	QUBIT (ng/μl)	Nanodrop				SYBR Green RT-PCR		RT-PCR convențional		Gena (pb)					Full genom (pb)
			DO260	DO280	DO260/280	ng/μl	<Ct	*DS	N606-pb	N1500-pb	N	P	M	G	L	
1	DR 1017	53,7	0,719	0,283	>2	288	14,22	0,11	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11801
2	DR 1018	95,9	0,775	0,313	>2	310	15,8	0,03	Pozitiv	Negativ	1353	894	609	1575	6384	11765
3	DR 1024	49,5	0,531	0,214	>2	212	14,05	0,12	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11923
4	DR 1025	74	0,642	0,262	>2	257	13,57	0,08	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11910
5	DR 1026	82	0,65	0,259	>2	260	13,05	0,01	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11801
6	DR 1027	26,1	0,446	0,159	>2	178	14,37	0,06	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11801
7	DR 1031	28,2	0,516	0,194	>2	205	16,71	0,01	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	-	-	6384	11923
8	DR 1034	31,3	0,773	0,285	>2	309	14,7	0,02	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11918
9	DR 1035	37,1	0,52	0,195	>2	208	14,86	0,02	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	-	6384	11923
10	DR 1036	37,7	0,531	0,188	>2	212	16,87	0,11	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11801
11	DR 1187	37,5	0,438	0,183	>2	175	15,46	0,17	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11801
12	DR 1198	22,2	0,525	0,19	>2	210	10,22	0,05	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11923
13	DR 1331	63,3	0,528	0,208	>2	211	14,21	0,07	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11797
14	DR 1333	72,5	0,739	0,299	>2	295	16,34	0,12	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11902
15	DR 1335	50,8	0,461	0,181	>2	184	14,33	0,08	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11902
16	DR1345	27,6	0,21	0,1	>2	83	16,83	0,2	Pozitiv	Pozitiv	-	-	-	-	-	-
17	DR1348	160	0,56	0,24	>2	226	16,36	0,15	Pozitiv	Pozitiv	-	-	-	-	-	-
18	DR1349	42,1	0,58	0,22	>2	234	16,33	0,01	Pozitiv	Pozitiv	-	-	-	-	-	-
19	DR1350	37,1	0,22	0,1	>2	90	15,96	0,22	Pozitiv	Pozitiv	-	-	-	-	-	-
20	DR1351	190	1	0,44	>2	399	12,63	0,28	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11801
21	DR1019	-	-	-	>2	-	-	-	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11910
22	DR1021	-	-	-	>2	-	-	-	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11915
23	DR1200	-	-	-	>2	-	-	-	Pozitiv	Pozitiv	1353	894	609	1575	6384	11916

*DS: deviația standard

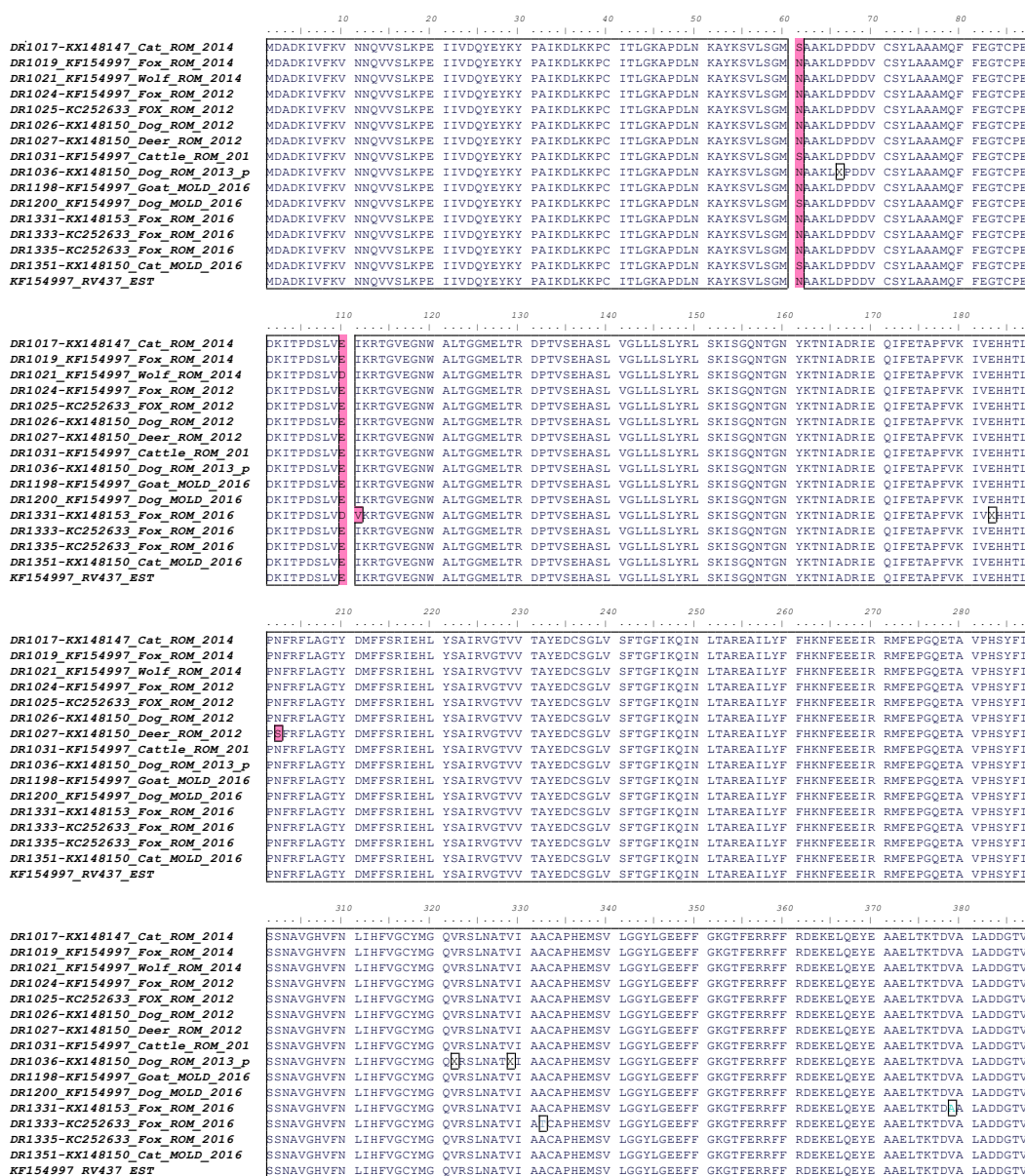


Fig. 9.1 Alinierea aminoacizilor genei N a virusului rabic pentru cele 15 probe prin intermediul programului GraphicView (original)

Fig. 9.1 Alignment of the rabies virus N gene amino acids for the 15 samples by GraphicView programme (original)

Alinierea, analiza și evaluarea similarității aminoacizilor genei P a virusului rabic.

Pentru gena P au fost obținuți 287 de aminoacizi în cadrul celor 15 probe (idem gena N) cu următoarele modificări în pozițiile acestora: proba DR1036 la pozițiile 34 și 259, proba DR1351 la poziția 72, proba DR1017 la poziția 107, proba DR1019 la poziția 168, proba DR1021 la pozițiile 138,140 și 248, proba DR1198 la poziția 173, proba DR1333 la poziția 165, proba DR1335 la poziția 141 și proba DR1331 la poziția 239. Procentele de similaritate ale aminoacizilor au fost cuprinse între 97-98% (Fig. 9.2).

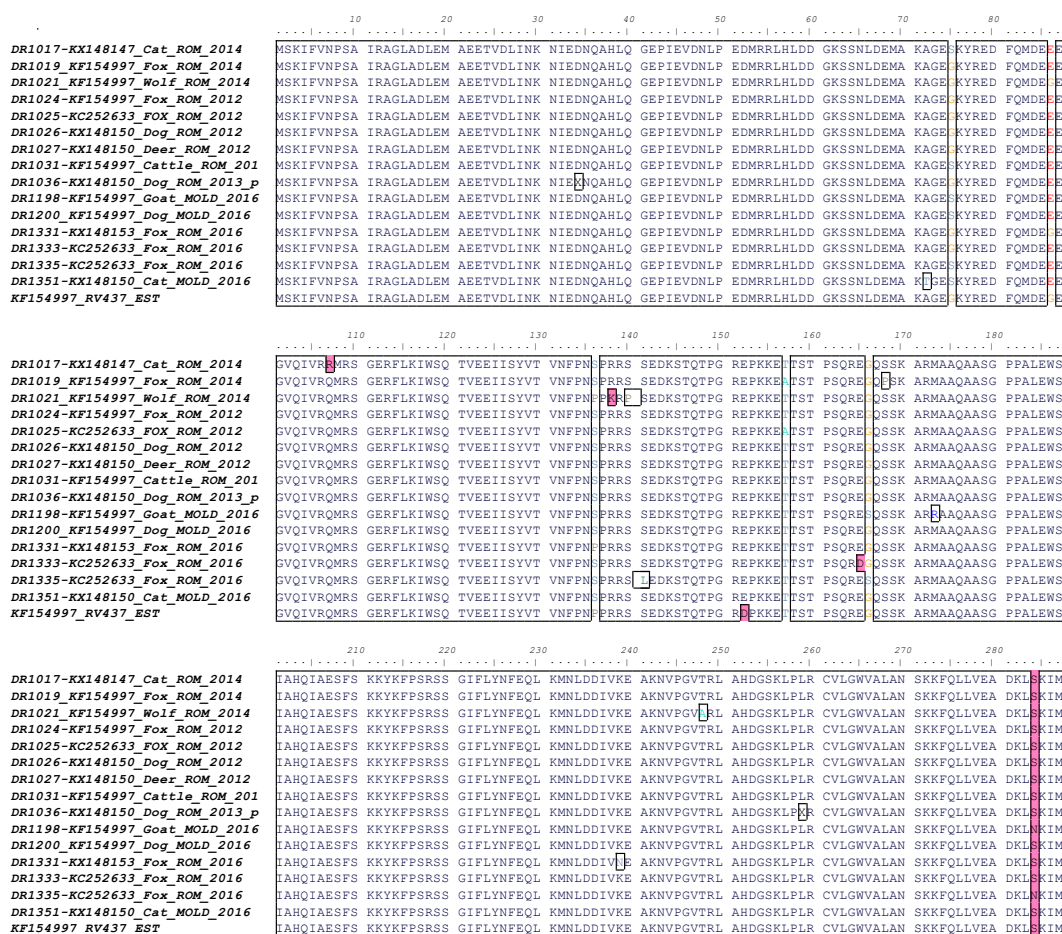


Fig.

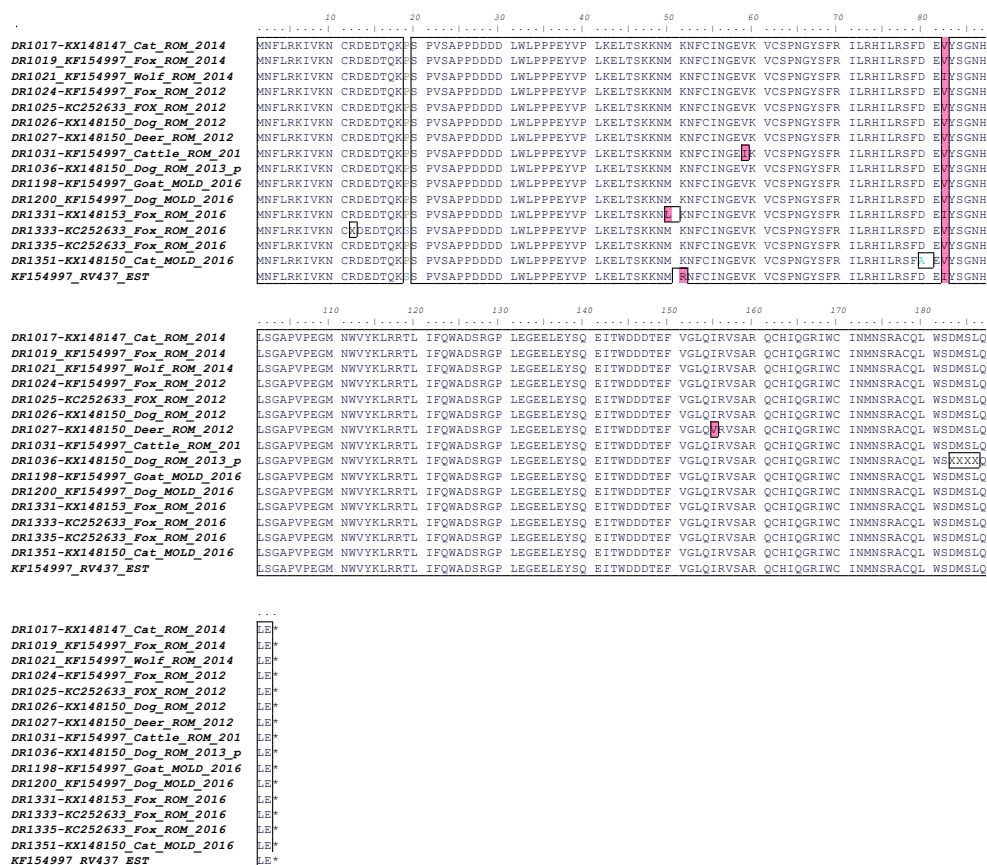
9.2 Alinierea aminoacizilor genei P a virusului rabic pentru cele 15 probe prin intermediul programului GraphicView (original)

Fig. 9.2 Alignment of the rabies virus P gene amino acids for the 15 samples by GraphicView programme (original)

Alinierea, analiza și evaluarea similarității aminoacizilor genei M a virusului rabic

Pentru gena M, au fost analizate 14 probe (cu excepția DR1036), cu una mai puțin decât în cazul genelor anterioare, fiind obținuți 189 de aminoacizi, cu următoarele modificări în pozițiile acestora: proba DR1031 la poziția 59, proba DR1331 la poziția 50, proba DR1333 la poziția 12, proba DR1351 la poziția 80, proba DR1027 la poziția 155 și proba DR1036 la pozițiile 183,

184, 185 și 186. Procentele de similaritate ale aminoacizilor au fost cuprinse între 98-99% (Fig. 9.3).



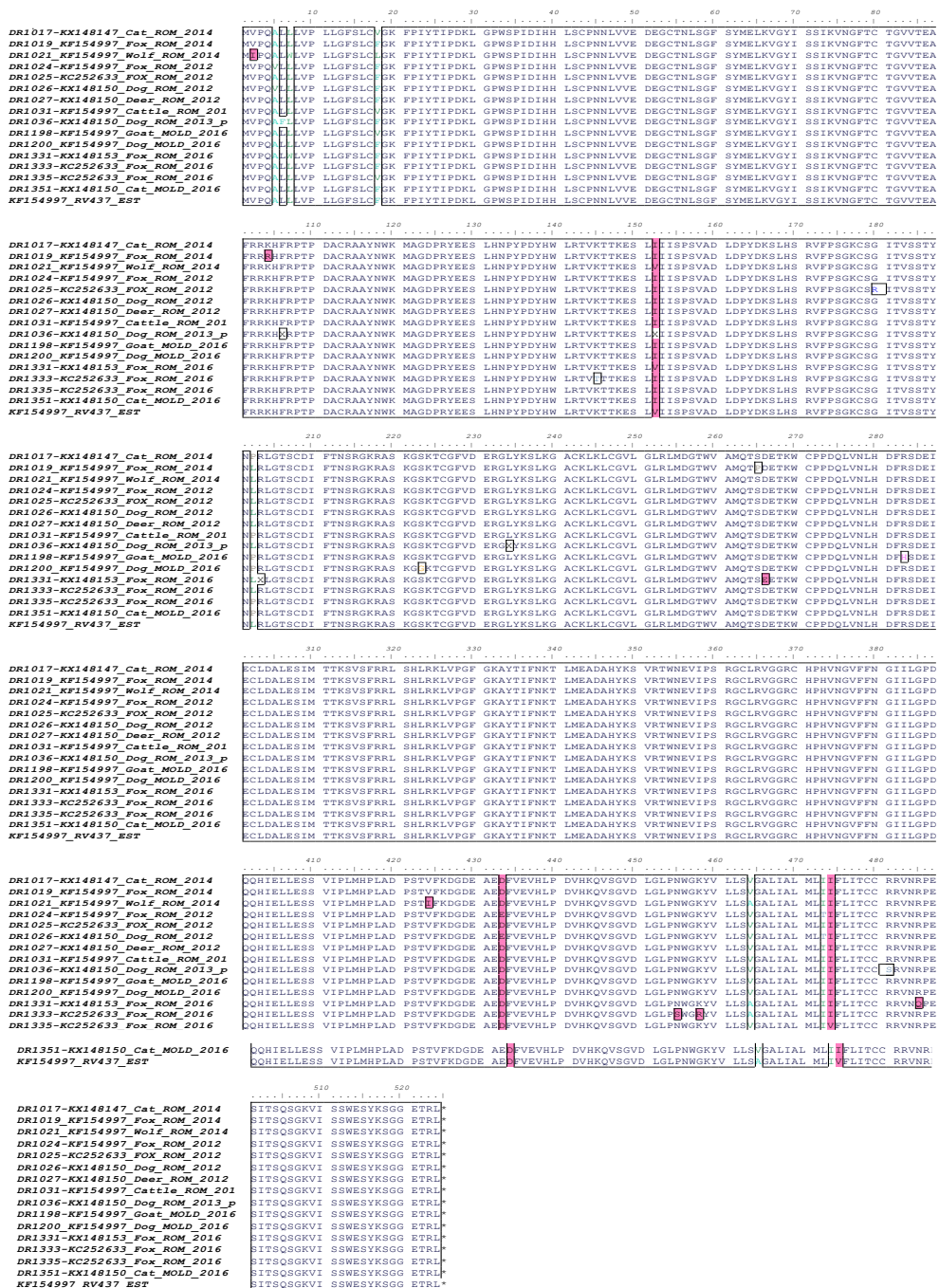
9.3 Alinierea aminoacizilor genei M a virusului rabic pentru cele 14 probe prin intermediul programului GraphicView (original)

Fig. 9.3 Alignment of the rabies virus M gene amino acids for the 14 samples by GraphicView programme (original)

Alinierea, analiza și evaluarea similarității aminoacizilor genei G a virusului rabic. În cazul genei G, au fost obținuți 524 de aminoacizi pentru cele 15 probe (idem gena N), fiind identificate următoarele modificări în pozițiile acestora: proba DR1021 la pozițiile 2 și 424, proba DR1019 la pozițiile 104 și 265, proba DR1025 la poziția 180, proba DR1036 la pozițiile 106, 235 și 481, proba DR1333 la pozițiile 145, 455 și 458, proba DR1198 la poziția 283, proba DR1200 la poziția 223 și proba DR1331 la pozițiile 202, 266 și 485. Procentele de similaritate ale aminoacizilor au fost cuprinse între 98-99% (Fig. 9.4). Este cunoscut faptul că, această genă este implicată în tropism și patogenitate și induce un răspuns imun complet, fiind și singura proteină externă a virionului (Dietzschold ș.a., 1983; Prehaud ș.a., 1988; Badrane ș.a., 2001).

Caracteristicile antigenice ale acestei gene au fost studiate utilizând mutanți rezistenți la anticorpii monoclonali neutralizanți, fiind distinse 2 mari site-uri, unul recunoscut în proporție de 70% (situl II) de anticorpii monoclonali (Lafon ș.a., 1983) și altul recunoscut în proporție de 20% (situl III). Situl III se extinde de regulă de la aminoacizii în poziția 330 la 340, anumiți mutanți în acest site pierzându-și virulența la șoareci, vulpi și rozătoare. Investigații

ulterioare care au localizat aceste mutații la aminoacidul din poziția 333 arginina, cu înlocuirea de către glutamină, glicină și izoleucină, duc la pierderea capacității virusului de a penetra terminațiile nervoase oculare parasimpatice, în același timp păstrându-și capacitatea de a pătrunde în terminațiile trigeminale (Seif ș.a., 1985; Prehaud ș.a., 1988).

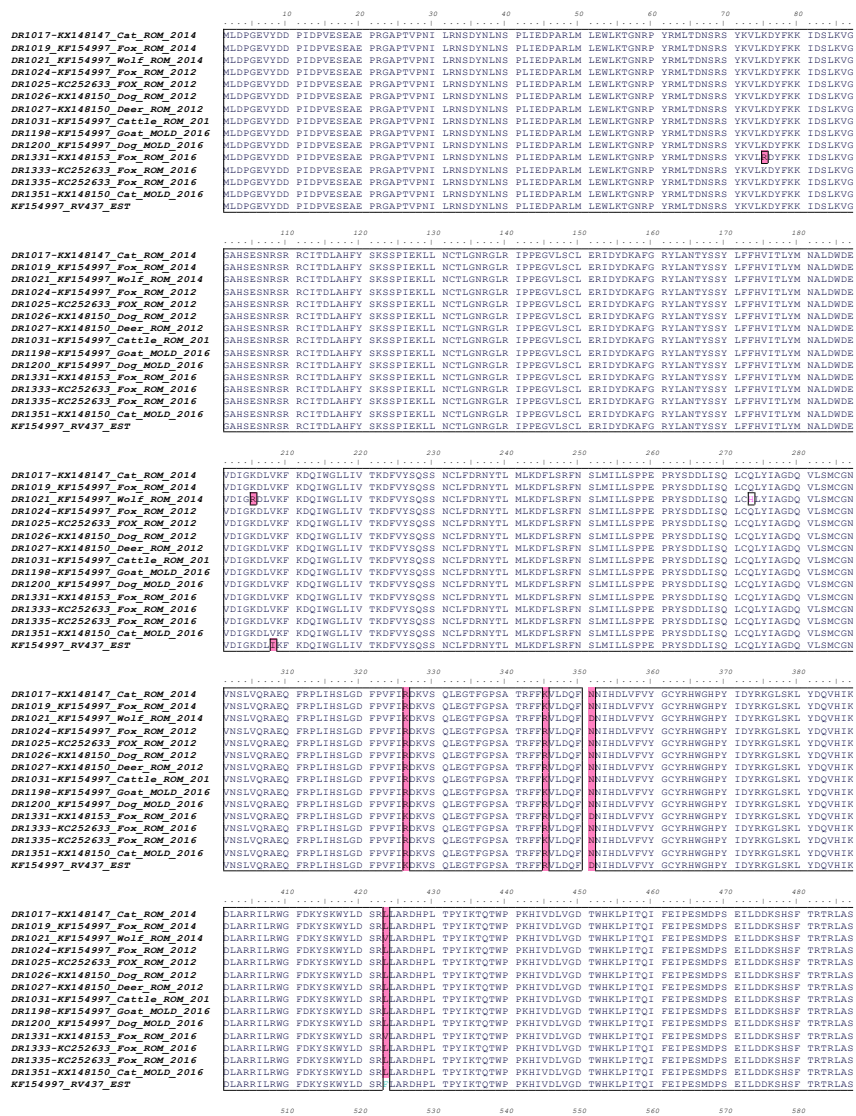


9.4 Alinierea aminoacizilor genei G a virusului rabic pentru cele 15 probe prin intermediul programului

GraphicView (original)

Fig. 9.4 Alignment of the rabies virus G gene amino acids for the 15 samples by GraphicView programme (original)

Pentru ultima genă studiată L, au fost analizate de asemenea 14 probe, ca și în cazul genei M, fiind obținuți 2087 de aminoacizi. Fiind și cea mai mare dintre gene, au fost identificate cele mai multe modificări în pozițiile aminoacizilor, astfel: proba DR1331 la pozițiile 75, 605, 1180, 1273, 1578, 1620 și 1980, proba DR1021 la pozițiile 205, 273, 1273, 1620, 1719 și 1986, proba DR 1027 la poziția 986, proba DR1335 la pozițiile 974 și 1548, proba DR1351 la poziția 1021, proba DR1200 la poziția 1284, proba DR1024 la poziția 1320, proba DR1333 la pozițiile 1629 și 1739 și proba DR1017 la poziția 1960. Procentele de similaritate ale aminoacizilor au fost de 99% (Fig. 9.5 – 9.8).



9.5 Alinierea aminoacizilor genei L a virusului rabic pentru cele 14 probe prin intermediul programului GraphicView (original)

Fig. 9.5 Alignment of the rabies virus L gene amino acids for the 14 samples by GraphicView programme (original)

DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1025-KC252633_FOX_ROM_2012	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1026-KX148150_Dog_ROM_2012	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1027-KX148150_Deer_ROM_2012	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1031-KF154997_Cattle_ROM_201	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1198-KF154997_Dog_MOLD_2016	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1200_KF154997_Dog_MOLD_2016	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1331-KX148153_Fox_ROM_2016	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1333-KC252633_Fox_ROM_2016	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1335-KC252633_Fox_ROM_2016	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1351-KX148150_Cat_MOLD_2016	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
KF154997_RV437_EST	KVIITALSKP	PVNIGLKPKE	RELKIEGRFF	ALMSWNLRLY	FVITEKLLAN	YILPLFDALT	MTDNLNKVFK	KLIDRVTGQG	LLDYSRV
DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1025-KC252633_FOX_ROM_2012	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1026-KX148150_Dog_ROM_2012	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1027-KX148150_Deer_ROM_2012	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1031-KF154997_Cattle_ROM_201	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1198-KF154997_Dog_MOLD_2016	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1200_KF154997_Dog_MOLD_2016	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1331-KX148153_Fox_ROM_2016	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1333-KC252633_Fox_ROM_2016	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1335-KC252633_Fox_ROM_2016	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1351-KX148150_Cat_MOLD_2016	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
KF154997_RV437_EST	DRESEDFVSF	LQVFGLLKRV	FSRTHEFFQK	SWIYYSDRS	LIGLWEDQIY	CLDMSNGDGG	LEGLRQKGWS	LVSLLMIDRE	SQTNTRT
DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1025-KC252633_FOX_ROM_2012	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1026-KX148150_Dog_ROM_2012	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1027-KX148150_Deer_ROM_2012	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1031-KF154997_Cattle_ROM_201	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1198-KF154997_Dog_MOLD_2016	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1200_KF154997_Dog_MOLD_2016	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1331-KX148153_Fox_ROM_2016	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1333-KC252633_Fox_ROM_2016	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1335-KC252633_Fox_ROM_2016	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1351-KX148150_Cat_MOLD_2016	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
KF154997_RV437_EST	FTYMLSPGLS	REGLLYLEES	ISRNALSIIYR	AIEEGASKLG	LIIKKEETMC	SYDFLIYGKT	PLFRGNILVP	ESKRWARVSC	ISNDQIV
DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1025-KC252633_FOX_ROM_2012	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1026-KX148150_Dog_ROM_2012	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1027-KX148150_Deer_ROM_2012	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1031-KF154997_Cattle_ROM_201	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1198-KF154997_Dog_MOLD_2016	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1200_KF154997_Dog_MOLD_2016	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1331-KX148153_Fox_ROM_2016	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1333-KC252633_Fox_ROM_2016	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1335-KC252633_Fox_ROM_2016	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1351-KX148150_Cat_MOLD_2016	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
KF154997_RV437_EST	LTVAQHSQSL	IKPMRDFLLM	SVQAVFHYLL	FSPILKGRVY	KILSAEGESF	LLAMSRIIYL	DPSLGGVSGM	SLGRFHIRQF	SDPVSEG
DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1025-KC252633_FOX_ROM_2012	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1026-KX148150_Dog_ROM_2012	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1027-KX148150_Deer_ROM_2012	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1031-KF154997_Cattle_ROM_201	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1198-KF154997_Dog_MOLD_2016	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1200_KF154997_Dog_MOLD_2016	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1331-KX148153_Fox_ROM_2016	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1333-KC252633_Fox_ROM_2016	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1335-KC252633_Fox_ROM_2016	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1351-KX148150_Cat_MOLD_2016	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
KF154997_RV437_EST	SWIHALCQEA	GNPDLGERTL	ESFTRLEDDP	TTLNKGGAS	PTILLKDAIR	KALYDEVVKV	ENSEFREAIL	LSKTHRDNFI	FLFKSVSE
DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	FLGIGPESII	GLIQNSRTIR	RQPKKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQT	QRVGRVWPCS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VHPFSEM
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	FLGIGPESII	GLIQNSRTIR	RQPKKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQT	QRVGRVWPCS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VHPFSEM

9.6 Alinierea aminoacizilor genei L a virusului rabic pentru cele 14 probe prin intermediul programului GraphicView (continuare 1) (original)

Fig. 9.6 Alignment of the rabies virus L gene amino acids for the 14 samples by GraphicView programme (original)

DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1025-KC252633_FOX_ROM_2012	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1026-KX148150_Dog_ROM_2012	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1027-KX148150_Deer_ROM_2012	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1031-KF154997_Cattle_ROM_201	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1198-KF154997_Goat_MOLD_2016	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1200_KF154997_Dog_MOLD_2016	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1331-KX148153_Fox_ROM_2016	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1333-KC252633_Fox_ROM_2016	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1335-KC252633_Fox_ROM_2016	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
DR1351-KX148150_Cat_MOLD_2016	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM
KF154997_RV437_EST	SFLGIPESII	GLIQNSRTIR	RQFRKLSRT	LEESFYNSEI	HGINRMTQTP	QRVGRVWFCPS	SERADLLREI	SWGKRVVGT	VPHFSEM

DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1025-KC252633_FOX_ROM_2012	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1026-KX148150_Dog_ROM_2012	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1027-KX148150_Deer_ROM_2012	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1031-KF154997_Cattle_ROM_201	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1198-KF154997_Goat_MOLD_2016	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1200_KF154997_Dog_MOLD_2016	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1331-KX148153_Fox_ROM_2016	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1333-KC252633_Fox_ROM_2016	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1335-KC252633_Fox_ROM_2016	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
DR1351-KX148150_Cat_MOLD_2016	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT
KF154997_RV437_EST	RATGGGNPRV	SVSVLPSPDQ	SFFSRGFLKG	YLGSSSTMST	QLFHAWKEVT	NVHVVKRAL	LKESINWFIT	RNSNLAQTLV	RNIMSLT

DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1025-KC252633_FOX_ROM_2012	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1026-KX148150_Dog_ROM_2012	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1027-KX148150_Deer_ROM_2012	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1031-KF154997_Cattle_ROM_201	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1198-KF154997_Goat_MOLD_2016	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1200_KF154997_Dog_MOLD_2016	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1331-KX148153_Fox_ROM_2016	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1333-KC252633_Fox_ROM_2016	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1335-KC252633_Fox_ROM_2016	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
DR1351-KX148150_Cat_MOLD_2016	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV
KF154997_RV437_EST	RTGSALHREF	SARYSEGGYS	SVCNLLSHI	SVSTDMSDL	TQDGKNYDFM	FQPLMLYAQ	WTSELVQDRT	RLDSTFHHW	LRCHACV

DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1025-KC252633_FOX_ROM_2012	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1026-KX148150_Dog_ROM_2012	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1027-KX148150_Deer_ROM_2012	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1031-KF154997_Cattle_ROM_201	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1198-KF154997_Goat_MOLD_2016	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1200_KF154997_Dog_MOLD_2016	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1331-KX148153_Fox_ROM_2016	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1333-KC252633_Fox_ROM_2016	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1335-KC252633_Fox_ROM_2016	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
DR1351-KX148150_Cat_MOLD_2016	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR
KF154997_RV437_EST	FDFFPDVSKRI	SRMVGAVFH	FQRLPDIRLR	PGDFESLSGR	EKSRHIGSAQ	GLLYSILVAI	HDSGYNGDGT	FPVNIYGKVS	PRDYLGR

DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1025-KC252633_FOX_ROM_2012	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1026-KX148150_Dog_ROM_2012	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1027-KX148150_Deer_ROM_2012	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1031-KF154997_Cattle_ROM_201	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1198-KF154997_Goat_MOLD_2016	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1200_KF154997_Dog_MOLD_2016	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1331-KX148153_Fox_ROM_2016	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1333-KC252633_Fox_ROM_2016	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1335-KC252633_Fox_ROM_2016	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
DR1351-KX148150_Cat_MOLD_2016	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN
KF154997_RV437_EST	LTRMTNININ	RPLELISGVI	YILLRLDNNP	SLYIMLREPS	LRGEIFSIPQ	IPAAPYTTMK	EGNRSILCYL	QHVLYREREV	ITASPEN

DR1017-KX148147_Cat_ROM_2014	MTYTLITLYQ	SHLLQQRVER	NLSKSMRANL	RQMSLMRQV	LGGHGEDTLE	SDDDIQRLKL	DSLRTRRWVD	QEVRAHAART	TGDSYFN
DR1019_KF154997_Fox_ROM_2014	MTYTLITLYQ	SHLLQQRVER	NLSKSMRANL	RQMSLMRQV	LGGHGEDTLE	SDDDIQRLKL	DSLRTRRWVD	QEVRAHAART	TGDSYFN
DR1021_KF154997_Wolf_ROM_2014	MTYTLITLYQ	SHLLQQRVER	NLSKSMRANL	RQMSLMRQV	LGGHGEDTLE	SDDDIQRLKL	DSLRTRRWVD	QEVRAHAART	TGDSYFN
DR1024-KF154997_Fox_ROM_2012	MTYTLITLYQ	SHLLQQRVER	NLSKSMRANL	RQMSLMRQV	LGGHGEDTLE	SDDDIQRLKL	DSLRTRRWVD	QEVRAHAART	TGDSYFN

9.7 Alinierea aminoacizilor genei L a virusului rabic pentru cele 14 probe prin intermediul programului

GraphicView (continuare 2) (original)

Fig. 9.7 Alignment of the rabies virus L gene amino acids for the 14 samples by GraphicView programme (original)

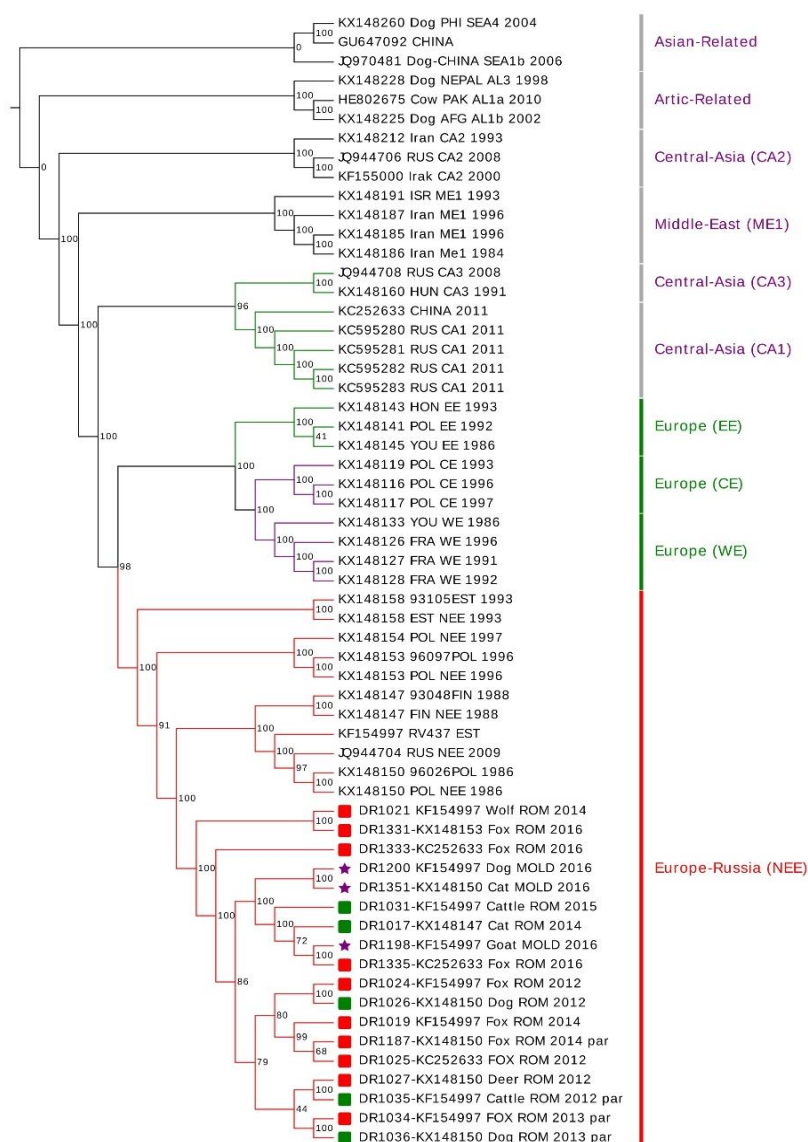


Fig. 9.9 Arbore filogenetic a secvențelor complete a genomului virusului rabic generat pe baza programului PhyML. Numerele adiacente ramurilor reprezintă procente Bootstrap. Pătrățelele roșii reprezintă animalele sălbatice, iar cele verzi animalele domestice din nord-estul României. Steluțele mov reprezintă animalele domestice din Republica Moldova (original)

Fig. 9.9 Phylogenetic tree of rabies virus genome full sequences, generated by PhyML. The branch numbers represent the Bootstrap percentages. The red squares represents the wild animals and the green ones represents the domestic animals from the north-east Romania. The purple stars represents the domestic animals from Republic of Moldova (original)

Pentru realizarea arborelui filogenetic au fost incluse 18 probe ale studiului nostru, dintre care 14 secvențe complete ale virusului rabic și 4 parțiale. Acestea au fost comparate la rândul lor cu 41 de secvențe nucleotidice de referință, extrase din baza de date GenBank, secvențe reprezentative următoarelor grupuri filogenetice: asiatic (n=3), arctic (n=3), Asia

centrală CA2 (n=3), Orientul Mijlociu ME1 (n=4), Asia Centrală CA3 (n=2), Asia Centrală CA1 (n=5), Europa EE (n=3), Europa CE (n=3), Europa WE (n=4), Europa-Rusia NEE (n=11). Prin intermediul metodei PhyML a fost evaluată confidența arborelui, fiind implementată metoda statistică bootstrap. Astfel, s-a arătat în cadrul analizei filogenetice apartenența la un singur grup filogenetic NEE (North-Eastern Europe).

Virusul rabic clasic se regăsește la nivel global și circulă într-o gamă variată de rezervoare de mamifere din ordinele *Chiroptera* și *Carnivora*, evoluția sa naturală oferind un exemplu ilustrativ de schimbare multiplă a gazdelor, dar și o oportunitate importantă de a determina mecanismele care stau la baza apariției virale (Troupin ș.a, 2016).

Cu toate că, majoritatea speciilor de mamifere par a fi sensibile la infecția cu virusul rabic, cel din urmă este capabil de a stabili rețele susținute de transmitere într-un număr relativ mic, indicând faptul că există bariere majore în calea transmiterii între specii (Troupin ș.a, 2016).

Ca și alte virusuri ARN, lyssavirusurile prezintă rate ridicate de mutații datorită lipsei activității de corectare a proteinei L. O analiză complexă a virusului rabic clasic, ce presupune în special secvențe complete ale genomului virusului în cauză este necesară pentru a stabili factorii care stau la baza schimbării speciilor gazde (Troupin ș.a, 2016).

În urma analizelor bioinformatică întreprinse, probele noastre au înregistrat un procentaj de similaritate a secvențelor nucleotidice ale nucleoproteinei virusului rabic cuprins între 97-98% după cum urmează:

- ❖ 97%: DR1331;
- ❖ 98%: DR1021, DR1200, DR1031, DR1198, DR1024, DR1019, DR1026, DR1027, DR1036, DR1025, DR1335, DR1331, DR1017.

Consecutiv studierii pozițiilor de aminoacizi ale genei G a virusului rabic, cunoscute ca fiind implicate în patogenitate, nu au fost identificate modificări care pot sugera diferențe de patogenitate la nivel de specie animală. Genele N și P a virusului rabic, conform analizelor similarității aminoacizilor, sunt cele mai conservate regiuni ale virusului în cauză, așa cum a fost demonstrat și de-a lungul timpului.

9.3 CONCLUZII PARȚIALE

Secvențierea de nouă generație a fost realizată pentru prima dată atât în țara noastră, cât și în Republica Moldova pe probe provenite de la animale domestice și sălbatice.

În urma analizelor bioinformatică întreprinse, probele noastre au înregistrat un procentaj de similaritate a secvențelor nucleotidice, respectiv ale aminoacizilor celor 5 gene ale virusului rabic cuprins între 96-100%.

Consecutiv studierii pozițiilor de aminoacizi ale genei G a virusului rabic, cunoscute ca fiind implicate în patogenitate, nu au fost identificate modificări care pot sugera diferențe de patogenitate la nivel de specie animală.

Pentru o mai bună înțelegere a diversității lyssavirusurilor, respectiv a diferențelor de patogenitate sunt necesare studii aprofundate care să implice un areal geografic mai extins, dar și un număr mai ridicat de probe.

CAPITOLUL X
CERCETĂRI PRIVIND STRATEGIA DE SUPRAVEGHERE ȘI
CONTROL A INFECȚIEI RABICE LA ANIMALE ÎN NORD-ESTUL
ROMÂNIEI
CHAPTER X
RESEARCHES REGARDING THE SURVEILANCE AND
CONTROL STRATEGY OF ANIMALS RABIES INFECTION IN THE
NORT-EAST OF ROMANIA

De-a lungul anilor, implementarea cu strictețe a programelor de supraveghere, control și eradicare, prin distribuirea de momeli vaccinale vulpilor, alături de vaccinarea obligatorie a animalelor de companie, au dus la eradicarea rabiei în vestul și centrul Europei, acestea fiind considerate singurele metode pentru a elimina, dar și pentru a ține sub control această zoonoză.

Țara noastră a pus în aplicare acest program începând cu anul 2011, verificarea și monitorizarea eficacității vaccinării antirabice în rândul animalelor fiind realizate prin intermediul serologiei (Servat ș.a., 2006).

Scopul acestor cercetări a fost de a verifica eficacitatea acestor campanii în nord-estul țării noastre prin determinarea anticorpilor antirabici postvaccinali, respectiv determinarea markerului vaccinal la vulpi. În ideea de a confirma sau nu ipoteza conform căreia mistreții ar constitui potențiali competitori pentru aceste momeli, o serie de probe au fost colectate și testate în acest sens.

Cercetările întreprinse în cadrul acestui capitol au urmărit mai multe obiective, fiind divizate în 2 subcapitole:

- ✚ Detecția anticorpilor antirabici postvaccinali, respectiv determinarea markerului vaccinal - tetraciclina - la vulpi;
- ✚ Detecția anticorpilor antirabici la mistreți.

10.1. Detecția anticorpilor antirabici postvaccinali și determinarea markerului vaccinal - tetraciclina - la vulpi

Pentru realizarea acestui studiu, cadrul organizatoric și instituțional a fost conferit de către Direcțiile Sanitar Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor (DSVSA) din județele regiunii Moldova, alături de Buzău și Maramureș, Laboratorul de Serologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași, determinările propriu-zise fiind efectuate în cadrul Laboratorului European de Referință în Rabie din Nancy, Franța.

10.1.1 MATERIALE ȘI METODE

Zona de studiu. Aceasta a vizat județele din nord-estul României: Botoșani, Suceava, Iași, Neamț, Vaslui, Bacău, Galați, Vrancea, Buzău și Maramureș, zone unde s-a desfășurat vaccinarea antirabică orală la vulpi. Cu scopul de a verifica eficacitatea campaniilor de vaccinare a vulpilor, 392 probe reprezentate de lichid toracic și 72 mandibule de vulpi (Fig. 10.1) au fost supuse testărilor.



Fig. 10.1 Harta României cu originea geografică (portocaliu) a probelor de vulpi (original)

Fig. 10.1 Romanian map with the geographical origin (orange colour) of foxes samples (original)

Probe luate în studiu. Un total de 392 de probe provenite de la vulpi, reprezentate de lichid toracic au fost luate în studiu, acestea fiind testate în cadrul DSVSA-urilor pentru verificarea eficacității campaniilor de vaccinare orală din cadrul programului strategic cu ajutorul kit-ului *Platelia Rabies II*. Toate aceste probe au fost colectate în perioada 2014-2016 după efectuarea campaniilor de vaccinare orală, respectiv după sezonul de vânătoare. Alte 72 de probe, reprezentate de mandibule de vulpi, din perioada noiembrie 2015 – ianuarie 2016, au fost supuse testărilor pentru determinarea markerului tetraciclină.

Detecția și titrarea anticorpilor antirabici postvaccinali la vulpi a fost realizată prin intermediul metodei serologice ELISA.

Materiale necesare:

- kit-ul *BioPro Rabies ELISA* (BioPro, Prague, Czech Republic);
- kit-ul *PlateliaTM Rabies II Kit ad usum veterinarium* (BioRad, Franța);
- spectrofotometru Thermo ScientificTM MultiskanTM FC Microplate;
- incubator și termo-agitator plăci ELISA: Grant-bio PHMP (10-001);
- mașină pentru spălat plăci ELISA: Wellwash Thermo Scientific;
- placă ELISA n=96 godeuri cu fund plat (Falcon, USA);
- apă distilată; pipete și conuri aferente;
- probele de testat; halat, mască, mănuși, bonetă, ochelari de protecție.

Testul ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Detecția și titrarea anticorpilor antirabici pentru cele 392 de probe a fost realizată prin intermediul metodei imunoenzimatică ELISA de blocare, 345 dintre acestea fiind lucrate cu ajutorul kit-ului *BioPro Rabies ELISA Ab Kit* (BioPro, Republica Cehă), iar restul de 47 cu ajutorul kit-ului *PlateliaTM Rabies II Kit ad usum veterinarium* (BioRad, Franța), respectând recomandările și instrucțiunile producătorilor. Întrucât marea majoritate a probelor au fost lucrate cu ajutorul kit-ului ceh, în continuare va fi descrisă doar procedura aferentă acestuia.

Metoda a fost realizată pe parcursul a două zile. În prima zi, microplăcile, acoperite cu antigenul rabic, au fost aduse la temperatura camerei înainte de a fi utilizate. În fiecare godeu, au fost distribuiți câte 50 µl de diluant pentru probe. Controalele pozitive și negative furnizate de către producător au fost adăugate în duplicat în godeurile special destinate acestora, alături de controalele pozitive calibrate (CS1, CS2 și CS3). Fiecare probă de testat, a fost distribuită în godeuri în cantitate de 50µl, microplăcile fiind acoperite cu o folie adezivă și incubate peste noapte (18-24h) la 2-8°C cu o agitare ușoară în termo-agitatorul orbital.

În ziua a doua, soluția concentrată de spălare (10x) a fost pregătită prin adăugarea unui volum de soluție concentrată de spălare și 9 părți de apă distilată. Atât pentru anticorpii biotiniți antirabici, cât și pentru conjugatul streptavidină-peroxidază s-a realizat diluția acestora (1/100) cu ajutorul diluanților furnizați în kit. După incubare, folia adezivă a fost îndepărtată, conținutul eliminat, realizându-se 6 spălări cu soluția de spălare pregătită anterior.

Câte 100µl de anticorpi biotiniți diluați anterior au fost distribuiți în fiecare godeu, plăcile fiind acoperite cu folie adezivă și incubate la 37°C timp de 30 de min. cu o agitare ușoară în termo-agitatorul orbital, fiind realizate mai departe 4 spălări cu scopul de a îndepărta anticorpii biotiniți antirabici nelegați.

În continuare, 100 µl de conjugat streptavidină-peroxidază diluat au fost adăugați în fiecare godeu, plăcile fiind acoperite cu folie adezivă, incubate la 37°C timp de 30 de min. cu o agitare ușoară în termo-agitatorul orbital, realizându-se ulterior 4 spălări pentru a îndepărta conjugatul nelegat.

Prezența complexelor atg-atc a fost pusă în evidență prin adăugarea în fiecare godeu a câte 100 µl de soluție de substrat TMB. Plăcile au fost incubate la temperatura camerei timp de 15-30 de min cu o agitare ușoară în termo-agitatorul orbital, reacția enzimatică fiind stopată prin adăugarea soluției H₂SO₄, formându-se o culoare galbenă. Densitatea optică a microplăcilor a fost citită la 450nm.

Determinarea markerului vaccinal - tetraciclină din mandibulele vulpilor

Pregătirea mandibulelor pentru citirea acestora la microscopul cu UV a fost realizată de către persoanele abilitate din cadrul DSVSA-urilor județelor aferente studiului nostru. Astfel, au fost testate un număr total de 72 de probe din județele Botoșani (n=10), Bacău (n=10), Iași (n=10), Galați (n=10), Neamț (n=10), Vrancea (n=10) și Vaslui (n=12), din campania a doua de vaccinare a anului 2015, acestea provenind de la vulpi împușcate în perioada noiembrie 2015 – ianuarie 2016.

În cadrul laboratorului din Nancy, au fost pregătite controalele pozitive și negative, necesare validării tehnicii.

Materialele necesare au fost reprezentate de către: aparatul Buehler, Isomet pentru realizarea secțiunilor; cuțit, clește, ciocan; lame și lamele; mediu de montare; microscop cu UV; halat, mănuși, mască, ochelari de protecție.

Pregătirea controalelor: După decongelarea mandibulei, aceasta a fost secționată în două, a fost aleasă o parte, după care s-a extras caninul cu tot cu rădăcină și o parte din mandibulă (Fig. 10.3 A,B,C).

Realizarea secțiunilor: Secțiunile au fost realizate transversal la baza rădăcinii caninului, la 2-3 mm de capătul rădăcinii (Fig. 10.2 B). Dacă secționarea se face prea departe

de capătul rădăcinii, liniile de ciment nu se evidențiază bine, îngreunând stabilirea vârstei animalului în cauză.

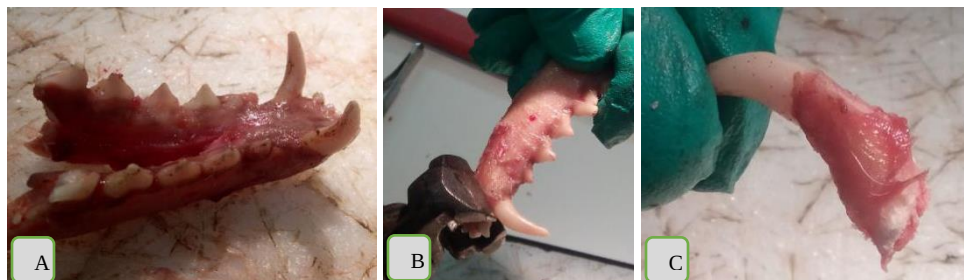


Fig. 10.2 A) Pregătirea mandibulei cu secționarea acesteia în două părți; B) Individualizarea caninului de mandibulă cu ajutorul unui clește; C) Aspectul final al caninului înaintea realizării secțiunilor transversale (original) / Fig. 10.2 A) Jaw preparation by performing the section in two halves; B) Canine extraction from the jaw with a forceps; C) Final results of the canine before performing transverse sections (original)

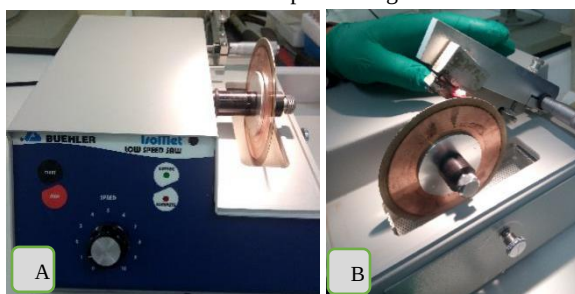


Fig. 10.3 A) Aparatul Buehler, Isomet; B) Efectuarea propriu-zisă a secțiunilor la fierăstrăul cu diamant (original) / Fig. 10.3 A) Buehler, Isomet machine B) Sections performing with the help of diamond saw (original)

Adăugarea mediului de montare și citirea la microscopul cu UV: Fiecare secțiune realizată a fost depusă pe o lamă, peste care s-a adăugat o picătură de mediu de montare. Înainte de analizarea probelor în cauză, au fost examinate controalele (pozitiv și negativ) pentru validarea tehnicii.

10.1.2 REZULTATE

10.1.2.2. Detectia anticorpilor antirabici la vulpi prin intermediul metodei serologice ELISA

Aceste determinări au fost efectuate în cadrul Laboratorului European de Referință în Rabie din Nancy, Franța, cu ajutorul kit-ului *BioPro ELISA* pe un număr de 345 de probe, restul de 47 de probe fiind lucrate în țara noastră cu ajutorul kit-ului *PlateliaTM Rabies II*.

Probele lucrate cu kit-ul BioPro ELISA.

Pentru validarea tehnicii, trebuie respectate criteriile stabilite de către producător. Astfel, densitatea optică (DO) pentru controlul negativ trebuie să fie >1 , iar diferența dintre DO a controlului negativ și cel pozitiv trebuie să fie mai mare sau egal cu 0,8. Valori diferite de cele recomandate de către producător duc la nevalidarea rezultatelor, respectiv la refacerea testărilor.

În ceea ce privește procentajul de blocare (PB), acesta trebuie să fie cuprins între 45-70% pentru CS1, între 25-45% pentru CS2 și sub 30% pentru CS3. Aceste valori s-au încadrat standardelor pentru toate cele 345 de probe.

Calcularea PB-ului pentru fiecare probă în parte a fost efectuată după următoarea formulă:

$$PB\% = \frac{DO_{CN} - DO_{\text{probă}}}{DO_{CN} - DO_{CP}} \times 100 \text{ unde,}$$

DO_{CN} reprezintă densitatea optică a controlului negativ, DO_{CP} reprezintă densitatea optică a controlului pozitiv, iar $DO_{\text{probă}}$, densitatea optică a probei.

O probă este considerată pozitivă dacă PB este egal sau mai mare de 40% și negativă dacă PB este mai mic de 40%. Conform producătorului, un PB egal sau mai mare de 70% este echivalent cu 0,5UI/ml în cadrul metodei de referință FAVN. În scopul evaluării eficacității campaniilor de vaccinare, se recomandă ca și referință valoarea PB-ului $\geq 40\%$.

Din cele 345 de probe, 133 au provenit din județul Neamț, 54 din județul Vaslui, 50 din județul Bacău, 42 din județul Galați, 38 din județul Botoșani, 22 din județul Vrancea și 6 din județul Maramureș.

Tabel 10.1 / Table 10.1

Rezultatele obținute pentru cele 345 de probe de vulpi prin intermediul testului ELISA (Kit-ul BioPro)

The results obtained for the 345 foxes samples by ELISA (BioPro kit)

Județ	Total probe testate	Pozitive	%	Negative	%
Neamț	133	39	29,32	94	70,68
Vaslui	54	9	16,67	45	83,33
Bacău	50	11	22	39	78
Galați	42	11	26,19	31	73,81
Botoșani	38	17	44,74	21	55,26
Vrancea	22	10	45,46	12	54,54
Maramureș	6	1	16,67	5	83,33
Total	345	98	28,40	247	71,60

Astfel, din totalul celor 345 de probe de vulpi lucrate cu ajutorul acestui kit ELISA, 98 au fost pozitive (28,40%) și 247 negative (71,60%) (Fig. 10.4).

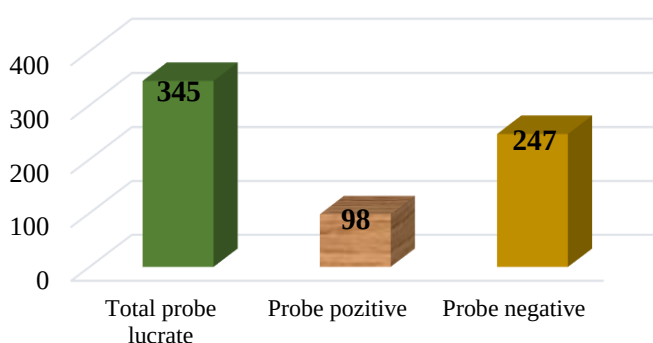


Fig. 10.4 Reprezentarea grafică a rezultatelor obținute pentru probele de vulpi prin intermediul testului

ELISA / Fig. 10.4 Graphical representation of the results obtained for the foxes samples by ELISA

În ceea ce privește județul Neamț, din totalul celor 133 de probe testate, 39 (29,32%) dintre acestea au fost pozitive și 94 (70,68%) negative la detecția anticorpilor antirabici postvaccinali (Tabel 10.2). În județul Vaslui, din totalul celor 54 de probe testate, 9 (16,67%)

dintre acestea au fost pozitive și 45 (83,33%) negative, pe când în județul Bacău, din cele 50 de probe testate, doar 11 (22%) au fost pozitive, restul de 39 (78%) fiind negative (Tabel 10.2).

În județul Galați, 31 (73,81%) de probe din totalul celor 42 au negative în urma testărilor și doar 11 (26,19%) dintre acestea au fost pozitive. Din totalul celor 38 de probe testate din județul Botoșani, 17 (44,74%) dintre acestea au fost pozitive și 21 (55,26%) negative (Tabel 10.2).

Tabel 10.2 / Table 10.2

Procentul de blocare de 40-70%, respectiv >70% și densitatea optică aferentă probelor pozitive de vulpi al județelor luate în studiu / Blocking percentage of 40-70% and >70%, the optical density, respectively, for the positive foxes samples of the studied counties

Județ	Probe pozitive	PB 40-70%		DO	PB >70%		DO
		Nr. Pb.	Valori		Nr. Pb.	Valori	
Neamț	39	20	40,12-66,08	0,879-1,505	19	70,44-100,95	0,178-0,877
Vaslui	9	7	54,26-68,46	0,826-1,204	2	70,39-74,48	0,705-0,787
Bacău	11	7	41,43-68,82	0,928-1,543	4	79,92-98,20	0,269-0,836
Galați	11	6	45,13-68,91	0,817-1,460	5	79,91-89,39	0,405-0,612
Botoșani	17	5	41,27-68,77	0,895-1,456	12	75,09-98,11	0,271-0,761
Vrancea	10	2	66,43-69,36	0,883-0,982	8	81,68-91,69	0,407-0,639
Maramureș	1	0	-	-	1	81,06	0,610

Pentru ultimele 2 județe luate în studiu, numărul de probe testate a fost mai redus. Astfel, pentru județul Vrancea au fost testate un număr total de 22 de probe, dintre care 10 (45,46%) au fost pozitive și 12 (54,54%) negative, iar pentru județul Maramureș, din totalul celor 6 probe testate, doar una singură a fost pozitivă (16,67%), restul celorlalte 5 (83,33%), fiind negative (Tabel 10.2).

Astfel, din totalul celor 345 de probe de vulpi lucrate prin intermediul acestui kit, 247 (71,60%) au înregistrat un PB <40%, 47 (13,62%) s-au încadrat în categoria unui PB de 40-70%, iar restul de 51 (14,78%) în ultima categorie cu un PB >70% (Fig. 10.5).

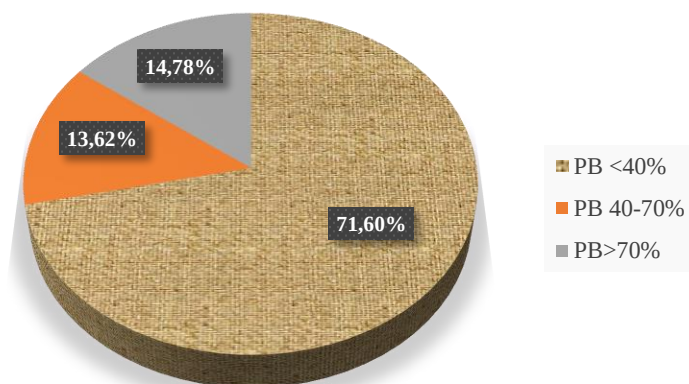


Fig. 10.5 Reprezentarea grafică a procentului de blocare (PB) al celor 345 probe de vulpi testate. PB <40% reprezintă probele negative, PB 40-70% reprezintă probe pozitive, iar PB >70%, probe pozitive cu un nivel mai mare de 0,5 UI/ml de anticorpi postvaccinali / Fig. 10.5 Graphical representation of the blocking percentage (PB) of the 345 foxes samples tested. PB <40% represents negative samples, PB 40-70% positive samples and PB >70% positive samples with a level equal or greater than 0.5 IU / ml of postvaccinal antibodies

Probele lucrate cu kit-ul Platelia™ Rabies II

Acest kit permite detecția și titrarea anticorpilor antirabici, prin intermediul unei tehnici imunoenzimatică, cunoscută ca și ELISA indirectă.

Cu ajutorul acestui kit, a fost lucrat un număr redus de doar 47 probe. Dintre acestea, 19 au provenit de pe raza județului Buzău (Bâsca Mare, Aldeni, Rusetu, Siriu, Amara, Luciu, Brăești, Dedulești, Călnău, Moieni, Boldu, Păltiniș, Beceni și Piciorul Caprei), 10 din județul Neamț, 8 din județul Galați, 5 din județul Suceava, 4 din județul Vaslui și doar o singură probă din județul Iași (Tabel 10.3) (Dasclu ș.a., 2016(a), 2016(b)).

Tabel 10.3 / Table 10.3

Rezultatele obținute pentru cele 47 de probe de vulpi prin intermediul testului ELISA (kit-ul Platelia™ Rabies II) / The results obtained for the 47 foxes samples by ELISA (Platelia™ Rabies II kit)

Județ	Total probe testate	Pozitive	Negative
Buzău	19	3	16
Neamț	10	2	8
Galați	8	3	5
Suceava	5	3	2
Vaslui	4	2	2
Iași	1	1	0
Total	47	14	33

După citirea rezultatelor la spectrofotometru la 450-620 nm, acestea sunt redată ca și densități optice (DO), interpretarea fiind atât calitativă, cât și cantitativă.

Interpretarea calitativă a rezultatelor. Validarea are la bază următoarele condiții: DO a matorului negativ trebuie să fie sub valoarea de 0,05, cea a matorului pozitiv (R4a) între 0,300-1,200, iar pentru cel de-al doilea mator pozitiv între 1,500-3,500.

Acestea au fost încadrate în 3 categorii: protecție (seroconversie) ridicată (+++), protecție suficientă și protecție absentă. În ceea ce privește județul Buzău, din totalul celor 19 de probe testate, doar 3 dintre acestea au fost pozitive cu un nivel de protecție suficient, restul probelor fiind negative. Dintre cele 8 probe din județul Galați, doar 3 au fost pozitive, înregistrând un nivel de protecție suficient. Referitor la județul Neamț, doar pentru 2 din cele 10 probe testate a fost obținut un nivel de protecție suficient. Din cele 5 probe testate din județul Suceava, doar 3 dintre acestea s-au încadrat într-un nivel protector, iar din cele 4 probe provenite de pe raza județului Vaslui, doar 2 s-au încadrat cerințelor. Pentru județul Iași, a fost testată o singură probă prin intermediul acestui kit, aceasta înregistrând un nivel suficient de seroconversie (Tabel 10.4).

Interpretarea calitativă a probelor luate în studiu pe baza criteriilor de validare recomandate de către producător / Qualitative interpretation of the samples on the basis of validation criteria recommended by the manufacturer

Județ	Nr. probe testate	Criteriu validare		
		Protecție ridicată (+++)	Protecție suficientă	Protecție absentă
Buzău	19	0	3	16
Neamț	10	0	2	8
Galați	8	0	3	5
Suceava	5	0	3	2
Vaslui	4	0	2	2
Iași	1	0	1	0
Total	47	0	14	33

Interpretarea cantitativă a rezultatelor. Astfel, cantitatea de anticorpi antirabici este determinată prin compararea DO a probei de testat și curba standard, titrul obținut fiind exprimat în Unități Echivalente per ml (EU/ml).

Conform producătorului, rezultatele cantitative au fost împărțite în 4 categorii de seroconversie: ridicată (>4 EU/ml), suficientă (0,5-4 EU/ml), insuficientă (0,125-0,5 EU/ml) și nedetectabilă (<0,125 EU/ml).

Din cele 19 probe testate din județul Buzău, 3 dintre acestea au înregistrat un nivel suficient de seroconversie (0.736 EU/ml-Beceni; 0.933 EU/ml-Bâsca Mare și 2.362 EU/ml-Brăești), altele 5 au prezentat un nivel insuficient de seroconversie, fiind unul neprotectiv (0.204 EU/ml-Moieni; 0.274 EU/ml-Luciu; 0.359 EU/ml-Boldu; 0.374 EU/ml-Păltiniș și 0.522 EU/ml-Piciorul Caprei), iar pentru restul celor 11 probe nu a fost detectat nici un semnal de seroconversie, acesta fiind situat sub nivelul <0.125 EU/ml (Basca Mare, Calnau, Aldeni, Amara, Siriu, Rusetu (n=2), Luciu, Dedulesti (n=2) și Piciorul Caprei).

Din cele 10 probe testate pentru județul Neamț, pentru 2 dintre probe s-a înregistrat un nivel suficient de seroconversie (0,769 și 1,777 EU/ml), restul celorlalte 8 fiind sub nivelul 0,125 EU/ml, considerat unul neprotectiv.

În ceea ce privește județul Galați, 3 dintre acestea au înregistrat un nivel suficient de seroconversie (2.963 EU/ml, 3.177 EU/ml și 3.456 EU/ml), 2 dintre acestea s-au situat sub nivelul minim de protecție (0.372 EU/ml și 0.439 EU/ml), iar pentru 3 probe nu a fost detectat nici un semnal de seroconversie (<0.125 EU/ml).

Pentru Suceava, din cele 5 probe testate, 3 au înregistrat un nivel de seroconversie suficient (0,697, 0,915 și 3,487 EU/ml), o probă s-a încadrat sub nivelul de protecție, cu o valoare de 0,238 EU/ml, iar pentru cea din urmă sub valoarea de 0,125 EU/ml. Din cele 4 probe testate pentru județul Vaslui, 2 au înregistrat o seroconversie suficientă (1,218 și 2,630 EU/ml), o altă probă o seroconversie insuficientă (0,176 EU/ml), iar cea din urmă sub nivelul cerut (0,125 EU/ml). Ultima probă testată din Iași a înregistrat o seroconversie suficientă, cu o valoare de 1,610 EU/ml (Fig. 10.6).

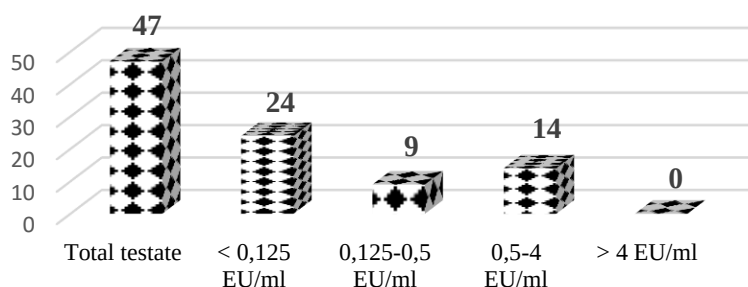


Fig. 10.6 Titul de anticorpi antirabici obținut pentru probele testate prin intermediul kit-ului Platelia™ Rabies II. Interpretarea cantitativă cu cele 4 categorii de seroconversie: < 0,125 EU/ml: nivel nedetectabil de seroconversie, 0,125-0,5: nivel insuficient de seroconversie, 0,5-4 EU/ml: nivel suficient de seroconversie și >4 EU/ml: nivel ridicat de seroconversie / Fig. 10.6 The antirabies antibody titre obtained for the samples tested using the Platelia™ Rabies II kit. Quantitative interpretation with the four categories of seroconversion: <0.125 EU / ml: undetectable level of seroconversion, 0.125-0.5: insufficient seroconversion, 0.5-4 EU / ml: sufficient seroconversion and > 4 EU / ml: high level of seroconversion

Astfel, din totalul celor 47 de probe testate prin intermediul acestui kit, nici una dintre probe nu s-a încadrat în prima categorie de >4 EU/ml, iar pentru 24 dintre acestea nu s-a înregistrat nici un semnal de seroconversie, fiind situate sub valoarea de 0,125 EU/ml. Un nivel insuficient de anticorpi antirabici a fost detectat în cazul a 9 probe, cu valori cuprinse între 0,125-0,5 EU/ml, considerat a fi unul neprotectiv în cazul unei infecții cu virusul rabic. Doar 14 probe s-au încadrat în categoria 0,5-4 EU/ml, cu un titru de anticorpi suficient pentru a contracara o eventuală infecție cu virusul rabic (Fig. 10.5).

10.1.2.3 Determinarea markerului vaccinal – tetraciclina - la vulpi

Înainte de examinarea la microscopul cu UV, fiecare probă a fost acoperită cu câte o picătură de mediu de montare, indispensabilă pentru o mai mare acuratețe a rezultatelor, dar și pentru un mai bun contrast. La examinarea probelor se stabilesc: vârsta animalului, prezența sau absența tetracilinei în os, ciment sau dentină, numărul liniilor de tetraciclina, perioada ingerării momelilor, intensitatea semnalului fluorescent, dar și calitatea secțiunilor realizate.

Din totalul celor 72 de probe, 60 dintre acestea au fost pozitive și 12 negative la detecția markerului vaccinal (Fig. 10.7).

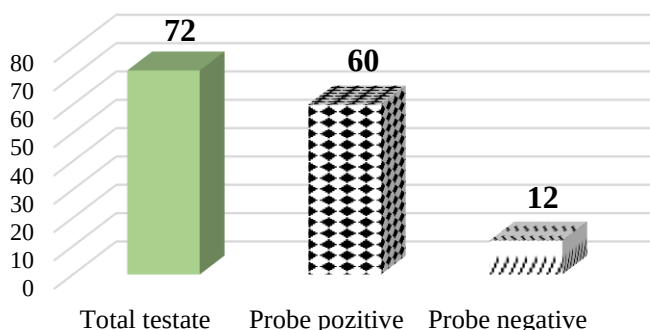


Fig. 10.7 Rezultatele obținute pentru cele 72 de mandibule de vulpi pentru detecția markerului vaccinal

Fig. 10.7 The results obtained for the 72 foxes mandibles for vaccine marker detection

Rezultatele obținute pentru fiecare județ în parte, data recoltării probelor și determinarea categoriilor de vârstă sunt descrise în tabelul 10.5.

Tabel 10.5 / Table 10.5

Rezultatele obținute la detecția markerului tetraciclinei și determinarea categoriilor de vârstă pentru probele luate în studiu / The results obtained for the detection and determination of the tetracycline marker and determination of age categories of samples used in the study

Județ	Probe testate		Data recoltării	Vârsta		
	+	-		*Nec.	<1 an	adult
BC	9	1	29.12.15-21.01.16	6	4	0
BT	9	1	21.12.15-21.01.16	8	2	0
IS	9	1	29.11.16-10.12.16	8	2	0
GL	7	3	-	6	3	1
NT	7	3	06.01.16-13.01.16	4	5	1
VS	9	1	05.01.16-11.01.16	4	5	1
VN	10	2	27.12.15-10.01.16	9	3	0
Total	60	12	-	45	24	3

*Nec. Nu s-a putut determina vârsta pe baza secțiunilor realizate.

Metoda cea mai precisă pentru determinarea vârstei la vulpi este reprezentată de analiza dentiției. Numărarea liniilor de ciment și lățimea canalului medular sunt de ajutor în stabilirea cu exactitate a vârstei. Astfel, un canal medular larg și lipsa cimentului sunt observate în cazul animalelor tinere (Robardet ș.a., 2012). Data morții, alături de dimensiunea canalului medular, prezența sau absența cimentului sunt factori care pot distinge adulții de tineri (Johnston ș.a., 1999).

Stabilirea vârstei a fost posibilă doar pentru 27 din cele 72 de probe (Fig. 10.8A, B), întrucât secțiunile au fost realizate pe orizontală și nu pe transversală așa cum este recomandat.

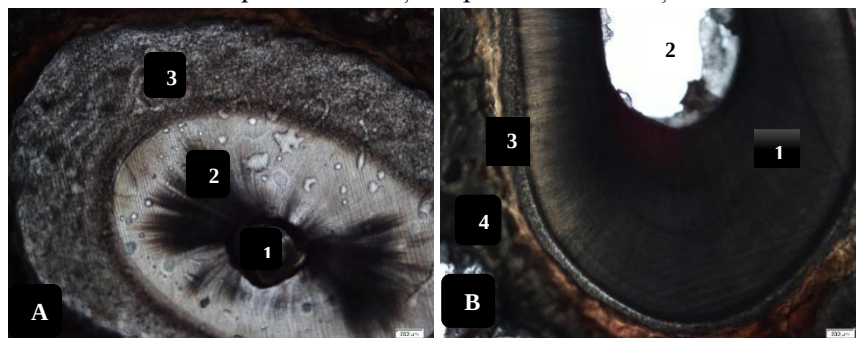


Fig. 10.8 Determinarea vârstei la vulpi pe baza dentiției A) Vulpe adultă, aprox. 6 ani; 1: cavitate pulpară, 2: dentină, 3: ciment; B) Vulpe tânără <1 an, 1: dentină, 2: cavitate pulpară largă, 3: ciment, 4: os mandibular (original)

Fig. 10.8 Age determination in foxes A) Adult fox, aprox. 6 year, 1: pulp cavity, 2: dentine, 3: cementum; B) Young fox <1 year, 1: dentine, 2: large pulp cavity, 3: cementum, 4: mandibular bone (original)

De asemenea, prezența tetraciclinei în os, ciment sau dentină, poate fi un indicator important în stabilirea momentului precis în care au fost ingerate momelile (Robardet ș.a., 2012). Astfel, dacă la examenul probelor la microscopul cu UV se observă:

- prezența unei linii de fluorescență în dentină, în apropierea pulpii cavitare, indică consumul momelii înainte vârstei de 1 an;
- prezența unei linii în ciment, indică consumul momelii la vârsta de 1-2 ani;
- prezența unei linii în ciment, între liniile 3-5 ale cimentului, indică consumul momelii acum 3,5 ani;
- prezența a 3 linii în dentină, în apropierea pulpei cavitare, indică consumul momelii înainte vârstei de 1 an (Robardet, 2012).

În cadrul probelor noastre, au fost detectate linii fluorescente în ciment, doar în cazul a 2 probe din totalul celor 72, în dentină un număr de 33 de probe, iar în os 60 de probe. De precizat faptul că, aceste linii se pot regăsi concomitent atât în dentină, cât și în os (Fig. 10.9 A, B; Fig. 10.10 A, B).

În ceea ce privește intensitatea semnalului fluorescent detectat, aceasta a variat de la + pentru 17 probe, ++ pentru 13 probe și +++ pentru 30 de probe.

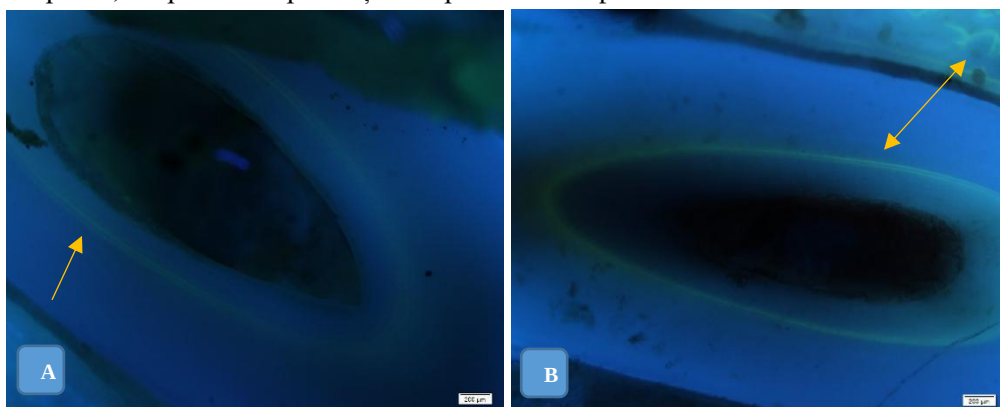


Fig. 10.9 A) Depozit de tetraciclină în dentină (3 linii), cu o intensitate a fluorescenței redusă B) Depozit de tetraciclină în dentină (2 linii) și os mandibular, cu o intensitate a fluorescenței medie (original)

Fig. 10.9 Tetracycline deposits in dentine (3 lines) with a reduced fluorescent intensity B) Tetracycline deposits in dentine (2 lines) and mandibular bone, with a medium fluorescent intensity (original)

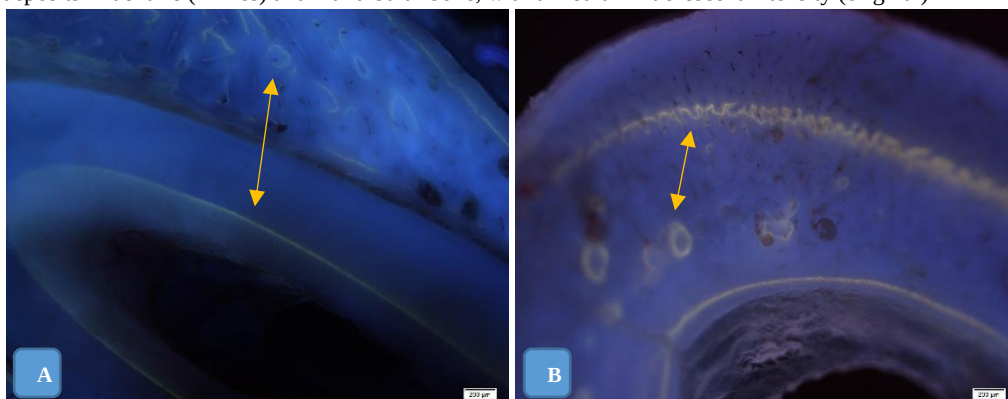


Fig. 10.10 A) Depozit de tetraciclină în dentină (o linie) și os mandibular, cu o intensitate a fluorescenței medie B) Depozit de tetraciclină în dentină (o linie) și os mandibular, cu o intensitate a fluorescenței ridicată (original)

Fig. 10.10 Tetracycline deposits in dentine (one line) and mandibular bone, with a medium fluorescent intensity B) Tetracycline deposits in dentine (one line) and mandibular bone, with an increased fluorescent intensity (original)

10.1.3 DISCUȚII

Conform producătorilor, un nivel insuficient sau nedectabil de seroconversie în cazul testului ELISA, poate să apară la animalele vaccinate recent, în urma unui răspuns imun întârziat, de aceea se recomandă realizarea acestui test (valabil pentru ambele kit-uri) la minim 30-45 de zile după distribuția momelilor vaccinale.

În esență, diferiți factori pot influența rezultatul testului, precum calitatea deficitară a probelor, condițiile de mediu și a carcasei înainte de recoltarea probei, dar și timpul scurs de la decesul animalului până la recoltare.

Dinamica populației de vulpi, sezonul de reproducție, imunitatea maternală și răspunsul imunologic al puilor de vulpe la vaccinarea orală sunt factori de care trebuie să se țină cont atunci când se efectuează aceste campanii (Vos ș.a., 2001). Dacă vaccinarea se adresează vulpilor adulte, perioada propice în distribuirea momelilor vaccinale este reprezentată de prima jumătate a lunii martie. Dacă targetul cuprinde și puii de vulpi, atunci momelile nu trebuie distribuite mai devreme de sfârșitul lunii mai, întrucât aceștia dețin anticorpi antirabici maternali (Vos ș.a., 2001).

Așa cum a fost demonstrat în mai multe studii, acești anticorpi antirabici pot fi transferați de la mamă (vaccinată în timpul gestației) la pui fie transplacentar, fie prin intermediul lactației (colostrului) (Vos ș.a., 2003), anticorpi ce pot persista între 45-75 de zile după naștere (Blasco ș.a., 2001; Bugnon ș.a., 2004). Însă, într-un alt studiu publicat de către Müller ș.a. în anul 2001, răspunsul imun pentru puii sub vârsta de 8 săptămâni proveniți din mame vaccinate a fost unul insuficient, nefiind protejați în cazul unei infecții cu virusul rabic.

Un alt studiu privind persistența anticorpilor antirabici în serul puilor de vulpi a fost realizat de către Hostnik ș.a. în anul 2003, dovedind faptul că anticorpii antirabici maternali la puii de vulpe persistă în organismul acestora doar 2 luni după naștere.

În majoritatea țărilor europene unde s-a instituit acest program de vaccinare orală la vulpi, distribuirea momelilor s-a realizat bianual (primăvara și toamna), momentul optim fiind sfârșitul lunii noiembrie, începutul lunii decembrie (Vos, 2003). Întrucât primăvara proporția cea mai mare a populației de vulpi este reprezentată de către pui, pentru o eficacitate crescută al acestor campanii de vaccinare se recomandă distribuirea momelilor direct în vizuini (Blasco ș.a., 2001).

Realizarea unui vaccin eficace și sigur, a unei momeli atractive din punct de vedere olfactiv, implementarea unei strategii eficace pentru a acoperi o populație cât mai largă de vulpi (Debbie, 1974; Kappeler ș.a., 2000), respectarea aceluiași reguli de către toate țările care implementează acest program, continuarea distribuției de momeli încă 2 ani de la ultimul caz de rabie, sunt doar câteva dintre condițiile pentru ca programul să dea rezultate (Cliquet ș.a., 2004).

În ceea ce privește determinarea markerului vaccinal, obținerea de date valide și interpretarea cu ușurință a rezultatelor sunt în mare parte dependente de tipul secțiunilor realizate. Astfel, comparativ cu secțiunile orizontale, cele transversale sunt mai ușoare și mai practice de realizat. Acestea trebuie realizate la 2-3 mm de rădăcina dintelui cu scopul de a maximiza vizibilitatea liniilor succesive de ciment (Robardet ș.a., 2012). Secțiunile orizontale cum a fost și în cazul mai multor probe testate în studiul nostru, pot îngreuna foarte mult

aprecierea vârstei animalului, dar și determinarea cu precizie a momentului în care a avut loc ingerarea momelilor.

De asemenea, diferite avantaje și dezavantaje pot fi întâlnite în funcție de prezența tetraciclinei în mandibulă, ciment sau dentină.

Astfel, avantajele prezenței tetraciclinei în mandibulă, sunt reprezentate de pozitivitatea intensă în cazul ingerării recente, dar și de sensibilitatea crescută în ceea ce privește detecția, mai ales în cazul animalelor tinere (Robardet, 2012). Însă, sunt numeroase dezavantaje precum: imposibilitatea determinării vârstei animalului, lipsa sensibilității pentru puii de vulpe de 1-2 luni unde creșterea osoasă are loc într-un ritm alert, instabilitatea biomarkerului în os, dar și vârsta față de metabolismul animalului apar atunci când vine vorba de această localizare (Johnston ș.a., 1999).

În ceea ce privește localizarea tetraciclinei în dentină, aceasta este foarte sensibilă în cazul vulpilor sub 1 an și jumătate și totodată permite stabilirea momentului ingerării momelii (Robardet, 2012). Ultima localizare în ciment este cea mai importantă întrucât ne permite să stabilim cu precizie vârsta vulpilor (>10 luni) (Johnston ș.a., 1999), singurul dezavantaj fiind reprezentat de faptul că fixarea tetraciclinei în ciment poate fi slabă (Robardet, 2012).

10.1.4 CONCLUZII PARȚIALE

Efectuarea vaccinării antirabice a carnivorelor domestice și a celor sălbatice reprezintă singura cale prin care rabia poate fi prevenită, controlată și eradicată. Prezența anticorpilor antirabici neutralizanți în sângele animalelor este un indicator precis al eficacității vaccinării.

Din totalul celor 345 de probe de vulpi analizate cu ajutorul kit-ului ELISA BioPro, 98 au fost pozitive (28,40%) și 247 negative (71,60%). Astfel, 247 (71,60%) dintre acestea au înregistrat un PB <40%, 47 (13,62%) s-au încadrat în categoria unui PB de 40-70%, iar restul de 51 (14,78%) în ultima categorie cu un PB >70%.

În urma testării celor 47 de probe prin intermediul kit-ului Platelia Rabies, 14 dintre acestea au fost pozitive și 33 negative la detecția anticorpilor antirabici.

Numărul redus de probe pozitive înregistrat la vulpi pentru detecția anticorpilor antirabici prin testul ELISA, poate fi atribuit unor factori ce nu au fost respectați atunci când au fost puse în aplicare aceste campanii de vaccinare. Astfel, dinamica populației de vulpi, sezonul de reproducție, imunitatea maternală și răspunsul imunologic al puilor de vulpe și momentul optim pentru vaccinarea acestora sunt doar câțiva factori ce pot avea un impact puternic atunci când este vorba de campanii eficiente.

Prezența markerului vaccinal în mandibulele vulpilor a fost mult mai mare comparativ cu detecția anticorpilor antirabici postvaccinali, 60 (84%) din totalul celor 72 de probe lucrate fiind pozitive. Obținerea de date valide și interpretarea cu ușurință a rezultatelor sunt în mare parte dependente de tipul secțiunilor realizate.

10.2 Detecția anticorpilor antirabici la mistreți

În ideea de a stabili dacă mistreții intervin asupra rezultatelor acestor campanii, prin consumul necontrolat al momelilor, au fost incluse în studiu și destinate testărilor 312 probe.

10.2.1 MATERIALE ȘI METODE

Zona de studiu. Acestea au provenit din județele Suceava, Iași, Bacău, Galați, Buzău și Maramureș (Fig. 10.11), zone unde a fost pus în aplicare programul strategic privind vaccinarea orală a vulpilor, fiind testate în cadrul DSVSA-urilor pentru pesta porcină clasică.

Probe luate în studiu. Din totalul celor 312 probe, 223 au au fost reprezentate de lichid toracic, iar 89 de seruri. Toate aceste probe au fost colectate în perioada 2014-2016 după efectuarea campaniilor de vaccinare orală, respectiv după sezonul de vânătoare.



Fig. 10.11 Harta României cu originea geografică (verde) a probelor de mistreți (original)

Fig. 10.11 Romanian map with the geographical origin (green colour) of the wildboars samples (original)

Detecția și titrarea anticorpilor antirabici postvaccinali la vulpi a fost realizată prin intermediul a 2 metode serologice ELISA (kit-ul BioPro) și FAVN, prima dintre acestea fiind descrisă pe larg în cadrul subcapitolului 10.1. În continuare este descrisă metoda de referință FAVN.

Materiale și echipamente necesare:

- incubator CO₂ SANYO; vortex: IKA^R Vortex 4 basic;
- microscop UV (Olympus BX41); microscop Lordil AE 2000; cameră Neubauer (Optik Labor, Germania); mediul de cultură DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco by life technologies, UK); ser fetal bovin 10% (SFB 10%, Sigma^R Life Science, UK);
- linia celulară BHK-21; conjugat FUJIREBIO (Fujirebio Diagnostics, Inc. Malvern, PA, USA); plasmocin 0,02% (antimicoplasmic); penicilina 10.000 UI, Streptomicina 10.000 μg, Amfotericin 25 μg; acetonă 80% (Thermo Chemical, UK).

Testul de virus-neutralizare al anticorpilor fluorescenți (Fluorescent Antibody Virus Neutralization - FAVN)

Testul FAVN a fost realizat conform metodologiei descrise de către Cliquet ș.a. în anul 1998.

Pregătirea și distribuirea mediului de cultură DMEM. Înainte de utilizare, acesta a fost suplimentat cu antibiotic 1% (Penicilina 10.000 UI, Streptomicina 10.000 μg, Amfotericin 25 μg), antimicoplasmic Plasmocin 0,02% (2,5 μg/ml) și 10% ser fetal bovin.

Numerotarea plăcilor și distribuirea mediului în godeuri a fost realizată după cum urmează: 150 μl în godeurile destinate controlului CVS-11 și celor destinate controlului celular; 100μl în godeurile destinate controlului pozitiv (ser provenit de la câine vaccinat) și negativ (ser provenit de la câine nevaccinat); 100 μl în godeurile unde vor fi inoculate probele de testat. De regulă, prima placă ELISA este destinată doar controalelor.

Inocularea probelor de testat. Odată distribuit mediul de cultură, probele au fost vortexate, inoculându-se în godeurile destinate, câte 50 µl în 4 replicare, realizându-se mai departe diluțiile seriate (per placă au fost inoculate 3 probe).

Pregătirea tulpinii CVS-11. Aceasta a constat în decongelarea virusului rabic (tulpina CVS-11) în gheață și resuspendarea unei cantități de 25 µl în 30 ml mediu DMEM. Odată reconstituit, acesta a fost distribuit în cantitate de 50 µl în fiecare godeu în parte (în placa control a fost realizată diluția seriată).

Incubarea și pregătirea suspensiei celulare. Plăcile au fost mai departe incubate în atmosferă cu 5% CO₂ timp de 1 h. Este foarte importantă utilizarea acestui tip de incubator pentru a împiedica mediul să devină acid, ceea ce ar duce la moarte celulară.

Odată scoase plăcile de la incubat, în fiecare godeu în parte au fost adăugați câte 50 µl din suspensia celulară BHK-21, la concentrația finală de 4×10^5 celule/ml (pregătirea celulelor BHK-21 a fost realizată conform procedurilor descrise în capitolul VI). În continuare, plăcile au fost introduse în incubator la 37°C timp de 48 h.

Fixarea în acetonă, colorarea și citirea rezultatelor. După incubare, plăcile au fost verificate pentru citotoxicitate. Aceasta apare în special în cazul lichidelor toracice provenite de la animalele sălbatice și poate fi observată de regulă în prima linie (n=4 godeuri) unde este inoculată proba, posibil chiar și la linia următoare. Verificarea a fost realizată prin analiza plăcilor la lumina zilei, astfel încât un substrat celular transparent sau translucid a indicat un semn clar de citotoxicitate, acesta fiind în condiții normale opac. O altă variantă de verificare a fost cea realizată la microscop, unde a fost folosită lumina albă (nu UV) pentru a observa prezența sau absența celulelor BHK-21. De precizat faptul că, dacă se analizează la lumina UV, citotoxicitatea nu poate fi diferențiată de un rezultat negativ.

Astfel, conținutul plăcilor a fost îndepărtat, acestea fiind spălate cu TFS pentru a îndepărta orice urmă de mediu și probe. A fost realizată o primă spălare cu acetonă, pentru a îndepărta resturile de TFS; dacă nu se realizează acest pas înainte de fixarea în acetonă, TFS-ul rămas se va amesteca cu acetona, iar cea din urmă nu va mai fi în concentrație de 80%, ci mai scăzută, și asta datorită diluării celor 2 substanțe. Ulterior a fost realizată fixarea în acetonă 80% (800 ml acetonă pură + 200 ml apă distilată) urmată de incubarea plăcilor în hotă, la temperatura camerei, timp de 30 minute. Pentru fixarea acetonei în celule este nevoie și de prezența apei, acesta fiind motivul pentru care nu se folosește acetona pură.

După scurgerea timpului, conținutul a fost aruncat, iar plăcile au fost lăsate să se usuce în hotă. Următorul pas a constat în colorarea plăcilor prin adăugarea a câte 50 µl per godeu de conjugat Fujirebio urmată de o incubare la 37°C, timp de 30 minute. A fost ales pentru colorare acest conjugat în favoarea Bio-Rad-ului, întrucât acesta nu se fixează pe toate variantele de virus rabic, fiind mai specific (RABV clasic). În continuare, conținutul a fost îndepărtat, iar plăcile spălate cu TFS, lăsate la uscat în hotă timp de 10 minute și citite la microscopul cu UV.

10.2.2 REZULTATE

10.2.2.1 Detectia anticorpilor antirabici la mistreți prin intermediul testului ELISA

Criteriile de validare sunt descrise în subcapitolul 10.1. Pentru detecția anticorpilor antirabici, a fost utilizat kit-ul ceh *BioPro ELISA*. Astfel, au fost luate în studiu, un total de

312 probe, din care 154 de pe raza județului Iași, 42 din județul Buzău, 106 din județul Galați și 10 din județul Maramureș, numărul de probe pozitive și negative regăsindu-se în tabelul 10.6.

Tabel 10.6 / Table 10.6

Numărul total de probe de mistreți testate, din județele luate în studiu / The total number of the wild boars samples from the study area

Județ	Total probe testate	Probe pozitive	Probe negative
Iași	154	71	83
Buzău	42	1	41
Galați	106	50	56
Maramureș	10	10	0
Total	312	132	180

Astfel, din totalul celor 312 probe de mistreți testate, 132 au fost pozitive (42,30%) și 180 negative (57,70%) prin intermediul metodei serologice ELISA (Fig. 10.12).

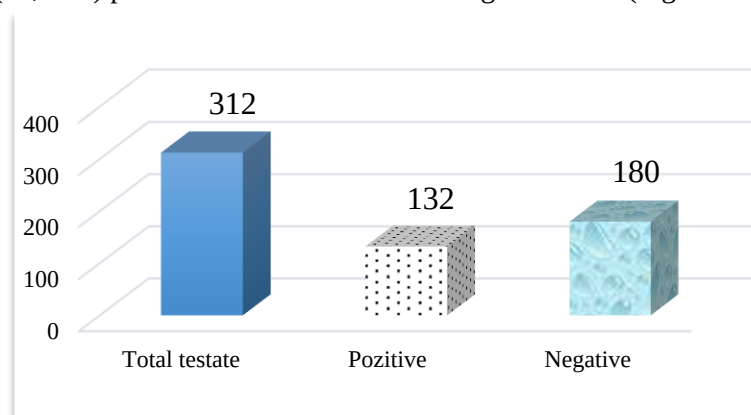


Fig. 10.12 Rezultatele obținute în cadrul metodei serologice ELISA pentru detecția anticorpilor antirabici la mistreți / Fig. 10.12 The results of the serological ELISA method for the detection of antirabies antibodies in wild boars

Din județul Iași a fost luat în studiu cel mai mare număr de probe de mistreți, și anume un total de 154, din diferite fonduri de vânătoare (FC 8 Sirețel, FC 9 Bahlui, FC 22 Turia-Perieni, FV 37 Gheorghioaia, FC 38 Horlești, FC 40 Mogoșești, FC 41 Bârnova, FC 42 Poieni, FC 43 Schitu-Duca, FC 49 Gorban, FV 44 Pietrosu/ FV 46 Brădicești, FC 50 Răducaneni, FV 51 Grajduri, FC 52 Mironeasa, FC 53 Tibana, Gheorghioaia / Comuna Sinești, OS Podu Iloaiei). Astfel, în urma detecției anticorpilor antirabici, 71 au fost pozitive, reprezentând 46,10% din totalul probelor testate, iar 83 au fost negative reprezentând 53,90%.

Astfel, în categoria PB >70% s-au încadrat 60 de probe, cu o DO cuprinsă între 0,230-0,934 și o variație a PB-ului între 71,29-100,56. În categoria PB 40%-70% au fost încadrate 11 probe, cu o DO cuprinsă între 0,843-1,581 și un PB cuprins între 42,94-69,81 (Tabel 10.7).

Tabel 10.7 / Table 10.7

Procentul de blocare 40-70%, respectiv >70% și densitatea optică aferentă probelor pozitive de mistreți din județele luate în studiu / Blocking percentage of 40-70% and >70%, the optical density, respectively, for the wildboars positive samples of the studied counties

Județ	Probe pozitive	PB 40-70%		DO	PB >70%		DO
		Nr. Pb.	Valori		Nr. Pb.	Valori	
Iași	71	11	42,92-69,81	0,843-1,581	60	71,29-100,56	0,230-0,934
Galați	50	8	53,58-67,83	0,922-1,230	42	73,19-100,65	0,165-0,815
Buzău	1	1	58,46	0,745	0	0	0
Maramureș	10	1	51,75	1,374	9	51,75-84,81	0,596-1,374

Din cele 106 seruri testate din județul Galați, 50 au fost pozitive (47,17%) la detecția de anticorpi antirabici, iar 56 negative (52,83%). În categoria PB 40%-70% s-au încadrat 8 probe din cele 50 pozitive, PB-ul variind între 53,58-67,83, iar DO între 0,922-1,230. În categoria PB >70% s-au încadrat 42 de probe din cele 50 pozitive, PB-ul situându-se între 72,19-100,65, iar DO între 0,165-0,815 (Tabel 10.7).

Din județul Buzău au fost testate 27 de lichide toracice provenite din diferite fonduri de vânătoare (FV 19, 24, 26, 27, 28, 31, 40, 41, 42, 45, 46 și 48). În urma testării acestora prin intermediul metodei serologice ELISA, doar o singură probă a fost pozitivă, înregistrându-se o DO de 0,745 și un PB de 58,46 (Tabel 10.7).

Din totalul celor 10 probe de lichid toracic provenite din județul Maramureș, toate (100%) au fost pozitive pentru detecția de anticorpi antirabici consecutiv ingerării de momeli vaccinale. Astfel, 9 dintre acestea s-au încadrat în categoria PB >70%, cu o variație a DO între 0,596-1,374 și a PB-ului între 51,75-84,81. O singură probă s-a încadrat în categoria PB 40-70%, înregistrând o DO de 1,374 și un PB de 51,75% (Tabel 10.7).

În cadrul județelor Suceava și Bacău, au fost testate 4, respectiv 11 probe de mistreți, toate fiind negative la detecția de anticorpi antirabici.

Din totalul celor 312 probe testate, 180 de probe au fost negative cu un PB situat sub 40%, 20 de probe au fost pozitive cu un PB 40%-70% și 111 intens pozitive, cu un PB >70%, echivalent cu o valoare egală sau mai mare de 0,50 UI/ml (Fig. 10.13).

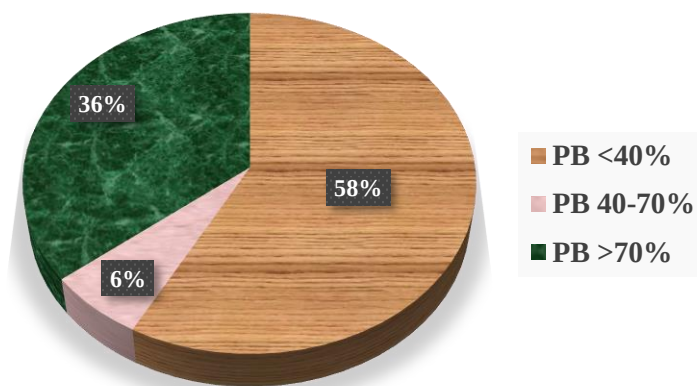


Fig. 10.13 Reprezentarea grafică a procentului de blocare al celor 312 probe de mistreți testate. PB <40% reprezintă probe negative, PB 40-70% reprezintă probe pozitive, iar PB >70%, probe pozitive cu un nivel mai mare de 0,5 UI/ml de anticorpi postvaccinali / Fig. 10.13 Graphical representation of the blocking percentage

(PB) of the 312 wildboars samples tested. PB <40% represents negative samples, PB 40-70% positive samples and PB > 70% positive samples with a level equal or greater than 0.5 IU / ml of postvaccinal antibodies

10.2.2.2 Detectia anticorpilor antirabici la mistreți prin intermediul metodei de referință FAVN

Rezultatele obținute sunt de tip cantitativ, „totul sau nimic”. Pentru validarea rezultatelor, citirea plăcii de control este indispensabilă.

Astfel, în cazul în care există anticorpi postvaccinali în proba de testat, aceștia vor neutraliza virusul, care la rândul lui nu va mai pătrunde în celulă, și astfel nu va mai fi observată fluorescență la examinarea cu microscopul UV.

Calcularea titrului. Acesta a fost realizat utilizând metoda Spearman-Kärber:

$$\text{Log10 (diluție 50)} = - \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \Sigma \frac{r_i}{n_i} \right) \text{ unde,}$$

Log 10 (diluție 50): logaritmul diluției unde găsim 50% din godeurile pozitive;

x_0 : - (log10 a celei mai mici diluții cu toate godeurile negative);

d: log10 al etapei de diluție;

r_i : numărul godeurilor negative;

n_i : numărul replicatelor.

Rezultatele (numărul de godeuri negative/pozitive) au fost trecute într-un tabel excell, unde s-a calculat automat titrul pe baza formulei mai sus menționate. Pentru ca o probă să fie considerată pozitivă este nevoie de un titru minim de 0,50 UI/ml.

Pentru a verifica sensibilitatea testului serologic ELISA, 56 dintre probele confirmate pozitive au fost retestate și prin metoda de referință FAVN. Acestea au provenit de pe raza județului Iași, selecția probelor pentru realizarea testului FAVN făcându-se în funcție de cantitatea de probă rămasă disponibilă.

Tabel 10.8 / Table 10.8

Rezultatele obținute pentru cele 56 de probe testate prin intermediul testelor serologice ELISA și FAVN / The results obtained for the 56 samples tested by ELISA and FAVN serological tests

Nr. probă	Rezultat ELISA PB%	Rezultat FAVN UI/ml	Concordanță
1	95,22	1,51	Da
2	89,79	1,15	Da
3	96,38	7,92	Da
4	64,33	1,51	Da
5	95,33	18,15	Da
6	96,47	3,46	Da
7	88,44	0,02	Nu
8	98,50	4,56	Da
9	96,35	4,56	Da
10	68,23	2,62	Da
11	85,17	10,45	Da
12	88,86	0,87	Da
13	95,66	10,45	Da
14	78,87	2,62	Da
15	86,22	6,01	Da

Nr. probă	Rezultat ELISA PB%	Rezultat FAVN UI/ml	Concordanță
16	97,34	1,51	Da
17	61,26	0,66	Da
18	84,44	1,51	Da
19	100,56	4,56	Da
20	96,15	3,46	Da
21	56,85	0,66	Da
22	91,90	1,51	Da
23	102,02	31,55	Da
24	54,98	0,66	Da
25	93,33	6,01	Da
26	86,00	1,15	Da
27	88,08	0,66	Da
28	77,68	1,51	Da
29	98,55	6,01	Da
30	94,90	4,56	Da
31	83,91	0,22	Nu
32	96,41	6,01	Da
33	91,63	1,51	Da
34	79,25	0,87	Da
35	86,09	18,15	Da
36	96,58	1,99	Da
37	88,86	1,51	Da
38	91,31	4,56	Da
39	96,04	4,56	Da
40	92,52	4,56	Da
41	71,29	3,46	Da
42	70,45	4,56	Da
43	92,48	4,56	Da
44	85,31	2,62	Da
45	74,73	31,55	Da
46	98,93	13,77	Da
47	96,89	13,77	Da
48	95,22	4,56	Da
49	99,55	3,46	Da
50	49,92	1,51	Da
51	100,08	1,51	Da
52	47,07	1,51	Da
53	87,80	2,62	Da
54	86,87	1,15	Da
55	96,21	2,62	Da
56	75,30	2,62	Da

Astfel, în urma efectuării celor 2 teste serologice, sensibilitatea testului FAVN a fost de 100%, iar pentru ELISA de 96,42%. Pentru 2 din cele 56 de probe testate prin intermediul FAVN-ului, titrul de anticorpi a fost de 0,02 UI/ml, respectiv 0,22 UI/ml, rezultate aflate în discordanță cu cele obținute la ELISA.

Repartizarea rezultatelor obținute prin intermediul metodei de referință FAVN în 5 categorii în funcție de titrul de anticorpi antirabici postvaccinali obținut / Distribution of the results obtained by FAVN reference method in 5 categories according to the postvaccinate antirabies antibody titre obtained

FAVN					
Categorie titru de atc UI/ml	< 0,5 UI/ml	0,5 – 1 UI/ml	1 – 2 UI/ml	2 – 5 UI/ml	≥ 5 UI/ml
Nr. probe	2	6	15	20	13

Astfel, sub nivelul de 0,5 UI/ml considerat unul neprotectiv față de o posibilă infecție cu virusul rabic, s-au încadrat 2 probe (nr. 7 și 31). Prima probă testată prin intermediul ELISA a înregistrat un PB de 88,44%, această valoare fiind considerată echivalentă cu 0,5 UI/ml atc anti-rabici postvaccinali, iar la reconfirmarea prin testul FAVN, aceasta a înregistrat o valoare de 0,02 UI/ml, fiind considerată negativă. Întrucât valoarea de diagnostic finală îi este atribuită testului de referință FAVN, în cazul de față poate fi vorba de un rezultat fals pozitiv obținut în cadrul testului ELISA.

Pentru cea de-a doua probă, a fost obținut un PB de 83,91% la testul ELISA, considerată o valoare intens pozitivă ca și în cazul primei probe, iar la FAVN un titru de 0,22 UI/ml, sub nivelul de protecție. Totuși, această valoare scăzută poate fi un indicator că, mistrețul în cauză a ingerat o mică parte dintr-o momelă. De asemenea, nu trebuie ignorată influența genetică asupra răspunsului imunologic al fiecărui individ în parte.

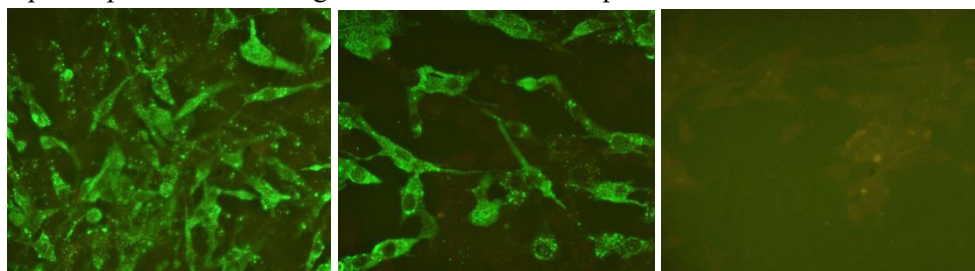


Fig. 10.14 A) FAVN negativ, mistreț SV, 2014, magnitudinea x400; B) FAVN negativ, mistreț SV, 2014, magnitudinea x400; C) FAVN pozitiv, mistreț, BC, 2015, magnitudinea x400 (original)

Fig. 10.14 A) Negative FAVN, wildboar, SV city, 2014, magnitude of x400; B) Negative FAVN, wildboar, SV city, magnitude of x400; C) Positive FAVN, wilboar, Babău city, 2015, magnitude of x400 (original)

10.2.3 DISCUȚII

Puține cercetări ce au avut ca scop detecția anticorpilor antirabici la mistreți au fost realizate până în prezent. Cu toate acestea, această specie a trezit interesul unor cercetători, obținând rezultate neașteptate.

Primul studiu ce a vizat mistreții, dar și căprioarele, respectiv cerbii, a fost întreprins în anul 1988 de către Paquot A. ș.a. pe teritoriul Belgiei, unde au reușit să pună în evidență markerul vaccinal în oasele acestor animale, consecutiv distribuției de momeli vaccinale în teritoriu, demonstrând faptul că aceste specii reprezintă potențiali competitori pentru consumul momelilor. Un alt studiu realizat de către Kierdorf și Ruhe în anul 2002 a arătat prezența markerului vaccinal în dinții mistreților.

Însă, câțiva ani mai târziu, în urma unor cercetări realizate de către Cliquet ș.a. în anul 1995 pe teritoriul Franței, pe lângă determinarea markerului vaccinal în mandibulele mistreților au reușit să pună în evidență și anticorpii antirabici în serul acestor animale într-un procentaj crescut de 40% (43/107 probe), fiind primul studiu ce a arătat prezența acestor anticorpi la mistreți după efectuarea campaniilor de vaccinare orală.

Cel de-al doilea studiu ce a vizat detecția anticorpilor antirabici a fost realizat de către Vengust ș.a. în anul 2011 în Slovenia, unde a fost analizat un număr mult mai mare de probe de mistreți, 28% (209/746) dintre acestea prezentând anticorpi antirabici postvaccinali.

În cadrul studiului nostru, din totalul celor 312 probe de seruri și lichid toracic din zona de cercetare (Iași, Buzău, Galați și Maramureș), 42,30% (132/312) au prezentat anticorpi antirabici prin intermediul testului ELISA, consecutiv distribuției de momeli vaccinale. Pentru a face o comparație cu metoda de referință FAVN, 56 de probe confirmate pozitive prin ELISA au fost retestate și prin FAVN. Astfel, din totalul celor 56 de probe, 54 dintre acestea au fost pozitive la ambele metode. Pentru 2 dintre probe, rezultatele au fost diferite, acestea fiind pozitive la ELISA, însă au reacționat negativ la FAVN cu un titru de 0,02 și 0,22 UI/ml. Titrul de 0,22 UI/ml indică totuși o prezență al acestor anticorpi, fie el chiar și într-o cantitate scăzută. Întrucât valoarea finală de diagnostic îi este atribuită testului FAVN, fiind cel de referință, am putea vorbi de 2 rezultate fals pozitive în cadrul testului ELISA, înregistrând o sensibilitate de 96,43%.

Întrucât valorile acestor anticorpi au variat, unele probe fiind intens pozitive, altele mai puțin, pot fi datorate mai multor situații, fie unii dintre mistreți au ingerat mai multe momeli, fie au mușcat doar o mică parte din momeală, dar nu trebuie omise și influența genetică alături de răspunsul imunologic al fiecărui individ în parte.

Aceste studii scot în evidență faptul că, mistreții reprezintă un adevărat pericol pentru buna desfășurare a campaniilor de vaccinare orală a vulpilor, fiind principalii competitori pentru consumul momelilor. Ținând cont de faptul că, sunt zone unde densitatea acestor animale este foarte mare, ar trebui luat în calcul suplimentarea momelilor vaccinale în cadrul campaniilor de vaccinare orală.

10.2.4 CONCLUZII PARȚIALE

Detecția anticorpilor antirabici din probele de mistreți prin testul ELISA a evidențiat un număr surprinzător de probe pozitive (132/312), acestea fiind primele date raportate la această specie până în prezent în țara noastră.

În urma testării a 56 de probe în paralel prin intermediul celor 2 metode (ELISA și FAVN), testul ELISA a prezentat o sensibilitate de 96,43%.

Rezultatele noastre, alături de cele publicate până în prezent, scot în evidență faptul că, aceste animale sălbatice reprezintă un adevărat pericol pentru buna desfășurare a campaniilor de vaccinare orală a vulpilor, fiind principalii competitori pentru consumul momelilor.

CAPITOLUL XI

CONCLUZII FINALE

În urma cercetărilor epidemiologice, serologice și moleculare realizate în cadrul tezei de doctorat privind rabia la animale, se desprind următoarele concluzii finale:

1. Prevalența cazurilor pozitive de rabie la animalele domestice, raportată la cele 781 de probe primite la laborator cu suspiciunea de rabie, în perioada 2010-2016 în nord-estul țării noastre a fost de 24,07%. Specia domestică cea mai afectată a fost reprezentată de către bovine cu un total de 103 cazuri (13,19%); cele mai multe cazuri pozitive de rabie la animalele domestice au fost confirmate pe raza județului Iași cu un total de 48 de cazuri (6,14%).

2. Prevalența cazurilor pozitive de rabie la animalele sălbatice, raportată la cele 1314 probe pentru aceeași perioadă luată în studiu a fost de 23,05%. Cele mai afectate au fost vulpile cu un total de 284 de cazuri (21,61%); cele mai multe cazuri pozitive de rabie la animalele sălbatice au fost raportate în județul Suceava cu un total de 93 de cazuri (7,07%).

3. În ceea ce privește situația cazurilor de rabie din Republica Moldova, din totalul celor 1150 de probe provenite de la animalele domestice din perioada 2010-2016, 573 au fost pozitive, iar diferența de 577 negative, înregistrându-se o prevalență totală de 49,82%. Cele mai multe cazuri au fost confirmate la bovine cu un total de 255, reprezentând 22,17%.

4. Din totalul celor 305 probe provenite de la animalele sălbatice din Republica Moldova, 191 au fost confirmate pozitive și 114 negative, înregistrându-se o prevalență totală de 62,62%. Specia sălbatică cea mai afectată a fost vulpea, cu un total de 158 de cazuri pozitive (51,80%).

5. Confirmarea diagnosticului de rabie a probelor luate în studiu, utilizând tehnica de imunofluorescență directă (IFD), a fost realizată în cazul tuturor celor 59 de probe, atât din nord-estul României, cât și din Republica Moldova, rezultatele obținute fiind în concordanță cu toate tehnicile realizate ulterior, nefiind înregistrate rezultate fals negative sau fals pozitive, demonstrându-se sensibilitatea și specificitatea tehnicii în cauză.

6. În cadrul studiului comparativ privind cele 3 tipuri de conjugate utilizate în cadrul tehnicii IFD, cele mai bune rezultate au fost obținute cu ajutorul conjugatului Bio-Rad, rezultate superioare celorlalte două, acesta oferind o intensitate crescută a semnalului fluorescent și un fundal întunecat, fiind capabil să identifice antigenul viral în 100% din câmpurile microscopice examinate într-un număr crescut de probe.

7. Tehnica de izolare a virusului rabic pe culturi celulare a fost realizată pentru toate cele 59 de probe, rezultatele fiind în concordanță cu cele obținute la IFD și tehnicile de biologie moleculară. Aceasta poate fi realizată cu succes în caz de rezultate negative sau dubioase obținute la IFD și ar trebui să înlocuiască proba biologică pe șoareci oricând este posibil.

8. Izolarea virusului rabic pe linia celulară N2a este la fel de sensibilă ca și proba biologică pe șoareci, chiar și în cazul probelor cu o concentrație redusă de virus rabic.

9. Linia celulară N2a este cea mai sensibilă pentru izolarea și multiplicarea virusului rabic, rezultatele studiilor noastre fiind în concordanță cu cele raportate în literatura de specialitate.

10. În cadrul cercetărilor privind utilizarea unor sisteme diferite pentru izolarea virusului rabic în culturi celulare, cele mai bune rezultate au fost obținute în cadrul sistemului LabTek, concentrația celulară de 8×10^5 celule/ml fiind considerată a fi optimă pentru o bună izolare și multiplicare a virusului rabic.

11. Rezultatele probelor testate prin intermediul tehnicilor de biologie moleculară au fost în concordanță cu cele obținute la diagnosticul de confirmare (IFD și RTCIT), nefiind înregistrate rezultate fals pozitive sau negative.

12. Utilizarea tehnicilor moleculare reprezintă un instrument adițional pentru detecția lyssavirusurilor, fiind utilizate cu succes în cazul probelor aflate în stare avansată de putrefacție, conservate în condiții improprie sau pentru o perioadă îndelungată de timp (-80°C).

13. Secvențierea parțială și completă a nucleoproteinei virusului rabic a fost realizată pentru prima dată pe probe provenite atât de la animale domestice, cât și sălbatice din Republica Moldova, semnalându-se primul grup filogenetic identificat pe teritoriul acestei țări.

14. În ceea ce privește analiza filogenetică realizată în nord-estul țării noastre, a fost identificat grupul filogenetic NEE, fiind semnalată pentru prima dată prezența acestuia în județele Botoșani, Iași, Vaslui, Galați și Vrancea.

15. Secvențierea completă a nucleoproteinei a fost pentru prima dată realizată pe probe provenite din zonele noastre de studiu, nefiind raportate date până în prezent.

16. Secvențierea de nouă generație a fost realizată pentru prima dată atât în țara noastră, cât și în Republica Moldova pe probe provenite de la animale domestice și sălbatice.

17. În urma analizelor bioinformatică întreprinse, probele noastre au înregistrat un procentaj de similaritate a secvențelor celor 5 gene ale virusului rabic cuprins între 96-100%.

18. Consecutiv studierii pozițiilor de aminoacizi ale genei G a virusului rabic, cunoscute ca fiind implicate în patogenitate, nu au fost identificate modificări care pot sugera diferențe de patogenitate la nivel de specie animală.

19. Pentru o mai bună înțelegere a diversității lyssavirusurilor, respectiv a diferențelor de patogenitate sunt necesare studii aprofundate care să implice un areal geografic mai extins, dar și un număr mai ridicat de probe.

20. În cadrul tehnicilor serologice, din totalul celor 345 de probe (lichid toracic) de vulpi lucrate cu ajutorul kit-ului BioPro, 98 au fost pozitive (28,40%) și 247 negative (71,60%) prin intermediul testului ELISA la detecția anticorpilor antirabici consecutiv distribuției momelilor vaccinale. Astfel, 247 (71,60%) dintre acestea au înregistrat un PB <40%, 47 (13,62%) s-au încadrat în categoria unui PB de 40-70%, iar restul de 51 (14,78%) în ultima categorie cu un PB >70%.

21. În urma testării a 47 de probe prin intermediul kit-ului Platelia Rabies pentru detecția anticorpilor antirabici din lichidele toracice ale vulpilor, 14 (29,79%) dintre acestea au fost pozitive și 33 (70,21%) negative.

22. Prezența markerului vaccinal în mandibulele vulpilor a fost într-o prezență mult mai mare comparativ cu detecția anticorpilor antirabici postvaccinali, 60 (84%) din totalul celor 72 de probe lucrate fiind pozitive. Obținerea de date valide și interpretarea cu ușurință a rezultatelor sunt în mare parte dependente de tipul secțiunilor realizate.

23. Detecția anticorpilor antirabici din serurile, respectiv lichidele toracice de la mistreți prin intermediul testului ELISA a evidențiat un număr surprinzător de probe pozitive, și anume un total de 132 (42,30%) din totalul celor 312 testate, acestea fiind primele date raportate la această specie până în prezent în țara noastră. Rezultatele noastre scot în evidență faptul că, aceste animale sălbatice reprezintă un adevărat pericol pentru buna desfășurare a campaniilor de vaccinare orală a vulpilor, fiind principalii competitori pentru consumul momelilor

24. În urma testării a 56 de probe pozitive de mistreți utilizând atât metoda de referință FAVN, cât și testul ELISA, cel din urmă a înregistrat o sensibilitate de 96,43%.

CHAPTER XI. FINALS CONCLUSIONS

Following the epidemiological, serological and molecular researches performed in the Phd thesis, regarding animal rabies, this final conclusions are drawn:

1. The prevalence of positive rabies cases in domestic animals from the total of 781 samples received at the laboratory with rabies suspicion, collected between 2010-2016 from the north-est of our country was 24,07%. The most affected domestic species was bovines with a total of 103 cases (13,19%); most of them confirmed in Iasi county area with a total of 48 cases (6,14%).

2. The prevalence of positive rabies cases in wild animals from the total of 1314 samples collected in the same period was 23,05%. The most affected were foxes with a total of 284 cases (21,61%); the highest number of positive cases in wild animals was reported in Suceava county with a total of 93 cases (7,07%).

3. Regarding the rabies cases situation in the Republic of Moldova, from the total of 1150 samples collected from domestic animals during 2010-2016, 573 were found positive with a prevalence of 49,82%. The highest number of confirmed cases were from bovines with a total of 255, representing 22,17%.

4. From the total of 305 samples collected from wild animals from Republic of Moldova, 191 were confirmed to be positive with a prevalence of 62,62%. The most affected wild species was the fox with a total of 158 positive cases (51,8%).

5. Confirming the rabies diagnostic for the samples taken into study, using the FAT technique was done for all the 59 samples, both from the North-Est of Romania and Republic of Moldova, the results obtained being in accordance with those obtained using all the techniques done afterwards, without having any false positive or negative, this way demonstrating the specificity and sensitivity of the technique in cause.

6. Within the comparative study between the 3 conjugates used for FAT, the best results were obtained for the BioRad conjugate, the results being superior in comparison with the other two, offering a high intensity of the fluorescent signal and a dark background, being able to identify the viral antigen in 100% of the microscopic examined fields for a high number of samples.

7. The rabies virus isolation technique on cell cultures was performed for all the 59 samples, the results being in accordance with those obtained using FAT and the molecular biology techniques. This can be used with success for negative or dubious results obtained with FAT and should replace the mice biological sample whenever possible.

8. The isolation of the rabies virus on the cell line N2a is as sensitive as mouse inoculation test, even for samples with a low virus concentration.

9. The cellular line N2a is the most sensitive for isolation and multiplication of the rabies virus, the results of our studies being in accordance with those reported in the specialty literature.

10. During the researches regarding the use of different systems for isolating the rabies virus in cell cultures, the best results were obtained for the LabTek system, the cell concentration being considered optimal for the isolation and multiplication of the virus.

11. The results obtained using molecular biology techniques were in accordance with those obtained for diagnostic confirmation, without any false positive or negative results.

12. The use of molecular techniques represents an additional instrument in detecting lyssaviruses, being successfully used for samples that are in an advance state of decomposing, conserved in improper conditions or for a long period of time (-80 C).

13. Partial and complete sequencing of rabies virus nucleoprotein was realized for the first time on samples collected from both domestic and wild animals from Republic of Moldova, noticing the first phylogenetic group identified on the territory of this country.

14. Regarding the phylogenetic analyze performed in the north-est of our country, the phylogenetic group NEE was identified, being found for the first time in the counties Botosani, Iasi, Vaslui, Galati and Vrancea.

15. The complete sequencing of the nucleoprotein was performed for the first time on samples collected from our study areas; no complete sequences being reported until now.

16. Next generation sequencing was performed for the first time in our country and Republic of Moldova on samples from both domestic and wild animals.

17. Following the bioinformatic analysis undertaken our samples showed a similarity percentage of the five rabies genes sequences between 96-100%.

18. As a consequence of studying the amino acid positions of the rabies virus gene G, known to be involved in pathogenicity, no changes have been identified that may suggest differences in pathogenicity at the animal species level.

19. For a better understanding of the diversity of lyssaviruses and pathogenicity differences, in-depth studies involving a larger geographic area and a larger number of samples are required.

20. For the serological techniques, out of the total of 345 samples (thoracic liquid) collected from foxes using the Bio-Pro kit, 98 were positive (28.4%) and 247 negative (71,6%) trough ELISA test for detection of antibodies after vaccine bait distribution. This way, 247 (71,6%) registered a PB<40%, 47 (13,62%), were registered in the category of a PB of 40-70% and the rest of 51 (14,78%) in the last category with a PB>70%.

21. After testing 47 samples of thoracic fluid from foxes, using the Platelia Rabies kit for detecting rabies antibodies, 14 (29,79%) were found positive and 33 (70,21%) negative.

22. The presence of vaccine marker in foxes mandibles was much higher in comparison with post vaccine anti rabies antibodies detection, 60 (84%) out of the total of 72 samples found positive. Obtaining valid data and the ease of interpretation of the results is mostly dependent on the type of sections done.

23. The anti rabies antibodies detection from serums and thoracic liquid collected from wild boars using ELISA has shown a surprisingly high number of positive samples, 132 (42.3%) out of 312, this being the first data for this species reported in our country. This results underline the fact that, this wild animals represent a real danger for the oral vaccination program for foxes, being the main competitors for consuming the baits.

24. After testing a number of 56 positive wild boar samples using the reference method FAVN as well as ELISA, the second one has registered a sensitivity of 96,43%.

BIBLIOGRAFIE

1. Acha P.N., Szyfres B., 2005 – *Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux*, Vol. II, Ediția a 3-a, pag. 326.
2. Albas A., Ferrari C.I., da Silva L.H., Bernardi F., Ito F.H., 1999 - *Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies*, Rev Soc Bras Med Trop. 1999 Jan-Feb;32(1):19-22.
3. Alvarez L., Fajardo R., Lopez E., 1994 - *Partial recovery from rabies in a nine-year-old boy*. Pediatr Infect Dis J 1994;13:1154-5.
4. ANSVSA, 2016 – *Vaccinarea antrabică la vulpi – informarea populației, transportul, depozitarea, distribuirea, testarea vaccinului antirabic cu administrare orală și a eficienței vaccinării*, Procedură specifică, Ediția 1, Revizia 3, București.
5. Arai Y.T., Kuzmin I.V., Kameoka Y., Botvinkin A.D., 2003 - *New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (Myotis blythi)*, Kyrgyzstan, Emerg Infect Dis. 2003 Mar;9(3):333-7.
6. Aubert M.F., 1992 - *Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs*, Rev Sci Tech. 11(3):735-60.
7. Baby J., Mani R.S., Abraham S.S., Thankappan A.T., Pillai P.M., Anand A.M., Madhusudana S.N., Ramachandran J., Sreekumar S., 2015 - *Natural Rabies Infection in a Domestic Fowl (Gallus domesticus): A Report from India*, PLoS Negl Trop Dis. 2015 Jul 22;9(7).
8. Badrane H., Bahloul C., Perrin P., Tordo N., 2001 -*Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity*, J Virol. 2001 Apr;75(7):3268-76.
9. Balachandran A., Charlton K., 1994 - *Experimental rabies infection of non-nervous tissues in skunks (Mephitis mephitis) and foxes (Vulpes vulpes)*, Vet Pathol. 1994 Jan;31(1):93-102.
10. Banyard A.C., Evans J.S., Luo T.R., Fooks A.R., 2014 - *Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat*, Viruses. 2014 Aug 4;6(8):2974-90.
11. Barrat J., Barrat M.J., Picard M., Aubert M.F., 1988 - *[Diagnosis of rabies by cell culture]*, Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 11(3-4):207-14
12. Bedeković T., Šimić I., Krešić N., Lojkić I., Mihaljević Ž., Sućec I., Janković I.L., Hostnik P., 2016 - *Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns*, BMC Vet Res. 12:76.
13. Beltran F.J., Dohmen F.G., Del Pietro H., Cisterna D.M., *Diagnosis and molecular typing of rabies virus in samples stored in inadequate conditions*, 2014, J Infect Dev Ctries. 2014 Aug 13;8(8):1016-21.
14. Bingham J., van der Merwe M., 2002, *Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test*, J Virol Methods. 2002 Mar;101(1-2):85-94.
15. Biswal M., Ratho R., Mishra B., 2007 - *Usefulness of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of rabies RNA in archival samples*, Jpn J Infect Dis. 2007 Sep;60(5):298-9.
16. Black E.M., McElhinney L.M., Lowings J.P., Smith J., Johnstone P., Heaton P.R., 2000 - *Molecular methods to distinguish between classical rabies and the rabies-related European bat lyssaviruses*, J Virol Methods. 2000 Jun;87(1-2):123-31.
17. Blasco E., Lambot M., Barrat J., Cliquet F., Brochier B., Renders C., Krafft N., Bailly J., Munier M., Pastoret P.P., Aubert M.F., 2001 – *Kinetics of humoral immune response after rabies VR-G oral vaccination of captive fox cubs (Vulpes vulpes) with or without maternally derived antibodies against the vaccine*, Vaccine 19(32):4805-15
18. Blenden D.C., Bell J.F., Tsao A.T., Umoh J.U., 1983-*Immunofluorescent examination of the skin of rabies-infected animals as a means of early detection of rabies virus antigen*, J Clin Microbiol.18(3):631-6.
19. Blenden D.C., Creech W., Torres-Anjel M.J., 1986 - *Use of immunofluorescence examination to detect rabies virus antigen in the skin of humans with clinical encephalitis*, J Infect Dis. 154(4):698-701.
20. Boldbaatar B., Inoue S., Sugiura N., Noguchi A., Orbina J.R., Demetria C., Miranda M.E., Yamada A., 2009 - *Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*, Jpn J Infect Dis. 2009 May;62(3):187-91.

21. Boulger L.R., Porterfield J.S., 1958 – *Isolation of a virus from Nigerian fruit bats*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 52: 421-4.
22. Bourhy H., Rollin P.E., Vincent J., Sureau P., 1989 - *Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies*, J Clin Microbiol. 27(3):519-23.
23. Bourhy H., Sureau P., 1990 – *Methodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage*, Ed. Institut Pasteur.
24. Bourhy H., Kissi B., Tordo N., 1993 - *Molecular diversity of the Lyssavirus genus*, Virology. 193 May;194(1):70-81.
25. Bourhy H., Kissi B., Smereczak M., Sadkowska-Todys, M., Kulonen K., Tordo N., Zmudzinski JF., Holmes, EC, 1999 - *Ecology and evolution of rabies virus in Europe*, J Gen Virol 80, 2545-57.
26. Bourhy H., Cowley J.A., Larrous F., Holmes E.C., Walker P.J., 2005 - *Phylogenetic relationships among rhabdoviruses inferred using the L polymerase gene*, J Gen Virol. 86(Pt 10):2849-58.
27. Bradley J.M., Epstein J.H., Neill A.S., Heel K., Field H., Barret J., 2000 - *Potential exposure to Australian bat lyssavirus, Queensland, 1996–1999*. Emerg Infect Dis 6:259–64.
28. Brochier B., Thomas I., Iokem A., Ginter A., Kalpers J., Paquot A., Costy F., Pastoret P.P., 1988 - *A field trial in Belgium to control fox rabies by oral immunisation*, Vet Rec.123(24):618-21.
29. Brochier B., Boulanger D., Costy F., Pastoret P.P., 1994 - *Towards rabies elimination in Belgium by fox vaccination using a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus*, Vaccine. 12(15):1368-71.
30. Brochier B., Costy F., Pastoret P.P., 1995 - *Elimination of fox rabies from Belgium using a recombinant vaccinia-rabies vaccine: an update*, Vet Microbiol. 46(1-3):269-79.
31. Bronnert J., Wilde H., Tepsumethanon V., Lumlertdacha B., Hemachudha T., 2007 – *Organ transplantations and rabies transmission*, J Travel Med. 14(3):177-80.
32. Bryceson A.D., Greenwood B.M., Warrell D.A., Davidson N.M., Pope H.M., Lawrie J.H., Barnes H.J., Bailie W.E., Wilcox G.E., 1975 - *Demonstration during life of rabies antigen in humans*, J Infect Dis. 131(1):71-4.
33. Bugnon P., Breitenmoser U., Peterhans E., Zanoni R., 2004 - *Efficacy of oral vaccination in the final stage of fox rabies elimination in Switzerland*, J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 51(10):433-7.
34. Bulletin-Rabies-Europe, 2017 – *Rabies Information System of the WHO*, accesat online la 06.09.2017, disponibil online la <http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/queries>.
35. Burkel M.D., Andrews M.F., Meslow E.C., 1970 - *Rabies detection in road-killed skunks (Mephitis mephitis)*, J Wildl Dis. 6(4):496-9.
36. Campbell J.B., Charlton K.M., 1988 - *Developments in Veterinary Virology – Rabies*, Ed Kluwer Academic Publishers. Cap Giagnosis of Rabies Infection (by Webster W.A., Casey G.A), pag 201-222.
37. Carp-Cărare M., Carp-Cărare C., 2001 – *Microbiologie Veterinară, Virusologie*, Ed. Venus, Iași.
38. Chacko K., Parakadavathu R.T., Al-Maslamani M., Nair A.P., Chekura A.P., Madhavan I., 2017 - *Diagnostic difficulties in human rabies: A case report and review of the literature*, Qatar Med J. 2017 Apr 21;2016(2):15.
39. CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2004 - *Recovery of a patient from clinical rabies--Wisconsin, 2004*, MMWR Morb Mortal Wkly Rep.53(50):1171-3.
40. CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2012 - *Recovery of a patient from clinical rabies--California, 2011*, MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 61(4):61-5.
41. CDC, 2017 - *The rabies virus*. Accesat online la 04.09.2017, <https://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html>.
42. Chantal J., Blancou J., 1985 – „*Le virus rabique*” în „*Information techniques des services veterinaires – Pasteur et la rage*”, Paris.
43. Charlton K.M., Webster W.A., Casey G.A., Rhodes A.J., Macinnes C.D., Lawson K.F., 1986 - *Recent advances in rabies diagnosis and research*, Can Vet J. 27(2):85-9.
44. Chhabra M., Mittal V., Jaiswal R., Malik S., Gupta M., Lal S., 2007 - *Development and evaluation of an in vitro isolation of street rabies virus in mouse neuroblastoma cells as compared to conventional tests used for diagnosis of rabies*, Indian J Med Microbiol. 25(3):263-6.
45. Chitra L., Pandit V., Kalyanaraman V.R. - 1988, *Use of murine neuroblastoma culture in rapid diagnosis of rabies*, Indian J Med Res. 87:113-6.

46. Cliquet F., Masson E., Aubert M., 1995 – *Impact de la consommation d'appâts vaccinaux antirabiques destinés aux renards sur l'immunité des sangliers contre la rage: essai sut une population contenue dans un enclos de chasse*, Ann. Med. Vet., 139, 15-19.
47. Cliquet F., Aubert M., Sagné L., 1998 - *Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody*, J Immunol Methods. 212(1):79-87.
48. Cliquet F., Aubert M., 2004 - *Elimination of terrestrial rabies in Western European countries*, Dev Biol (Basel). 119:185-204.
49. Coetzer A., Sabeta C.T., Markotter W., Rupprecht C.E., Nel L.H., 2014 - *Comparison of biotinylated monoclonal and polyclonal antibodies in an evaluation of a direct rapid immunohistochemical test for the routine diagnosis of rabies in southern Africa*, PLoS Negl Trop Dis. 8(9):e3189.
50. Conzelmann K.K., Cox J.H., Schneider L.G., Thiel H.J., 1990 - *Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19*, Virology. 175(2):485-99.
51. Crepin P., Audry L., Rotivel Y., Gacoin A., Caroff C., Bourhy H., 1998 - *Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid*, J Clin Microbiol. 36(4):1117-21.
52. **Dascalu Mihaela Anca**, Servat A., Daraban F., Velescu E., Tanase O-I., 2017(a) - *Evaluation of different anti-rabies conjugates used for rabies diagnosis confirmation*, Veterinary Medicine in Service of People – International Scientific Conference, 6-7 October 2017, Bulgaria, Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2017, 20, Suppl. 1, 162–169 ISSN 1311-1477 (print); ISSN 1313-3543 (online).
53. **Dascalu Mihaela Anca**, Servat A., Daraban F., Velescu E., Tanase O-I., 2017(b) - *The use of two different systems for the isolation of rabies virus in cell cultures*, Veterinary Medicine in Service of People – International Scientific Conference, 6-7 October 2017, Bulgaria, Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2017, 20, Suppl. 1, 219–227 ISSN 1311-1477 (print); ISSN 1313-3543 (online).
54. **Dascalu Mihaela Anca**, Servat A., Daraban F., Tanase O-I., Cliquet F., Velescu E., 2017(c) - *Comparative study regarding the sensitivity of two cell lines used for the isolation of rabies virus*, Journal of Biotechnology, Volume 256, Supplement, 30 August 2017, Pages S91.
55. **Dascalu Mihaela-Anca**, Servat A., Velescu E., Tanase O-I., Daraban F., Cliquet F., 2017(d) - *Isolation of rabies virus in mouse neuroblastoma cell line (N2a)*, Simpozion științific aniversar: Actualități în creșterea și patologia animalelor. 25-26 mai, 2017, Timișoara, Lucrări științifice, Medicină Veterinară, Vol. L(1), 2017, pag.54-60.
56. **Dascalu Mihaela-Anca**, Dan M., Daraban F., Tanase O-I., Velescu E., 2016(a) - *Preliminary study regarding the efficacy of oral vaccination campaigns against rabies in foxes in the North-East of Romania*. Journal of Biotechnology, Volume 231, Supplement, 10 August 2016, Page S73.
57. **Dascalu Mihaela-Anca**, Daraban F., Dan M., Danes D., Baraitareanu S., Tanase O-I., Velescu E., 2016(b) - *Detection of antibodies against rabies virus in foxes serum after oral vaccination campaign in Buzau and Galati Counties*, Bulletin Of University Of Agricultural Sciences And Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine VOL. 73, No. 1, 2016.
58. **Dascalu Mihaela-Anca**, Daraban (Bocaneti) F., Rusu O.R., Tanase O-I., Velescu E., 2015 - *Epidemiological statistics of rabies in animals in Moldova region, Romania, between 2010-2014*, Journal of Biotechnology, Volume 208, Supplement, 20 August 2015, Page S35.
59. David D., Yakobson B., Rotenberg D., Dveres N., Davidson I., Stram Y., 2002 - *Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains*, Vet Microbiol, 87(2):111-8
60. Debbie J.G., 1974 - *Use of inoculated eggs as a vehicle for the oral rabies vaccination of red foxes (Vulpes fulva)*, Infect Immun. 1974 Apr;9(4):681-3.
61. Delmas O., Holmes E.C., Talbi C., Larrous F., Dacheux L., Bouchier C., Bourhy H., 2008 - *Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses*, PLoS One. 3(4):e2057.
62. Deviatkin A.A., Lukashev A.N., Poleshchuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N., Karganova G.G., Galkina I.V., Shchelkanov M.Y., Shipulin G.A., 2017 - *The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation*, PLoS One. 12(2).
63. Dietzgen R.G., și Kuzmin I.V., 2012- *Rhabdoviruses – Molecular taxonomy, evolution, genomics, ecology, host-vector interaction, cytopathology and control*, Ed. Caister Academic, pag 37.

64. Dietzschold B., Wunner W.H., Wiktor T.J., Lopes A.D., Lafon M., Smith C.L., Koprowski H., 1983 - *Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus*, Proc Natl Acad Sci U S A. 80(1):70-4.
65. Dietzschold B., Wang H.H., Rupprecht C.E., Celis E., Tollis M., Ertl H., Heber-Katz E., Koprowski H., 1987 - *Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein*, Proc Natl Acad Sci U S A. 84(24):9165-9.
66. Durham T.M., Smith J.S., Reid F.L., Hale-Smith C.T., Fears M.B., 1986 - *Stability of immunofluorescence reactions produced by polyclonal and monoclonal antibody conjugates for rabies virus*, J Clin Microbiol. 24(2):301-3.
67. Dürr S., Naïssengar S., Mindekem R., Diguimbye C., Niezgoda M., Kuzmin I., Rupprecht C.E., Zinsstag J., 2008 - *Rabies diagnosis for developing countries*, PLoS Negl Trop Dis. 2(3):e206.
68. Echevarría J.E., Avellón A., Juste J., Vera M., Ibáñez C., 2001 - *Screening of active lyssavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs*, J Clin Microbiol. 39(10):3678-83.
69. Erlich H.A., 1989 - *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. Editura Stockton Press, USA.
70. Familusi J.B., Osunkoya B.O., Moore D.L., Kemp G.E., Fabiyi A., 1972 - *A fatal human infection with Mokola virus*. Am J Trop Med Hyg 21:959-63.
71. Feiden W., Metze K., 1991 - *[Immunohistochemical detection of rabies virus antigen in the cardiac ganglia of dogs in paraffin sections]*, Tierarztl Prax. 19(3):247-50.
72. Fekadu M., Shaddock J.H., Chandler F.W., Baer G.M., 1983 - *Rabies virus in the tonsils of a carrier dog*, Arch Virol. 78(1-2):37-47.
73. Fraser G.C., Hooper P.T., Lunt R.A., Gould A.R., Gleeson L.J., Hyatt A.D., Russell G.M., Kattenbelt J.A., 1996 - *Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia*, Emerg Infect Dis. 2(4):327-31.
74. Frost H.M., 1959 - *Staining of fresh, undecalcified, thin bone sections*, Stain Technol. 34(3):135-46.
75. Gamet A., 1973 - *La rage*, Ed. Presses Universitaires de France.
76. Gavier-Widen D., Duff J.P., Meredith A., 2012 - *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*, Ed. Willey-Blackwell, pag. 86.
77. Goldwasser R.A., Kissling R.E., Carski T.R., Hosty T.S., 1959 - *Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals*. Bull World Health Organ. 20:579-88.
78. Gould A.R., Hyatt A.D., Lunt R., Kattenbelt J.A., Hengstberger S., Blacksell S.D., 1998- *Characterization of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia*. Virus Res 54:165-87.
79. Hattwick MA, Weis TT, Stechschulte CJ, Baer GM, Gregg MB., 1972 - *Recovery from rabies. A case report*, Ann Intern Med. 76(6):931-42.
80. Heaton P.R., Johnstone P., McElhinney L.M., Cowley R., O'Sullivan R.E., Whitby JE., 1997 - *Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses*, J Clin Microbiol 35, 2762-6.
81. Hostnik P., Barlic-Maganja D., Toplak I., Grom J., 2003 - *The persistence of rabies virus antibodies in the sera of fox cubs*, J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 50(4):204-6.
82. ICPMBV, 2017 - *Prospect Lysvulpen*, available online at <http://www.icbm.ro/ro/nomenclator/produse?view=details&id=17227>, data accesării 10.08.2017.
83. ICTV, 2011 - *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The Online (9th) Report of the ICTV*, available online at https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/194/mononegavirales.
84. ICTV, 2016 - *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The Online (10th) Report of the ICTV*, available online at https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/.
85. ICTV, 2017 - *Taxonomic Information*, available online at <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
86. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., 1990 - *PCR Protocols, A guide to methods and applications*, Editura Academic Press, Inc., USA.
87. Institutul Național de Sănătate Publică, 2010 - *Analiza evoluției bolilor transmisibile aflate în supraveghere, Raport pentru anul 2010*, Publicat în 09.09.2016. București.

88. Institutul Național de Sănătate Publică, 2011 – *Analiza evoluției bolilor transmisibile aflate în supraveghere, Raport pentru anul 2011*, Publicat în 09.09.2016. București.
89. Institutul Național de Sănătate Publică, 2012 – *Analiza evoluției bolilor transmisibile aflate în supraveghere, Raport pentru anul 2012*, Publicat în 09.09.2016. București.
90. Institutul Național de Sănătate Publică, 2013 – *Analiza evoluției bolilor transmisibile aflate în supraveghere, Raport pentru anul 2013*, Publicat în 09.09.2016. București.
91. Institutul Național de Sănătate Publică, 2014 – *Analiza evoluției bolilor transmisibile aflate în supraveghere, Raport pentru anul 2014*, Publicat în 09.09.2016. București.
92. Institutul Național de Sănătate Publică, 2015 – *Analiza evoluției bolilor transmisibile aflate în supraveghere, Raport pentru anul 2015*, Publicat în 09.09.2016. București.
93. Ionescu D., 1952 – Turbarea, Editura de Stat pentru Litareatură Științifică.
94. Ito N., Takayama M., Yamada K., Sugiyama M., Minamoto N., 2001 - *Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice*, J Virol. 75(19):9121-8.
95. Jackson A.C., Ye H., Phelan C.C., Ridaura-Sanz C., Zheng Q., Li Z., Wan X., Lopez-Corella E., 1999 - *Extraneural organ involvement in human rabies*, Lab Invest. 79(8):945-51.
96. Jackson A.C., Wunner W.H., 2002, *RABIES*, Cap Diagnostic Evaluation (by Charles V Trimarchi and Smith Jean S.), Ed Academic Press, USA (Elsevier Science), pag 307-349
97. Jakel V., König M., Cussler K., Hanschmann K., Thiel H.J., 2008 - *Factors influencing the antibody response to vaccination against rabies*, Dev Biol (Basel). 131:431-7.
98. Jogai S., Radotra B.D., Banerjee A.K., 2002 - *Rabies viral antigen in extracranial organs: a post-mortem study*, Neuropathol Appl Neurobiol. 28(4):334-8.
99. Johnston D.H., Joachim D.G., Bachmann P., Kardong K.V., Stewart R.E.A., Dix L.M., Strickland M.A., Watt I.D., 1999 – *Aging furbearers using tooth structure and biomarkers* in Wild Furbearer Management and Conservation in North America, Section III: Management, Principles and Techniques, Ontario.
100. Johnson N., Brookes S.M., Fooks A.R., Ross R.S., 2005 - *Review of human rabies cases in the UK and in Germany*, Vet Rec. 157(22):715.
101. Kamolvarin N., Tirawatnpong T., Rattanasiwamoke R., Tirawatnpong S., Panpanich T., Hemachudha T., 1993 - *Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers*, J Infect Dis. 167(1):207-10.
102. Kappeler A Wandeler AI., 2000 - *[The development of strategies for the field application of oral immunization of foxes against rabies]*, Schweiz Arch Tierheilkd. 142(8):439-46.
103. Kemp G.E., Causey O.R., Moore D.L., Odelola A., Fabiyi A., 1972 - *Mokola virus. Further studies on IBAN 27377, a new rabies-related etiologic agent of zoonosis in Nigeria*. Am J Trop Med Hyg 21:356–9.
104. King A.A., 1996 – *Cell culture of rabies virus*, Chapter 10, in „Laboratory techniques in rabies” de Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. WHO, Geneva.
105. Kissi B., Tordo N., Bourhy H., 1995 - *Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene*, Virology.209(2):526-37.
106. Knoop E.V., Freuling C.M., Kliemt J., Selhorst T., Conraths F.J., Müller T., 2010 - *Evaluation of a commercial rabies ELISA as a replacement for serum neutralization assays as part of the pet travel scheme and oral vaccination campaigns of foxes*, Berl Munch Tierarztl Wochenschr.;123(7-8):278-85.
107. Koruk S.T., Un H., Gürsoy B., Unal N., Calışir C., Unutmaz G., Dalyan A., Aylan O., 2010 - *[A human rabies case with antemortem diagnosis]*, Mikrobiyol Bul.44(2):303-9.
108. Kouznetzoff A., Buckle M., Tordo N., 1998 - *Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA*, J Gen Virol. 79 (Pt 5):1005-13.
109. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Stombom L., Ståhlberg A, Zoric N., 2006 - *The real-time polymerase chain reaction*, Mol Aspects Med. 27(2-3):95-125
110. Kunz T.H., Parsons S., 2009 – *Ecological and behavioral methods for the study of bats*, Ediția a 2-a, Ed. The Johns Hopkins University Press, pag. 776.
111. Kusne S., Smilack J., 2005 - *Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients*, Liver Transpl. 11(10):1295-7.

112. Kuzmin I.V., Orciari L.A., Arai Y.T., Smith J.S., Hanlon C.A., Kameoka Y., Rupprecht C.E., 2003 - *Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences*, Virus Res. 2003 Nov;97(2):65-79.
113. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M., Smith J.S., Orciari L.A., Hughes G.J., Fooks A.R., Rupprecht C.E., 2004 - *Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the Former Soviet Union*, J Wildl Dis, 49(4), 617-631.
114. Kuzmin I.V., Wu X., Tordo N., Rupprecht C.E., 2008 - *Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions*, Virus Res. 136(1-2):81-90.
115. Kuzmin I.V., 2014 – *Virus isolation in animals: the mouse inoculation test*, Capitolul 2 în „Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis” de către Rupprecht C și Nagarajan T, Volumul 1, Ed Elsevier Inc.
116. Lafon M., Wiktor T. J., Macfarlan R. I 1983 - *Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies*. J. Gen. Virol. 64:843-851.
117. Lewis V.J., Thacker W.L., 1974 - *Limitations of deteriorated tissue for rabies diagnosis*, Health Lab Sci. 11(1):8-12.
118. Li Z., Feng Z., Ye H., 1995 - *Rabies viral antigen in human tongues and salivary glands*, J Trop Med Hyg. 98(5):330-2.
119. Liu P., Yang J., Wu X., Fu Z.F., 2004 - *Interactions amongst rabies virus nucleoprotein, phosphoprotein and genomic RNA in virus-infected and transfected cells*, J Gen Virol. 85(Pt 12):3725-34.
120. Lopes M.C., Venditti L.L., Queiroz L.H., 2010 - *Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions*, J Virol Methods. 164(1-2):19-23.
121. Lumio J., Hillbom M., Roine R., Ketonen L., Haltia M., Valle M., Neuvonen E., Lähdevirta J., 1986 - *Human rabies of bat origin in Europe*. Lancet 1986;1:378.
122. Macedo C.I., Carnieli Jr P., Brandão P.E., Travassos da Rosa E.S., Oliveira Rde N., Castilho J.G., Medeiros R., Machado R.R., Oliveira R.C., Carrieri M.L., Kotait I., 2006 - *Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples*, Braz J Infect Dis. 10(5):341-5
123. Madhusudana S.N., Nagaraj D., Uday M., Ratnavalli E., Kumar M.V., 2002 - *Partial recovery from rabies in a six-year-old girl*. Int J Infect Dis 6:85-6.
124. Madhusudana S.N., Sundaramoorthy S., Ullas P.T., 2010 - *Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines*, Int J Infect Dis. 14(12):e1067-71.
125. Madhusudana S.N., Subha S., Thankappan U., Ashwin Y.B., 2012 - *Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans*, Virol Sin. 27(5):299-302.
126. Mani R.S., Madhusudana S.N., 2013 - *Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances*, ScientificWorldJournal. 2013:569712.
127. Marston D.A., Horton D.L., Ngeleja C., Hampson K., McElhinney L.M., Banyard A.C., Haydon D., Cleaveland S., Rupprecht C.E., Bigambo M., Fooks A.R., Lembo T., 2012 - *Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet*, Emerg Infect Dis.18(4):664-7.
128. Marston D.A., Ellis R.J., Horton D.L., Kuzmin I.V., Wise E.L., McElhinney L.M., Banyard A.C., Ngeleja C., Keyyu J., Cleaveland S., Lembo T., Rupprecht C.E., Fooks A.R., 2012 - *Complete genome sequence of Ikoma lyssavirus*, J Virol.86(18):10242-3.
129. Marston D.A., McElhinney L.M., Ellis R.J., Horton D.L., Wise E.L., Leech S.L., David D., de Lamballerie X., Fooks A.R., 2013 - *Next generation sequencing of viral RNA genomes*, BMC Genomics. 14:444.
130. Mathuranayagam D., Rao P.V., 1984 - *Antemortem diagnosis of human rabies by corneal impression smears using immunofluorescent technique*, Indian J Med Res. 79:463-7.
131. Masson E., Bruyère-Masson V., Vuillaume P., Lemoyne S., Aubert M., 1999 - *Rabies oral vaccination of foxes during the summer with the VRG vaccine bait*, Vet Res. 30(6):595-605.

132. McElhinney L.M., Marston D., Johnson N., Black C., Matouch O., Lalosevic D., Stankov S., Must K., Smreczak M., Zmudzinski I.F., Botvinkin A., Aylan O., Vanek E., Cliquet F., Muller T., Fooks A.R., 2006 - *Molecular epidemiology of rabies viruses in Europe*, Dev Biol (Basel).125:17-28.
133. McElhinney L.M., Marston D.A., Brookes S.M., Fooks A.R., 2014 - *Effects of carcase decomposition on rabies virus infectivity and detection*, J Virol Methods.207:110-3.
134. Medeiros Caporale G.M., Rodrigues da Silva Ade C., Peixoto Z.M., Chaves L.B., Carrieri M.L., Vassão R.C., 2009 - *First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil*, J Clin Lab Anal. 23(1):7-13.
135. Meredith C.D., Rossouw A.P., Koch H.V.P., 1971 - *An unusual case of human rabies thought to be chiropteran origin*. S Afr Med J 45:767-9.
136. Meslin, F.-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H., 1999 - *La rage: techniques de laboratoire*, Quatrieme edition. Organisation mondiale de la sante, Geneve.
137. Militaru D., Stirbu-Teofanescu B.M., 2014 – *Production of rabies ribonucleocapsid antibodies in eggs and their used to detect the virus*, Romanian Biotechnological Letters, Vol. 19, Nr. 2, Pag. 9179-9189.
138. Morse S.S., 1993 – *Emerging Viruses*, Ed. Oxford University Press, pag. 76.
139. Muleya W., Namangala B., Mweene A., Zulu L., Fandamu P., Banda D., Kimura T., Sawa H., Ishii A., 2012 - *Molecular epidemiology and a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of infection with rabies virus in Zambia*, Virus Res.163(1):160-8.
140. Müller T.F., Schuster P., Vos A.C., Selhorst T., Wenzel U.D., Neubert A.M., 2001 - *Effect of maternal immunity on the immune response to oral vaccination against rabies in young foxes*, Am J Vet Res. 62(7):1154-8.
141. Müller T., Bätza H.J., Freuling C., Kliemt A., Kliemt J., Heuser R., Schlüter H., Selhorst T., Vos A., Mettenleiter T.C., 2012 - *Elimination of terrestrial rabies in Germany using oral vaccination of foxes*, Berl Munch Tierarztl Wochenschr.;125(5-6):178-90.
142. Murphy F.A., Paul E., Gibbs J., Horzinek M.C., Studdert M.J., 1999 – *Veterinary Virology*, Ed. Academic Press, pag. 429.
143. Nadin-Davis S.A., Sheen M., Wandeler A.I., 2009 - *Development of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis*, J Med Virol.81(8):1484-97.
144. Nagaraj T., Vasanth J.P., Desai A., Kamat A., Madhusudana S.N., Ravi V., 2006 - *Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques*, J Clin Virol. 36(1):17-23.
145. Neizgoda M., Rupprecht C.E., 2006 – *Standard Operating Procedure for the Direct Rapid Immunohistochemistry Test for the Detection of Rabies Virus Antigen*, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA.
146. Nicolau ST. S., Constantinescu N.M., Cajal N., *Turbarea*, Editura Acdemiei Republicii Populare Române.
147. Nishizono A., Yamada K., Khawplod P., Shiota S., Perera D., Matsumoto T., Wimalaratne O., Mitui M.T., Ahmed K., 2012 - *Evaluation of an improved rapid neutralizing antibody detection test (RAPINA) for qualitative and semiquantitative detection of rabies neutralizing antibody in humans and dogs*, Vaccine. 30(26):3891-6.
148. Noah D.L., Drenzek C.L., Smith J.S., Krebs J.W., Orciari L., Shaddock J., Sanderlin D., Whitfield S., Fekadu M., Olson J.G., Rupprecht C.E., Childs J.E., 1998 - *Epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996*, Ann Intern Med. 128(11):922-30.
149. Nogueira Y.L., 2004 - *[Estimate of the validity of a new method for the isolation of rabies virus]*, Rev Saude Publica. 38(2):315-22.
150. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T., 2000 - *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*, Nucleic Acids Res. 28(12):E63
151. O'Connell J., 2002 – *RT-PCT protocols*, Volum 193, Ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
152. Ogawa T., Gamoh K., Aoki H., Kobayashi R., Etoh M., Senda M., Hirayama N., Nishimura M., Shiraishi R., Servat A., Cliquet F., 2008 - *Validation and standardization of virus neutralizing test using indirect immunoperoxidase technique for the quantification of antibodies to rabies virus*, Zoonoses Public Health. 55(6):323-7.

153. OIE, 2012 - *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (Mammals, Birds and Bees), 7th ed. OIE. Paris.
154. OIE, 2013- *Terrestrial Manual*, Capitol 2.1.17 Rabies (Infection with rabies virus), ed. OIE. Paris.
155. OIE, 2017 – *Register of diagnostic kits certified by the OIE as validated as fit for purpose, available on-line* at <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/certification-of-diagnostic-tests/the-register-of-diagnostic-tests/>, data accesării 10.08.2017.
156. OMS – 2017(a), *Diagnostic procedure for antigen detection*, available on-line at <http://www.who.int/rabies/about/antigendetection/en/>, data accesării: 15.08.2017.
157. OMS, 2017(b) – *Weekly epidemiological record*, nr. 7, 92, pag. 77-88.
158. OMS, 2017(c) – „What is rabies?” available on-line at <http://www.who.int/rabies/about/en/>, 18.08.2017.
159. Ondřejková A., Süli J., Ondřejka R., Slepecká E., Prokeš M., Čechvala P., Supuka P., 2015 - *Detection of rabies antibodies in dog sera*, Pol J Vet Sci. 18(1):47-51.
160. Palmer S.R., Soulsby L., Simpson D.I.H., 2005 - *Zoonoze*. Ed.Științelor Medicale
161. Paquot A., Brochier B., Thomas I., Oastoret P.P., 1988 - *Vaccination campaigns on the red fox (vulpes vulpes) against rabies in Belgium: ingestion of vaccine baits by the red deer (cervus elaphus) the roe deer (capreolus capreolus) and the wild boar (sus scrofa)*, Annales de Medecine Veterinaire 132(8): 697-702.
162. Perianu T., 2012 – *Tratat de Boli infecțioase ale animalelor, Viroze*, Vol. II, Ed. Universitas XXI, Iași.
163. Pevsner Jonathan, 2009 – *Bioinformatics and Functional Genomics*, second edition. Editura Wiley-Blackwell, USA.
164. Picard-Meyer E., Bruyère V., Barrat J., Tissot E., Barrat M.J., Cliquet F., 2004 - *Development of a hemi-nested RT-PCR method for the specific determination of European Bat Lyssavirus 1*. Comparison with other rabies diagnostic methods, Vaccine. 22(15-16):1921-9.
165. Picard-Meyer E., Robardet E., Moroz D., Trotsenko Z., Drozhzhe Z., Biarnais M., Solodchuk V., Smreczak M., Cliquet F., 2012 - *Molecular epidemiology of rabies in Ukraine*, Arch Virol 157(9), 1689-98.
166. Picard-Meyer E., Peytavin de Garam C., Schereffer J.L., Marchal C., Robardet E., Cliquet F., 2015 - *Cross-platform evaluation of commercial real-time SYBR green RT-PCR kits for sensitive and rapid detection of European bat Lyssavirus type 1*, Biomed Res Int. 2015:839518.
167. Pital A., Janowitz S.I., 1963 - *Enhancement Of Staining Intensity In The Fluorescent-Antibody Reaction*, J Bacteriol. 86:888-9.
168. Ponchel F., Toomes C., Bransfield K., Leong F.T., Douglas S.H., Field S.L., Bell S.M., Combaret V., Puisieux A., Mighell A.J., Robinson P.A., Inglehearn C.F., Isaacs J.D., 2003 - *Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions*, BMC Biotechnol. 3:18.
169. Porras C., Barboza J.J., Fuenzalida E., Adaros H.L., Oviedo A.M., Furst J., 1976 - *Recovery from rabies in man*. Ann Intern Med 85:44--8.
170. Portnoi D., Favre S., Sureau P., 1982 - *Use of neuroblastoma cells (MNB) for the isolation of street rabies virus from field specimens*, Rabies Information Exchange, Centers for Disease Control, Atlanta, vol 6, p. 35-36.
171. Prehaud C., Coulon P., LaFay F., Thiers C., Flamand A., 1988 - *Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence*, J Virol. 62(1):1-7.
172. Qiagen, 2011 - *QuantiTect SYBR Green RT-PCR Handbook*.
173. Rabies-Bulletin-Europe, 2017 – *Rabies Information System of the WHO*, accesat online la 05.09.2017, disponibil la <http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/occurrence-rabies>.
174. Robardet E., Picard-Meyer E., Andrieu S., Servat A., Cliquet F., 2011 - *International interlaboratory trials on rabies diagnosis: an overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques*, J Virol Methods. 177(1):15-25.
175. Robardet E., Demerson J.M., Andrieu S., Cliquet F., 2012(a) - *First European interlaboratory comparison of tetracycline and age determination with red fox teeth following oral rabies vaccination programs*, J Wildl Dis. 48(4):858-68.
176. Robardet E., 2012(b) – *Tetracycline detection in red fox teeth* in 5th Workshop for Rabies , Nancy, France, 27th September.

177. Robardet E., Andrieu S., Rasmussen T.B., Dobrostana M., Horton D.L., Hostnik P., Jaceviciene I., Juhasz T., Müller T., Mutinelli F., Servat A., Smreczak M., Vanek E., Vázquez-Morón S., Cliquet F., 2013(a) - *Comparative assay of fluorescent antibody test results among twelve European National Reference Laboratories using various anti-rabies conjugates*, J Virol Methods. 191(1):88-94.
178. Robardet E., Ilieva D., Iliev E., Gagnev E., Picard-Meyer E., Cliquet F., 2013(b) - *Epidemiology and molecular diversity of rabies viruses in Bulgaria*, Epidemiol Infect. 142(4):871-7.
179. Rudd R.J., Trimarchi C.V., Abelseth M.K., 1980 - *Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus*, J Clin Microbiol. 12(4):590-3.
180. Rudd R.J., Trimarchi C.V., 1987 - *Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus*, J Clin Microbiol. 25(8):1456-8.
181. Rudd R.J., Trimarchi C.V., 1989 - *Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis*, J Clin Microbiol. 27(11):2522-8.
182. Rudd R.J., Smith J.S., Yager P.A., Orciari L.A., Trimarchi CV., 2005 - *A need for standardized rabies-virus diagnostic procedures: effect of cover-glass mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test*, Virus Res. 111(1):83-8.
183. Rupprecht C.E., Hanlon C.A., Slate D., 2004 - *Oral vaccination of wildlife against rabies: opportunities and challenges in prevention and control*, Dev Biol (Basel). 119:173-84.
184. Sacramento D., Bourhy H., Tordo N., 1991 - *PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus*, Mol Cell Probes. 5(3):229-40.
185. Saeed B., Al-Mousawi M., 2017 - *Rabies Acquired Through Kidney Transplantation in a Child: A Case Report*, Exp Clin Transplant. 15(3):355-357.
186. Schneider L.G., 1969 - *The cornea test; a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies*, Zentralbl Veterinarmed B. 16(1):24-31.
187. Schneider L.G., 1991 - *Spread of virus from the central nervous system*. In: Baer G.M., The natural history of rabies, Boca Raton, CRC, pag 133-44.
188. Seif I., Coulon P., Rollin P.E., Flamand A., 1985 - *Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein*, Virol. 53(3): 926-34.
189. Selimov M.A., Tatarov A.G., Botvinkin A.D., Klueva E.V., Kulikova L.G., Khismatullina N.A., 1989 - *Rabies-related Yuli virus; identification with a panel of monoclonal antibodies*. Acta Virol 33:542-5.
190. Selimov M.A., Smekhov A.M., Antonova L.A., Shablovskaya E.A., King A.A., Kulikova L.G., 1991 - *New strains of rabies-related viruses isolated from bats in the Ukraine*. Acta Virol 35:226-31.
191. Servat A., Wasniewski M., Cliquet F., 2006 - *Tools for rabies serology to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores*, Dev Biol (Basel). 125:91-4.
192. Servat A., Feyssaguet M., Blanchard I., Morize J.L., Schereffer J.L., Boue F., Cliquet F., 2007 - *A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores*, J Immunol Methods. 318(1-2):1-10.
193. Shope R.E., Murphy F.A., Harrison A.K., Causey O.R., Kemp G.E., Simpson D.I., Moore D.L., 1970 - *Two African viruses serologically and morphologically related to rabies virus*, J Virol., 6(5):690-2.
194. Si D., Marquess J., Donnan E., Harrower B., McCall B., Bennett S., Lambert S., 2016 - *Potential Exposures to Australian Bat Lyssavirus Notified in Queensland, Australia, 2009-2014*, PLoS Negl Trop Dis. 10(12).
195. Simani S., Fayaz A., Rahimi P., Eslami N., Howeizi N., Biglari P., 2012 - *Six fatal cases of classical rabies virus without biting incidents, Iran 1990-2010*, J Clin Virol. 54(3):251-4
196. Singh R., Singh K.P., Cherian S., Saminathan M., Kapoor S., Manjunatha Reddy G.B., Panda S., Dhama K., 2017 - *Rabies - epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review*, Vet Q. 37(1):212-251
197. Smith WB, Blenden DC, Fuh TH, Hiler L., 1972 - *Diagnosis of rabies by immunofluorescent staining of frozen sections of skin*, J Am Vet Med Assoc. 161(11):1495-501.
198. Smith J.S., Yager P.A., Baer G.M., 1973 - *A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody*, Bull World Health Organ. 48(5):535-41.

199. Smith A.L., Tignor G.H., Emmons R.W., Woodie J.D., 1978 - *Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures*, Intervirology. 9(6):359-61.
200. Soave O.A., 1966 - *Transmission of rabies to mice by ingestion of infected tissue*, Am J Vet Res. 27(116):44-6.
201. Suja M.S., Mahadevan A., Madhusudhana S.N., Vijayasarithi S.K., Shankar S.K., 2009 - *Neuroanatomical mapping of rabies nucleocapsid viral antigen distribution and apoptosis in pathogenesis in street dog rabies--an immunohistochemical study*, Clin Neuropathol. 28(2):113-24.
202. Sureau P., Tignor G.H., Smith A.L., 1980 - *Antigenic characterization of the Bangui strain (ANCB-672d) of Lagos bat*. Ann Virol, 131: 25-32.
203. Ștefan N., 2000 - „*Diagnosticul și prevenirea zoonozelor*”, Ed. Fundației „România de mâine”, București.
204. Tao X.Y., Niezgoda M., Du J.L., Li H., Wang X.G., Huang Y., Jiao Y., Cao L., Tang Q., Liang G.D., 2008 - *[The primary application of direct rapid immunohistochemical test to rabies diagnosis in China]*, Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 22(3):168-70.
205. Tekki I.S., Ponfa Z.N., Nwosuh C.I., Kumbish P.R., Jonah C.L., Okewole P.A., Shamaki D., Ahmed S.M., 2016 - *Comparative assessment of seller's staining test (SST) and direct fluorescent antibody test for rapid and accurate laboratory diagnosis of rabies*, Afr Health Sci. 16(1):123-7.
206. Theodorides J., 1986 - *Histoire de la rage*, Ed. Fondation Singer-Polignac, pag. 223.
207. Tepsmethanon V., Lumlerdacha B., Mitmoonpitak C., Fagen R., Wilde H., 1997 - *Fluorescent antibody test for rabies: prospective study of 8,987 brains*, Clin Infect Dis. 25(6):1459-61.
208. Tollis M., Buonavoglia C., di Trani L., Vignolo E. - 1988 - *Sensitivity of different cell lines for rabies virus isolation*, Zentralbl Veterinarmed B. 35(7):504-8.
209. Tordo N., Poch O., Ermine A., Keith G., 1986 - *Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV*, Nucleic Acids Res. 14(6):2671-83.
210. Tordo N., Poch O., Ermine A., Keith G., Rougeon F., 1988 - *Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses*, Virology. 165(2):565-76
211. Tordo N., 1999 - *Virus rabique: caractéristiques et biologie moléculaire*, În: La rage techniques de laboratoire, Ediția a 4-a, Ed. OMS, Geneva.
212. Trimarchi C.V., Debbie J.G., 1972 - *Standardization and quantitation of immunofluorescence in the rabies fluorescent-antibody test*, Appl Microbiol. 24(4):609-12.
213. Trimarchi C.V., Debbie J.G., 1974 - *Production of rabies fluorescent conjugate by immunization of rabbits with purified rabies antigen*, Bull World Health Organ. 51(5):447-9.
214. Troupin C., Dacheux L., Tanguy M., Sabeta C., Blanc H., Bouchier C., Vignuzzi M., Duchene S., Holmes E.C., Bourhy H., 2016 - *Large-Scale Phylogenomic Analysis Reveals the Complex Evolutionary History of Rabies Virus in Multiple Carnivore Hosts*, PLoS Pathog. 12(12).
215. Tuffereau C., Fischer S., Flamand A., 1985 - *Phosphorylation of the N and M1 proteins of rabies virus*, J Gen Virol. 66 (Pt 10):2285-9.
216. Turcitu MA., Barboi G., Vuta V., Mihai I., Boncea D., Dumitrescu F., Codreanu MD., Johnson N., Fooks AR., Muller T., Freuling CM., 2010 - *Molecular epidemiology of rabies virus in Romania provides evidence for a high degree of heterogeneity and virus diversity*, Virus Res 150 (1-2), 28-33.
217. Umoh J.U., Blendon D.C. 1983 - *Comparison of primary skunk brain and kidney and raccoon kidney cells with established cell lines for isolation and propagation of street rabies virus*, Infect Immun. 41(3):1370-2.
218. Van der Merwe M., 1982 - *Bats as vectors of rabies*. S Afr J Sci 78:421-2.
219. Vassu Tatiana, Stoica Ileana, Csutak Ortansa, Mușat F., 2001 - *Genetica microorganismelor și inginerie genetică microbiană, note de curs și tehnici de laborator*. Editura Petrion, București.
220. Vengušt G., Hostnik P., Cerovšek M., Cilenšek P., Malovrh T., 2011 - *Presence of antibodies against rabies in wild boars*, Acta Vet Hung. 59(1):149-54.
221. Von Teichman B.F., de Koker W.C., Bosch S.J.E., Bishop G.C., Meredith C.D., Bingham J., 1998 - *Mokola virus infection: description of recent South African cases and a review of the virus epidemiology*. J S Afr Vet Assoc 69:169-71
222. Vora N.M., Basavaraju S.V., Feldman K.A., Paddock C.D., Orciari L., ș.a., 2013 - *Raccoon rabies virus variant transmission through solid organ transplant*, Jama 310(4): 398-407

223. Vos A., Müller T., Selhorst T., Schuster P., Neubert A., Schlüter H., 2001 - *Optimising spring oral vaccination campaigns of foxes against rabies*, Dtsch Tierarztl Wochenschr. 108(2):55-9.
224. Vos A., Schaarschmidt U., Muluneh A., Müller T., 2003 - *Origin of maternally transferred antibodies against rabies in foxes (Vulpes vulpes)*, Vet Rec. 153(1):16-8.
225. Vos A., 2003 - *Oral vaccination against rabies and the behavioural ecology of the red fox (Vulpes vulpes)*, J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 50(10):477-83.
226. Wacharapluesadee S., Hemachudha T., 2001 - *Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies*, Lancet. 358(9285):892-3.
227. Wachendorfer G., Frost J.W., Frohlich T., 1985 - *Current diagnostic procedures of rabies and related viruses*. In Kuwert E.K., Merieux C., Koprowski H., Bogel K., Eds. Rabies in the tropics. Berlin, Springer-Verlag, 40-46.
228. Wakeley P.R., Johnson N., McElhinney L.M., Marston D., Sawyer J., Fooks A.R., 2005 - *Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6*, J Clin Microbiol. 43(6):2786-92.
229. Warrell M.J., Looareesuwan S., Manatsathit S., White N.J., Phuapradit P., Vejajiva A., Hoke C.H., Burke D.S., Warrell D.A., 1988 - *Rapid diagnosis of rabies and post-vaccinal encephalitis*, Clin Exp Immunol. 71(2):229-34.
230. Wasniewski M., Cliquet F., 2012 - *Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores*, J Virol Methods. 179(1):166-75.
231. Wasniewski M., Guiot A.L., Schereffer J.L., Tribout L., Mähar K., Cliquet F., 2013 - *Evaluation of an ELISA to detect rabies antibodies in orally vaccinated foxes and raccoon dogs sampled in the field*, J Virol Methods. 187(2):264-70.
232. Wasniewski M., Almeida I., Baur A., Bedekovic T., Boncea D. ş.a., 2016 - *First international collaborative study to evaluate rabies antibody detection method for use in monitoring the effectiveness of oral vaccination programmes in fox and raccoon dog in Europe*, J Virol Methods. 238:77-85.
233. Webster W.A., Casey G.A., Charlton K.M., 1976 - *The mouse inoculation test in rabies diagnosis: early diagnosis in mice during the incubation period*, Can J Comp Med. 40(3):322-5.
234. Webster W.A., 1987 - *A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis*, Can J Vet Res. 51(3):367-9.
235. Webster W.A., Charlton K.M., Casey G.A., 1988 - *Growth characteristics in cell culture and pathogenicity in mice of two terrestrial rabies strains indigenous to Canada*, Can J Microbiol. 34(1):19-23.
236. Webster W.A., Charlton K.M., 1989(a) - *The apparent infection of NA-C1300 cell cultures by nucleocapsid material of the Canadian Arctic strain of rabies virus*, Can J Microbiol. 35(8):811-3.
237. Webster W.A., Charlton K.M., Casey G.A., 1989(b) - *Persistent infections of a field strain of rabies virus in murine neuroblastoma (NA-C1300) cell cultures*, Can J Vet Res. 53(4):445-8.
238. Webster, W.A. and Casey, G.A., 1996 - *Virus isolation in neuroblastoma cell culture*, Chapter 8 in Laboratory techniques in rabies, p 96-101.
239. Williams E.S., Barker I.K., 2001 - *Infectious Diseases of Wild Mammals*, Ediția a 3-a, Ed. Manson Publishing, The Veterinary Press, pag. 3.
240. Willoughby R.E. Jr, Tieves K.S., Hoffman G.M., Ghanayem N.S., Amlie-Lefond C.M., Schwabe M.J., Chusid M.J., Rupprecht C.E., 2005 - *Survival after treatment of rabies with induction of coma*, N Engl J Med. 352(24):2508-14.
241. Woldehiwet Z., 2005 - *Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus*, Clin Chim Acta. 351(1-2):49-63.
242. Yang D.K., Shin E.K., Oh Y.I., Lee K.W., Lee C.S., Kim S.Y., Lee J.A., Song J.Y., 2012 - *Comparison of four diagnostic methods for detecting rabies viruses circulating in Korea*, J Vet Sci. 13(1):43-8.
243. Zaidman G.W., Billingsley A., 1998 - *Corneal impression test for the diagnosis of acute rabies encephalitis*, Ophthalmology. 105(2):249-51.

ANEXE

LISTA DE FIGURI

1. Fig. 1.1 Secțiune transversală și longitudinală a virusului rabic (Sursa: <http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/virus-structure>)
2. Fig. 1.2 Ciclul de infecție și replicare a virusului rabic (sursa: <https://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html>)
3. Fig. 1.3 Cele 15 specii de virus rabic și zonele geografice aferente izolării acestora (Sursa: Banyard AC ș.a., 2014)
4. Fig. 1.4 Analiza filogenetică a Lyssavirusurilor (Sursa: Banyard AC ș.a., 2014)
5. Fig. 1.5 Rezervoarele de virus rabic clasic și distribuția acestora la nivel mondial (Sursa: <http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/epidemiology-rabies>)
6. Fig. 1.6 Zonele geografice unde au fost raportate cazurile de rabie la om în urma contactului cu câini infectați în perioada 2010-2014. Albastru: prezența bolii; Gri: Suspiciune; Alb: Absent (Sursa: http://www.who.int/rabies/Presence_dog_transmitted_human_Rabies_2014.png?ua=1)
7. Fig. 1.7 Cazurile de rabie raportate la om în urma contactului cu câinii infectați în anul 2016
8. Fig. 1.8 Situația cazurilor de rabie raportate la animalele domestice și sălbatice pe teritoriul României: A) Anul 2010; B) Anul 2011; C) Anul 2012; D) Anul 2013; E) Anul 2014; F) Anul 2015; G) Anul 2016 (Sursa: <http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/queries>)
9. Fig. 2.1 Testul rapid de imunohistochimie directă A) Frotiu negativ B) Frotiu pozitiv (Sursa: CDC Atlanta, USA)
10. Fig. 4.1 Harta României cu reprezentarea geografică a celor 8 județe luate în studiu (original)
11. Fig. 4.2 Cazurile pozitive de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județele Moldovei
12. Fig. 4.3 Numărul total al cazurilor pozitive de rabie înregistrate la animalele domestice pentru cele 8 județe luate în studiu
13. Fig. 4.4 Cazurile pozitive de rabie înregistrate la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județele Moldovei
14. Fig. 4.5 Numărul total de cazuri pozitive de rabie înregistrate în județele Moldovei
15. Fig. 4.6 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Suceava
16. Fig. 4.7 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Iași
17. Fig. 4.8 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Bacău
18. Fig. 4.9 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Botoșani
19. Fig. 4.10 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Vaslui
20. Fig. 4.11 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Vrancea
21. Fig. 4.12 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Galați
22. Fig. 4.13 Numărul total al cazurilor pozitive și negative de rabie înregistrate la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Neamț
23. Fig. 4.14 Harta Republicii Moldova (sursa: wikipedia.org)
24. Fig. 4.15 Reprezentarea grafică a cazurilor pozitive de rabie la animalele domestice
25. Fig. 4.16 Reprezentarea grafică a cazurilor pozitive de rabie înregistrate la animalele sălbatice, rozătoare și chiroptere
26. Fig. 5.1 Harta României cu originea geografică a celor 38 de probe (original)
27. Fig. 5.2 A) Conjugatul Bio-Rad; B) Conjugatul Rabitest (activ și martor); C) Aspectul conjugatelor după reconstituire. De la stânga la dreapta: Fujirebio, Bio-Rad și Rabitest (original)
28. Fig. 5.3 A) Pregătirea probelor; B) Realizarea amprentelor; C) Îndepărtarea excesului cu o spatulă de lemn; D) Aranjarea lamelor în suport; E) Fixarea lamelor în acetona la -20°C, 30 min. (original)
29. Fig. 5.4 A) Adăugarea conjugatului; B) Incubare la 37°C, 30 min.; C) Îndepărtarea conjugatului cu TFS și apă distilată; D) Adăugarea unei picături de mediu de montare; E) Citirea la microscopul cu UV (original)

30. Fig. 5.5 A) IFD negativă, conjugat Bio-Rad, magnitudine x400, DR1016; B) IFD negativă, conjugat Fujirebio, magnitudine x400, DR1016; C) IFD negativă, conjugat Rabitest, magnitudine x400, DR1016 (original)

31. Fig. 5.6 A) IFD pozitivă, conjugat Bio-Rad, magnitudine x400, DR1017; B) IFD pozitivă, conjugat Fujirebio, magnitudine x400, DR1017; C) IFD pozitivă, conjugat Rabitest, magnitudine x400, DR1017 (original)

32. Fig. 5.7 A) IFD pozitivă, conjugat Bio-Rad, magnitudine x400, DR1027; B) IFD pozitivă, conjugat Fujirebio, magnitudine x400, DR1027; C) IFD pozitivă, conjugat Rabitest, magnitudine x400, DR1027 (original)

33. Fig. 5.8. A) IFD pozitivă, conjugat Bio-Rad, magnitudine x400, DR1028; B) IFD pozitivă, conjugat Fujirebio, magnitudine x400, DR1028; C) IFD pozitivă, conjugat Rabitest, magnitudine x400, DR1028 (original)

34. Fig. 5.9 Reprezentarea grafică a rezultatelor obținute privind distribuția de antigen rabic detectat în cazul celor 3 conjugate analizate Bio-Rad, Fujirebio și Rabitest. Scala de evaluare a fost aceeași ca și în cazul intensității fluorescenței, și anume de la 4+ la negativ.

35. Fig. 6.1 Cutie x 75 cm² cu linia celulară N2a (original)

36. Fig. 6.2 Microscop ranversat Lordill (original). A) Evaluarea confluenței monostratului celular; B) Numărarea celulelor în camera Neubauer

37. Fig. 6.3 A) Microscop cu LED Lordill AXIO cu ecran încorporat; B) Microscop cu UV Olympus BX41 (original)

38. Fig. 6.4 Rezultatele obținute pentru cele 59 de probe testate prin intermediul RTCIT

39. Fig. 6.5 A) Control pozitiv CVS 27; B) Control pozitiv EBLV-1; C) Control negativ (original)

40. Fig. 6.6 A) Cultură celulară pozitivă: DR1034; B) Cultură celulară pozitivă: Vulpe, 2014 (original)

41. Fig. 6.7 A) Cultură celulară N2a pozitivă, Control CVS 27, 48h; B) Cultură celulară N2a pozitivă, Control EBLV-1, 48h; C) Cultură celulară N2a negativă, Control negativ, 48h (original)

42. Fig. 6.8 A) Cultură celulară N2a pozitivă: DR1201, 48h; B) Cultură celulară N2a pozitivă: DR1198, 48h (original)

43. Fig. 6.9 A) Cultură celulară N2a pozitivă: DR1201, 72h; B) Cultură celulară N2a pozitivă: DR1198, 72h (original)

44. Fig. 6.10 A) Cultură celulară BHK-21, 48h, Control pozitiv CVS 27; B) Cultură celulară BHK-21, 48h, Control pozitiv EBLV-1; C) Cultură celulară BHK-21, 48h, Control negativ (original)

45. Fig. 6.11 A) Cultură celulară BHK-21, 48h, DR1017; B) Cultură celulară BHK-21, 48h, DR1033 (original)

46. Fig. 6.12 A) Cultură celulară BHK-21, 72h, DR1017; B) Cultură celulară BHK-21, 72h, DR1018 (original)

47. Fig. 6.13 Harta României (verde) și a Republicii Moldova (albastru) cu originea geografică a celor 16 probe (original)

48. Fig. 6.14 A) Control pozitiv CVS-27, sistem microplacă, concentrația celulară 2x10⁵ celule/ml, perioadă de incubare x72 h (x400); B) Cultură celulară pozitivă (DR1033), concentrația celulară 2x10⁵ celule/ml, perioadă de incubare x72 h (x400); C) Cultură celulară pozitivă (DR1033), concentrația celulară 1,5x10⁵ celule/ml, perioadă de incubare x72 h (x400) (original)

49. Fig. 7.1 Harta României (portocaliu) și a Republicii Moldova (roz) cu originea geografică a celor 59 de probe (original)

50. Fig. 7.2 Etapele realizării extracțiilor ARN

51. Fig. 7.3 Aparatul de extracție Iprep Invitrogen (original)

52. Fig. 7.4 Etapele realizării diluțiilor seriate pentru GT1 (original)

53. Fig. 7.5 A) Tuburi Rotor-Gene (www.4ti.co.uk); B) Amplasarea tuburilor în suportul aparatului (original); C) Aparatul Rotor-Gene Qiagen (original)

54. Fig. 7.6 Gena N a virusului rabic: primerii utilizați pentru amplificarea parțială și completă (original)

55. Fig. 7.7 Termociclorul Eppendorf AG, Germania (original)

56. Fig. 7.8 A) Pregătirea gelului; B) Aplicarea pieptenilor; C) Inocularea probelor; D) Citirea la Aparatul BioRab Laboratories, France

57. Fig. 7.9 Modul de prezentare a datelor analitice obținute, ale probelor testate în sistemul Real-time RT-PCR, cu cele 3 ferestre de analiză a software-ului Rotor-Gene Q (original)

58. Fig. 7.10 Reprezentarea fazelor de amplificare a reacției SYBR Green Real-time RT-PCR (original)

59. Fig. 7.11 A) (stânga) Amplificarea probelor DR1016-DR1036 și al controalelor prin intermediul tehnicii SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B) (dreapta) Curba standard SYBRGreen Real-time qRT-PCR aferentă probelor DR1016-DR1036 (original)

60. Fig. 7.12 A) (stânga) Amplificarea probelor DR1187-DR1202 și al controalelor prin intermediul tehnicii SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B) (dreapta) Curba standard SYBRGreen Real-time qRT-PCR aferentă probelor DR1187-DR1202 (original)
61. Fig. 7.13 A) (stânga) Amplificarea probelor DR1331-DR1336 și al controalelor prin intermediul tehnicii SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B) (dreapta) Curba standard SYBRGreen Real-time qRT-PCR aferentă probelor probelor DR1331-DR1336 (original)
62. Fig. 7.14 A) (stânga) Amplificarea probelor DR1343-DR1358 și al controalelor prin intermediul tehnicii SYBRGreen Real-time qRT-PCR; B) (dreapta) Curba standard SYBRGreen Real-time qRT-PCR aferentă probelor DR1343-DR1358 (original)
63. Fig. 7.15 A) (stânga) Amplificarea RABV a probelor DR1016-DR1036 utilizând tehnica TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT1; B) (dreapta) Amplificarea RABV a probelor DR1187, DR1198, DR1200 și DR1201 utilizând tehnica TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT1 (original)
64. Fig. 7.16 A) stânga) Amplificarea EBLV-1 a probelor DR1016-DR1036 utilizând tehnica TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT5. Controlul pozitiv este ilustrat în roșu; B) (dreapta) Amplificarea EBLV-2 a probelor DR1016-DR1036 utilizând tehnica TaqMan qRT-PCR, sonda LysGT6. Controlul pozitiv este ilustrat în roșu (original)
65. Fig. 7.17.a. Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (Fragment al proteinei N parțiale 606-pb): Marker molecular (linia 1), probe testate DR1016 - DR1036 (liniile 2 - 22), alte probe testate în paralel (liniile 23 - 27), control negativ ARN (linia 28), control pozitiv (linia 29), control negativ PCR (linia 30) și marker molecular (lina 31) (original). Fig. 7.17.b. Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (fragment al proteinei N parțiale 606-pb). Marker molecular (linia 1), probe testate DR1187, DR1198, DR1200 și DR1201 (liniile 2-5), alte 2 probe testate (liniile 6 și 7), control negativ (linia 8) și control pozitiv (linia 9) (original). Fig. 7.17.c. Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (fragment al proteinei N parțiale 606-pb). Marker molecular (linia 1), probe testate DR1331-1336 (liniile 2-7) (original). Fig. 7.17.d. Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (fragment al proteinei N parțiale 606-pb). Marker molecular (linia 1), probele testate DR1343-DR1357 (liniile 2-16), DR1358 (linia 17) (original)
66. Fig. 7.18.a Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (Fragment al proteinei N complete 1353-bp): Marker molecular (linia 1), probe testate DR1017- DR1036 (liniile 2 - 21), alte probe testate în paralel (liniile 22 - 30), control negativ (linia 32) (original). Fig. 7.18.b Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional Fragment al proteinei N complete 1353-bp): Marker molecular (linia 1), probe testate DR1187, DR1198, DR1200 și DR1201 (liniile 2-5) (original). Fig. 7.18.c Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (Fragment al proteinei N complete 1353-bp): Marker molecular (linia 1), probe testate DR1331-DR1336 (liniile 2-7) (original). Fig. 7.18.d Detecția ARN-ului virusului rabic prin intermediul RT-PCR-ului convențional (Fragment al proteinei N complete 1353-bp): Marker molecular (linia 1), probe testate DR1343, DR1345-DR1353, DR1357, DR1358 (liniile 2-14) (original)
67. Fig. 7.19 Aparatul QUBIT, Invitrogen, (original)
68. Fig. 7.20 Etapele dozării concentrației de ARN/ADNc (original)
69. Fig. 8.1 Reprezentarea probelor luate în studiu din N-E-ul României și din Republica Moldova. Cercurile roșii reprezintă probele pozitive, iar cercurile verzi, probele negative. Harta a fost realizată cu ajutorul programului ArcView (ArcMap) (original)
70. Fig. 8.2 Exemplu de secvență nucleotidică a nucleoproteinei complete a virusului rabic (DR1017)
71. Fig. 8.3 Arbore filogenetic generat pe baza metodei NJ (original) a nucleoproteinei parțiale N a virusului rabic. Animalele domestice din România sunt reprezentate cu cercuri negre, iar cele sălbatice cu cercuri roșii. Triunghiurile negre reprezintă animalele domestice din Republica Moldova, pe când triunghiurile roșii, cele sălbatice (original)
73. Fig. 8.4 Arbore filogenetic generat pe baza programului PhyML / EvolView pentru gena completă N a virusului rabic (1353-bp). Numerele adiacente ramurilor reprezintă în esență procente Bootstrap. Probele provenite de la animalele domestice din zona de studiu a României sunt reprezentate cu pătrățele albastre, iar cele de la animalele sălbatice cu pătrățele roșii. Pentru Republica Moldova, animalele domestice sunt reprezentate cu steluțe mov, iar cele sălbatice cu triunghi verde (original)
74. Fig. 8.5 Arbore circular generat pe baza programului PhyML / EvolView pentru proteina completă N a virusului rabic (1353-bp). Ca și în cazul arborelui filogenetic clasic, numerele ramurilor reprezintă procente bootstrap, iar probele sunt identificate cu aceleași figurine ca și în cazul celui clasic (original)

75. Fig. 9.1 Alinierea aminoacizilor genei N a virusului rabic pentru cele 15 probe prin intermediul programului GraphicView (original)
76. Fig. 9.2 Alinierea aminoacizilor genei P a virusului rabic pentru cele 15 probe prin intermediul programului GraphicView (original)
77. Fig. 9.3 Alinierea aminoacizilor genei M a virusului rabic pentru cele 14 probe prin intermediul programului GraphicView (original)
78. Fig. 9.4 Alinierea aminoacizilor genei G a virusului rabic pentru cele 15 probe prin intermediul programului GraphicView (original)
79. Fig. 9.5 Alinierea aminoacizilor genei L a virusului rabic pentru cele 14 probe prin intermediul programului GraphicView (original)
80. Fig. 9.6 Alinierea aminoacizilor genei L a virusului rabic pentru cele 14 probe prin intermediul programului GraphicView (continuare 1) (original)
81. Fig. 9.7 Alinierea aminoacizilor genei L a virusului rabic pentru cele 14 probe prin intermediul programului GraphicView (continuare 2) (original)
82. Fig. 9.8 Alinierea aminoacizilor genei L a virusului rabic pentru cele 14 probe prin intermediul programului GraphicView (continuare 3) (original)
83. Fig. 9.9 Arbore filogenetic a secvențelor complete a genomului virusului rabic generat pe baza programului PhyML. Numerele adiacente ramurilor reprezintă procente Bootstrap. Pătrățelele roșii reprezintă animalele sălbatice, iar cele verzi animalele domestice din nord-estul României. Steluțele mov reprezintă animalele domestice din Republica Moldova (original)
84. Fig. 10.1 Harta României cu originea geografică (portocaliu) a probelor de vulpi (original)
85. Fig. 10.2 A) Pregătirea mandibulei cu secționarea acesteia în două părți; B) Individualizarea caninului de mandibulă cu ajutorul unui clește; C) Aspectul final al caninului înaintea realizării secțiunilor transversale (original)
86. Fig. 10.3 A) Aparatul Buehler, Isomet; B) Efectuarea propriu-zisă a secțiunilor la fierăstrăul cu diamant (original)
87. Fig. 10.4 Reprezentarea grafică a rezultatelor obținute pentru probele de vulpi prin intermediul testului ELISA
88. Fig. 10.5 Reprezentarea grafică a procentului de blocare (PB) al celor 345 probe de vulpi testate. PB <40% reprezintă probele negative, PB 40-70% reprezintă probe pozitive, iar PB >70%, probe pozitive cu un nivel mai mare de 0,5 UI/ml de anticorpi postvaccinali
89. Fig. 10.6 Titrul de anticorpi antirabici obținut pentru probele testate prin intermediul kit-ului Platelia™ Rabies II. Interpretarea cantitativă cu cele 4 categorii de seroconversie: < 0,125 EU/ml: nivel nedetectabil de seroconversie, 0,125-0,5: nivel insuficient de seroconversie, 0,5-4 EU/ml: nivel suficient de seroconversie și >4 EU/ml: nivel ridicat de seroconversie
90. Fig. 10.7 Rezultatele obținute pentru cele 72 de mandibule de vulpi pentru detecția markerului vaccinal
91. Fig. 10.8 Determinarea vârstei la vulpi pe baza dentiției A) Vulpe adultă, aprox. 6 ani; 1: cavitate pulpară, 2: dentină, 3: ciment; B) Vulpe tânără <1 an, 1: dentină, 2: cavitate pulpară largă, 3: ciment, 4: os mandibular (original)
92. Fig. 10.9 A) Depozit de tetraciclină în dentină (3 linii), cu o intensitate a fluorescenței redusă B) Depozit de tetraciclină în dentină (2 linii) și os mandibular, cu o intensitate a fluorescenței medii (original)
93. Fig. 10.10 A) Depozit de tetraciclină în dentină (o linie) și os mandibular, cu o intensitate a fluorescenței medii B) Depozit de tetraciclină în dentină (o linie) și os mandibular, cu o intensitate a fluorescenței ridicată (original)
94. Fig. 10.11 Harta României cu originea geografică (verde) a probelor de mistreți (original)
95. Fig. 10.12 Rezultatele obținute în cadrul metodei serologice ELISA pentru detecția anticorpilor antirabici la mistreți
96. Fig. 10.13 Reprezentarea grafică a procentului de blocare al celor 312 probe de mistreți testate. PB <40% reprezintă probele negative, PB 40-70% reprezintă probe pozitive, iar PB >70%, probe pozitive cu un nivel mai mare de 0,5 UI/ml de anticorpi postvaccinali
97. Fig. 10.14 A) FAVN negativ, mistreț SV, 2014, mărimea x400; B) FAVN negativ, mistreț SV, 2014, mărimea x400; C) FAVN pozitiv, mistreț, BC, 2015, mărimea x400 (original).

LISTA DE TABELE

1. Tabel 4.1 Numărul total de probe testate în perioada 2010-2016 și rezultatele obținute la diagnosticul de confirmare pentru cele 8 județe luate în studiu
2. Tabel 4.2 Numărul total de probe testate provenite de la animale sălbatice, în perioada 2010-2016 și rezultatele obținute la diagnosticul de confirmare pentru cele 8 județe luate în studiu
3. Tabel 4.3 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Suceava
4. Tabel 4.4 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Suceava
5. Tabel 4.5 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Iași
6. Tabel 4.6 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Iași
7. Tabel 4.7 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Bacău
8. Tabel 4.8 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Bacău
9. Tabel 4.9 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Botoșani
10. Tabel 4.10 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Botoșani
11. Tabel 4.11 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Vaslui
12. Tabel 4.12 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Vaslui
13. Tabel 4.13 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Vrancea
14. Tabel 4.13 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Vrancea
15. Tabel 4.14 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Vrancea
16. Tabel 4.15 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Galați
17. Tabel 4.16 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Galați
18. Tabel 4.17 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele domestice în perioada 2010-2016 în județul Neamț
19. Tabel 4.18 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Neamț
20. Tabel 4.18 Situația cazurilor pozitive și negative de rabie la animalele sălbatice în perioada 2010-2016 în județul Neamț
21. Tabel 4.19 Numărul total de cazuri pozitive și negative înregistrate la animalele domestice pe teritoriul Republicii Moldova
22. Tabel 4.20 Numărul total de cazuri pozitive și negative înregistrate la animalele sălbatice pe teritoriul Republicii Moldova
23. Tabel 4.21 Distribuția cazurilor pozitive de rabie pe raioane în perioada 2010-2016
24. Tabel 5.1 Probele testate din România și Republica Moldova
25. Tabel 5.2 Conjugatele utilizate și caracteristicile acestora
26. Tabel 5.3 Rezultatele obținute pentru conjugatul Bio-Rad privind intensitatea fluorescenței al probelor luate în studiu

27. Tabel 5.4 Rezultatele obținute pentru conjugatul Fujirebio privind intensitatea fluorescenței al probelor luate în studiu
28. Tabel 5.5 Rezultate obținute pentru conjugatul Rabitest privind intensitatea fluorescenței al probelor luate în studiu
29. Tabel 6.1 Probele luate în studiu pentru realizarea studiului comparativ
30. Tabel 6.2 Rezultatele obținute pentru cele două linii celulare luate în studiu
31. Tabel 6.3 Caracteristicile probelor luate în studiu din România și Republica Moldova
32. Tabel 6.4 Rezultatele obținute în cadrul RTCIT în sistemele LabTek și microplăci
33. Tabelul 7.1 Caracteristicile primerilor și sondelor utilizate în tehnica TaqMan Real time RT-PCR
34. Tabelul 7.2 Primerii utilizați pentru amplificarea genei parțiale N și pentru secvențierea produșilor PCR
35. Tabelul 7.3 Etapele programului One step full N gene la termociclorul Eppendorf AG
36. Tabelul 7.4 Etapele programului M13 Full Nucleo la termociclorul Eppendorf AG
37. Tabelul 7.5 Primerii utilizați pentru amplificarea genei complete N și pentru secvențierea produșilor PCR
38. Tabelul 7.6 Rezultate obținute în cadrul tehnicilor SYBRGreen qRT-PCR și TaqMan qRT-PCR - sonda GT1
39. Tabelul 7.7 Corelarea rezultatelor obținute la RT-PCR convențional și la diagnosticul de referință
40. Tabelul 7.8 Rezultatele determinărilor concentrației de ARN / ADNc viral din probele pozitive luate în studiu
41. Tabel 8.1 Caracteristicile secvențelor utilizate în studiul epidemiologic molecular pentru gena parțială N, fragment de 606-pb
42. Tabel 8.2 Caracteristicile secvențelor utilizate în studiul epidemiologic molecular pentru gena completă N, fragment de 1353-pb
43. Tabel 9.1 Probe selectate în vederea efectuării secvențierii de nouă generație
44. Tabel 9.2 Rezultatele probelor supuse secvențierii de nouă generație
45. Tabel 10.1 Rezultatele obținute pentru cele 345 de probe de vulpi prin intermediul testului ELISA (Kit-ul BioPro)
46. Tabel 10.2 Procentul de blocare de 40-70%, respectiv și densitatea optică aferentă probelor pozitive de vulpi din județele luate în studiu
47. Tabel 10.3 Rezultatele obținute pentru cele 47 de probe de vulpi prin intermediul testului ELISA (kit-ul Platelia™ Rabies II)
48. Tabel 10.4 Interpretarea calitativă a probelor luate în studiu pe baza criteriilor de validare recomandate de către producător
49. Tabel 10.5 Rezultatele obținute la detecțiamarkerului tetraciclinei și determinarea categoriilor de vârstă pentru probele luate în studiu
50. Tabel 10.6 Numărul total de probe de mistreți testate din județele luate în studiu
51. Tabel 10.7 Procentul de blocare de 40-70%, respectiv și densitatea optică aferentă probelor pozitive de mistreți din județele luate în studiu
52. Tabel 10.8 Rezultatele obținute pentru cele 56 de probe testate prin intermediul testelor serologice ELISA și FAVN
53. Repartizarea rezultatelor obținute prin intermediul metodei de referință FAVN în 5 categorii în funcție de titrul de anticorpi antirabici postvaccinali obținut

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE

PRIM-AUTOR

LUCRĂRI ISI *proceeding*

1. **Mihaela Anca Dascalu**, Alexandre Servat, Florentina Daraban, Elena Velescu, Oana-Irina Tanase, *Evaluation of different anti-rabies conjugates used for rabies diagnosis confirmation*, Veterinary Medicine in Service of People – International Scientific Conference, 6-7 October 2017, **Bulgaria**, Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2017, 20, Suppl.1, 162-169 ISSN 1311-1477 (print); ISSN 1313-3543 (online).
2. **Mihaela Anca Dascalu**, Alexandre Servat, Florentina Daraban, Elena Velescu, Oana-Irina Tanase, *The use of two different systems for the isolation of rabies virus in cell cultures*, Veterinary Medicine in Service of People – International Scientific Conference, 6-7 October 2017, **Bulgaria**, Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2017, 20, Suppl. 1, 219-227 ISSN1311-1477 (print); 1313-3543 (online).

PRIM-AUTOR

REZUMATE ISI COMUNICATE LA CONGRESE INTERNAȚIONALE:

3. **Mihaela Anca Dascalu**, Alexander Servat, Florentina Daraban, Oana-Irina Tanase, Florence Cliquet, Elena Velescu, *Comparative study regarding the sensitivity of two cell lines used for the isolation of rabies virus*, European Biotechnology Congress, 25-27 Mai 2017, Dubrovnik-**Croatia**, Journal of Biotechnology, Volume 256, Supplement, 30 August 2017, Pages S91, Impact Factor: 2,59.
4. **Mihaela-Anca Dascalu**, Marius Dan, Florentina Daraban, Oana-Irina Tanase, Elena Velescu, *Preliminary study regarding the efficacy of oral vaccination campaigns against rabies in foxes in the North-East of Romania*. European Biotechnology Congress, 5-7 Mai 2016, Riga-**Letonia**. Journal of Biotechnology, Volume 231, Supplement, 10 August 2016, Page S73, Impact Factor: 2,66.
5. **Mihaela-Anca Dascalu**, Florentina Daraban (Bocaneti), Oana Raluca Rusu, Irina-Oana Tanase, Elena Velescu, *Epidemiological statistics of rabies in animals in Moldova region, Romania, between 2010-2014*, European Biotechnology Congress, 5-7 Mai 2015, București-**Romania**, Journal of Biotechnology, Volume 208, Supplement, 20 August 2015, Page S35, Impact Factor: 3,34.

PRIM-AUTOR

LUCRĂRI INDEXATE BDI

6. **Mihaela-Anca Dascalu**, Alexander Servat, Elena Velescu, Oana-Irina Tanase, Florentina Daraban, Florence Cliquet, *Isolation of rabies virus in mouse neuroblastoma cell line (N2a)*, Simpozion științific aniversar: Actualități în creșterea și patologia

animalelor. 25-26 mai, 2017, **Timișoara**, Lucrări științifice, Medicină Veterinară, Vol. L (1), 2017, pag. 54-60.

7. **Mihaela-Anca Dascalu**, Florentina Daraban, Marius Dan, Doina Danes, Stelian Baraitareanu, Oana Irina Tanase, Elena Velescu, *Detection of antibodies against rabies virus in foxes serum after oral vaccination campaign in Buzau and Galati Counties*, The 14th International Symposium – Prospects for the 3rd millenium agriculture, **Cluj-Napoca**, 24-26 septembrie 2015, Bulletin Of University Of Agricultural Sciences And Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine VOL. 73, No. 1, 2016, DOI: <http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:11513>.

CO-AUTOR ÎN REVISTE INDEXATE BDI:

8. Irina Oana Tănase, Cristina Cărăbăț, Constantin Pavli, Florentina Daraban, **Anca Dascălu**, Enela Velescu, *Lion (Pantera leo) particularities in individuals born and hand reared in captivity*, Scientific Congress 56th Annual Meeting of Veterinary Sciences „Towards a Global Health”, 19-20 octombrie 2017, USAMV Iași, Acceptat, în curs de publicare.
9. Irina Oana Tănase, Ioana Mădălina Istrate, Constantin Pavli, Florentina Daraban, **Anca Dascălu**, Sorin Pașca, Elena Velescu, *Lipoma in cockatiel (Nymphicus hollandicus) – a case report -*, Scientific Congress 56th Annual Meeting of Veterinary Sciences „Towards a Global Health”, 19-20 octombrie 2017, USAMV Iași, Acceptat, în curs de publicare.
10. Oana Raluca Rusu, Elena Velescu, **Mihaela-Anca Dascalu**, Alessandra Scagliarini, *Nested – multiplex PCR detection of parapoxvirus (orf virus) and papillomavirus dierctly from samples coleted from goats and cattle from Romania*, Lucr. Științ. Med. Vet. **Iași**, Vol. 57 (16), 272-275, 2014.
11. Oana Raluca Rusu, Elena Velescu, **Mihaela-Anca Dascalu**, Alessandra Scagliarini, *Researches regarding the contagious ecthyma immunoprophylaxis in sheep and goats*, Lucr. Științ. Med. Vet. **Iași**, Vol. 57 (16), 276-278, 2014.

ALTE LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE DE PROFIL:

12. **Mihaela-Anca Dascalu**, Alexander Servat, Florence Cliquet, Elena Velescu, *Studiu comparativ privind izolarea virusului rabic utilizând două linii celulare distincte: N2a și Bhk-21*, Simpozion științific studentesc, 07 aprilie 2017, Secțiunea Scoli doctorale, USAMV Iași, România.
13. **Mihaela-Anca Dascalu**, Elena Velescu, *Rabia: încă o provocare pentru medicina veterinară și umană?* Revista Practica Veterinară, Anul VI, Nr. 19 (2/2015), pag. 18, 2015.